

Stress ossidativo e rischio vascolare

Quale ruolo per gli antiossidanti?

Oxidative stress and vascular risk. Is there a role for antioxidant treatments?

Summary

Strong experimental and clinical evidences suggest that an overproduction of reactive oxygen species (ROS) is implicated in the pathogenesis and progression of diabetes, atherosclerosis and other metabolic alterations which, in turn, increase cardiovascular risk. This review summarizes the data available about the role of oxidative stress in cardiovascular pathology and the therapeutic potential of antioxidants in cardiovascular prevention.

Derosa G, Iannella P, D'Angelo A, et al. Oxidative stress and vascular risk. Is there a role for antioxidant treatments? *Trends Med* 2006; 6(1):1-12.

© 2006 Pharma Project Group srl

Giuseppe Derosa, Paride Iannella¹, Angela D'Angelo, Mario N. Piccinni, Fabio Pricolo, Sibilla Salvadeo, Leonardina Ciccarelli

Dipartimento di Medicina Interna e Terapia Medica
Sezione di Medicina Interna, Malattie Vascolari e Metaboliche
Università degli Studi di Pavia
¹Pharma Project Group srl
Saronno -VA-

Key words:

**N-acetylcysteine
atherosclerosis
free radical(s)
oxidation
antioxidant(s)
endothelial dysfunction**



Giuseppe Derosa

Dipartimento di Medicina Interna e Terapia Medica
Sezione di Medicina Interna, Malattie Vascolari e Metaboliche
Università degli Studi di Pavia
P.le C. Golgi, 2
27100 Pavia

Il ruolo dei “radicali liberi” ed in particolare delle “specie reattive dell’ossigeno” (ROS), è ben noto da oltre trenta anni^{1,2}. Specie reattive (RS) possono però essere prodotte anche da altri elementi chimici. L’alterata produzione di radicali liberi dell’ossigeno origina da aumentato metabolismo cellulare aerobico e si associa invariabilmente a “stress ossidativo”. Con il termine di stress ossidativo ci si riferisce all’alterazione dell’equilibrio, presente nel soggetto sano, fra produzione di radicali liberi e difesa antiossidante; l’alterazione di questo equilibrio fisiologico si traduce in un aumento della quantità di radicali liberi circolanti, con comparsa di insulto tissutale³. L’insulto ai tessuti direttamente esposti ai radicali liberi è conseguenza della loro elevata reattività chimica: nel caso dei ROS, l’elevata reattività chimica è correlata alle proprietà dell’ossigeno. Come noto, l’ossigeno (O₂) è una mo-

lecola altamente reattiva e, in condizioni normali, deve essere opportunamente conservato per evitare reazioni incontrollate e potenzialmente esplosive. Un soggetto adulto, sano e con adeguata attività fisica, consuma mediamente 250 g di O₂ ogni giorno⁴. Dalla combustione di questa quantità di “combustibile cellulare” si sviluppano, oltre ad energia sotto forma di adenosin trifosfato (ATP) ed acqua, anche 10 g (3-5%) delle tre principali specie reattive dell’ossigeno: anioni superossido (O₂⁻), radicale idrossilico (OH⁻) e perossido di idrogeno (H₂O₂)⁵. In aggiunta a queste, si formano altre specie reattive dell’ossigeno, di minor importanza (ozono, acido idrocloroso, etc.), nonché specie altamente reattive dell’azoto (Reactive Nitrogen Species - RNS) e del cloro (Reactive Chlorine Species - RCS). Ai fini della presente trattazione, i radicali liberi più importanti sono quelli dell’ossigeno; inol-

tre, salva diversa indicazione, con il termine generico di “radicali liberi” faremo riferimento a tutte le possibili forme di specie reattive. Come già accennato, in tutte le condizioni caratterizzate da aumentato metabolismo cellulare aerobico si ha una parallela iper-produzione di ROS: se la “riserva antiossidante” non è in grado di neutralizzare l'eccesso di specie reattive, numerosi tessuti sono esposti a stress ossidativo, con denaturazione di proteine, DNA ed alterazione delle proprietà di membrana. Alterazioni del metabolismo aerobico, con aumentata produzione di ROS, possono avvenire in condizioni acute (shock settico, ustioni, etc.), in condizioni parafisiologiche (vecchiaia) o in modo cronico in malattie caratterizzate da aumentato metabolismo intracellulare (diabete mellito, ipertensione, nefropatie, etc.)⁶⁻¹⁰. L'aumentata produzione di radicali liberi è stata anche registrata nei fumatori e nei pazienti con ipercolesterolemia^{11,12}. Il ruolo di un possibile sbilanciamento fra produzione di radicali liberi dell'ossigeno e malattie cardiovascolari fu suggerita sin dai primi anni '80^{13,14}. Più recentemente, numerosi studi hanno valutato il contributo primario dello stress ossidativo nella patogenesi della malattia aterosclerotica¹⁵⁻¹⁷. Con specifico riferimento alla formazione della placca aterosclerotica, numerosi studi sperimentali hanno dimostrato che l'ossidazione delle lipoproteine a bassa densità (LDL) è condizione essenziale perché esse attraversino la membrana endoteliale e si accumulino negli spazi sub-endoteliali: l'attraversamento dell'endotelio è infatti “consentito” prevalentemente alle LDL ossidate

(LDL_{ox}) che, una volta raggiunto il sub-endotelio, sono trattate molto più tenacemente rispetto alle LDL non ossidate^{18,19}. L'accumulo delle LDL ossidate nei macrofagi, richiamati *in loco* dall'insulto endoteliale, permette la fase successiva del processo aterogenetico (infiammazione locale) grazie al quale il processo si alimenta, consentendo l'accrescimento della placca e la conseguente occlusione del lume vascolare^{20,21}. In conclusione, è l'eccesso di ROS ad innescare il processo aterogenetico attraverso la perossidazione delle LDL, e questo dato correla bene con l'osservazione che l'ipercolesterolemia, l'iperglicemia, l'ipertensione arteriosa e l'obesità (tutte condizioni acceleranti fortemente il processo aterosclerotico) sono anche fonte di esaltato stress ossidativo²²⁻²⁴. Sulla base di questi dati sono stati condotti numerosi studi con molecole dotate di attività riducente (prevalentemente vitamina -A, -E, -C e probucolo), nella convinzione che il riequilibrio della riserva antiossidante potesse rallentare il processo aterogenetico. Purtroppo, i risultati di questi studi non appaiono allo stato attuale conclusivi e sono state sollevate non poche perplessità circa la necessità di disegnare studi più adeguati a rilevare gli effetti a lungo termine degli antiossidanti, nonché la necessità di utilizzare molecole dotate di un maggiore potenziale redox²⁵. E' tuttavia interessante notare che, a fronte di dati non definitivi provenienti dagli studi clinici, l'American Heart Association, organismo notoriamente prudente nel rilascio di documenti ufficiali, ha recentemente emanato Linee Guida dettagliate circa la corretta ed adeguata assun-

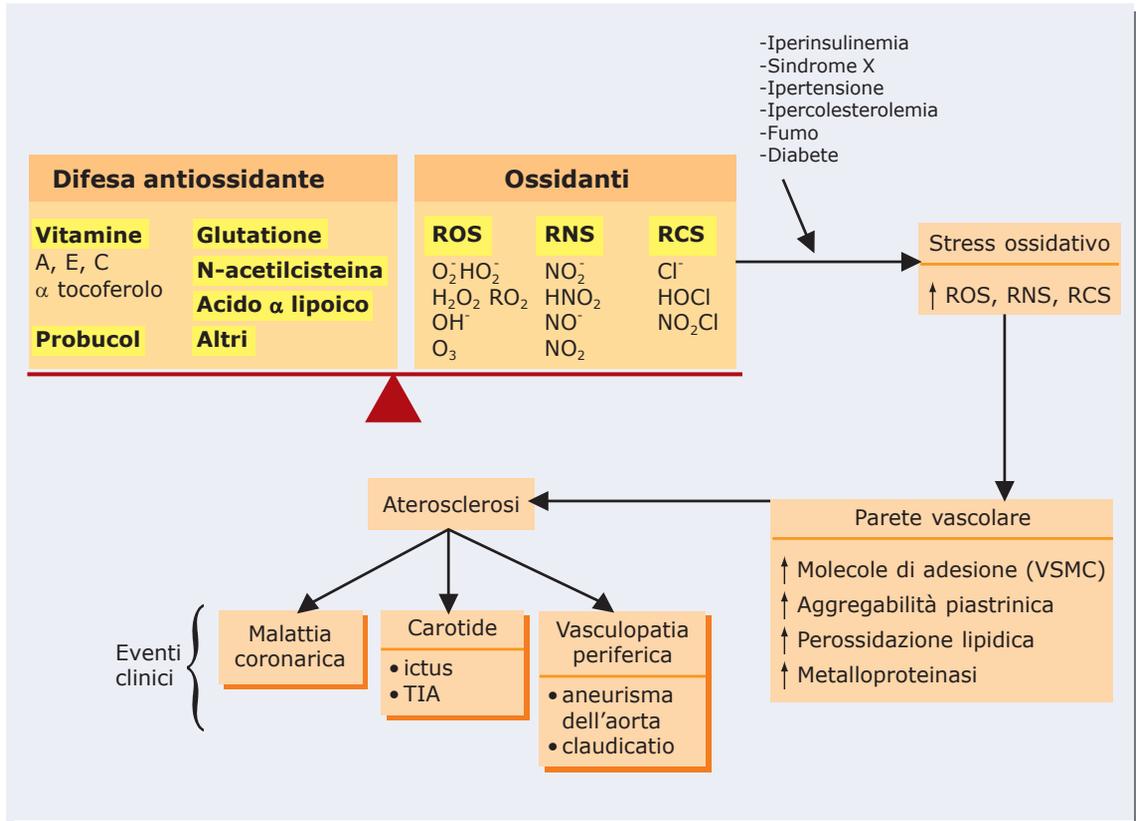
zione di antiossidanti e vitamine con la dieta o con supplementazione esogena in prevenzione cardiovascolare, con enfasi nei soggetti a maggior rischio coronarico²⁶. Questa posizione ufficiale sottende la convinzione che i risultati, non sempre favorevoli degli studi clinici, siano da imputare piuttosto al loro disegno che all'inefficacia del trattamento con antiossidanti.

In questa rassegna esamineremo il ruolo dello stress ossidativo nella malattia coronarica, i principali studi con antiossidanti, le probabili ragioni d'insuccesso di alcuni di questi studi ed il potenziale terapeutico degli antiossidanti in prevenzione cardiovascolare.

Stress ossidativo ed aterosclerosi: basi biologiche

Come precedentemente riportato, l'incapacità dell'organismo di neutralizzare l'eccesso di specie reattive determina aumento del pool circolante (figura 1). Iperproduzione di radicali liberi può avvenire in qualunque sito metabolicamente attivo ed un aumento locale determina aumento delle concentrazioni sistemiche se il dosaggio è eseguito con tecniche sensibili; con specifico riferimento ad aumento dei radicali liberi nella parete vascolare, numerosi studi sperimentali hanno confermato che ad un aumento dei radicali liberi nel circolo sistemico corrisponde un parallelo aumento nella parete vascolare e viceversa^{15,27}. L'effetto dei radicali liberi a livello endoteliale, soprattutto dei ROS, è rilevante e si associa ad aumentata espressione di molecole di adesione vascolare (VCAM-1), ossidazione delle LDL e proliferazione delle cel-

Figura 1. Barriera antiossidante e malattia aterosclerotica. In presenza di fattori di rischio la bilancia ossidativa si sposta a favore di un eccesso di radicali liberi che, concentrandosi nella parete vascolare, attraverso vari meccanismi innescano e perpetuano la formazione della placca.



lule della muscolatura liscia vasale (VSMC)^{20,28-30}. Ad un maggior stress ossidativo, in modo particolare ad incremento di H₂O₂ e radicali ossidrilici, è stata associata anche l'attivazione del sistema delle metalloproteinasi (MMP), dell'asse Renina-Angiotensina-Aldosterone (RAA) e del fattore di derivazione piastrinica (PDGF-1), meccanismi ampiamente coinvolti sia nella formazione della placca sia nella alterata risposta vasomotoria³¹⁻³⁴. Recentemente la produzione di radicali liberi è stata messa in relazione diretta anche con il rimodellamento ventricolare post-infartuale, un fenomeno inizialmente compensatorio ma che nel lungo periodo peggiora la prognosi ed aumenta il rischio di eventi clinici³⁵.

Radicali liberi ed eventi aterotrombotici

L'attivazione del sistema delle metalloproteinasi e della risposta infiammatoria fanno parte di meccanismi oggi ritenuti cruciali nel facilitare la rottura della placca e nella formazione di trombi e, quindi nella patogenesi degli eventi clinici (sindromi coronariche acute, ictus, TIA)³⁶⁻³⁹. Negli ultimi quindici anni la visione della cardiopatia ischemica ha spostato il proprio baricentro dal versante puramente meccanico, associato cioè alla presenza di una placca stenotica responsabile di ridotto flusso coronarico, verso una visione più metabolica e dinamica: in questa nuova visione, un ruolo primario è attribuito alla struttura della placca piuttosto che alle

sue dimensioni^{40,41}. Questa diversa visione del ruolo della placca nella patogenesi degli eventi clinici origina dalla constatazione obiettiva (autoptica) che meno della metà dei decessi per IMA si associa a stenosi coronariche così importanti da determinare ischemia acuta fatale, mentre una quota rilevante di infarti acuti letali (60-70%)

Il ruolo di un'adeguata assunzione di sostanze antiossidanti è ritenuto cruciale dalle maggiori Istituzioni Sanitarie e recentemente l'American Heart Association ha rilasciato specifiche Linee Guida in tal senso.

vede la propria causa nella rottura di una placca di dimensioni non significative dal punto di vista emodinamico (occlusione del lume coronarico <75%) e dal successivo rilascio di trombi nel circolo sistemico⁴².

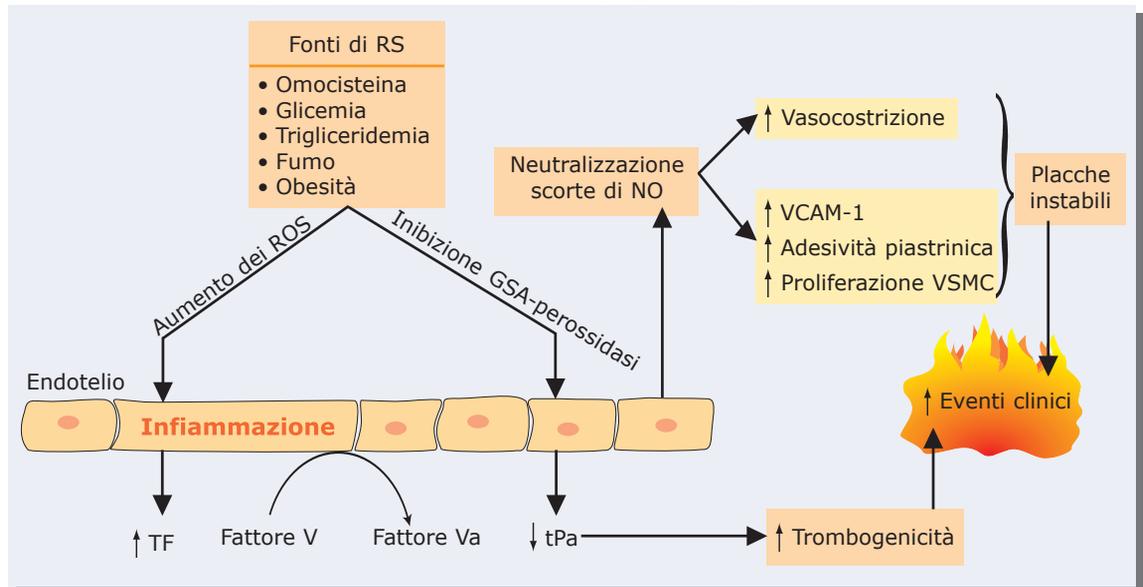
In tale contesto appare evidente il ruolo di tutti quei fattori responsabili di un'aumentata propensione della placca alla rottura (instabilità di placca) e di quelli di attivazione della cascata emostatica, con conseguente aumento della tendenza alla formazione di trombi (figura 2). Entrambi questi meccanismi sono di natura sostanzialmente infiammatoria e sono innescati da un'esaltata produzione di radicali liberi^{43,44}. Miller e collaboratori hanno dimostrato un'aumentata concentrazione di ROS nelle cellule della muscolatura liscia di coronarie di coniglio⁴⁵; questo evento induce a sua volta un aumentato rilascio di acido arachidonico e l'attivazione di tirosin-chinasi ed altri mediatori infiammatori^{46,47}. Altre prove a favore di una relazione di-

retta fra eccesso di radicali liberi ed esaltazione della cascata infiammatoria sono state ottenute sia in modelli animali sia in studi clinici nell'uomo: studi sperimentali hanno dimostrato che la disfunzione endoteliale è direttamente correlata alla reazione fra radicali superossido (O_2^-) ed ossido nitrico (NO), il principale mediatore del rilassamento vascolare endotelio-mediato⁴⁸; risultati analoghi sono stati ottenuti in pazienti ipertesi, così come, in pazienti sottoposti ad angioplastica, è stato documentato un aumento dell'attività ossido-reduttasica dopo denudamento endoteliale in pazienti sottoposti ad angioplastica, con conseguente stimolazione di VSMC, attivazione di proto-oncogeni e richiamo di neutrofili^{49,50}.

Una conferma diretta e definitiva del coinvolgimento dei ROS nell'instabilità di placca nell'uomo è stata dimostrata recentemente da uno studio condotto da Azumi e collaboratori su campioni di placche coronariche

di 36 pazienti con angina (stabile ed instabile) sottoposti ad atrectomia direzionale con rotoablatores⁵¹. In questo studio, la composizione cellulare e molecolare dei frammenti di placca è stata indagata con tecniche di immunofluorescenza diretta in grado di rilevare le concentrazioni di ROS, LDL_{ox} ed NAD(P)H ossidasi sia nei macrofagi sia libere nella placca. Nei frammenti delle placche provenienti dalle coronarie dei pazienti con angina instabile (più instabili), sono state rilevate maggiori concentrazioni di ROS rispetto alle placche provenienti dai pazienti con angina stabile (più stabili). Gli stessi Autori hanno inoltre rilevato che l'aumentata presenza intra-placca di anioni superossido e perossinitriti attiva la produzione di mediatori infiammatori e di MMP-2 ed MMP-9, metalloproteinasi direttamente coinvolte nei processi di assottigliamento della capsula fibrosa che contiene la placca, rendendola così più suscettibile alla rottura.

Figura 2. Produzione di radicali liberi ed attivazione di mediatori infiammatori intravasali. L'omocisteina costituisce una fonte importante di radicali liberi e ciò spiega buona parte dei suoi effetti aterotrombotici.



Allo stato attuale i radicali liberi sembrano essere coinvolti nelle fasi più precoci dell'insulto tissutale: a tale insulto si deve la conseguente risposta infiammatoria che caratterizza la patogenesi precoce di molte malattie croniche.

Omocisteina e radicali liberi: l'anello mancante

L'omocisteina è stata coinvolta nell'aumento del rischio trombotico sin dalla metà degli anni '60, quando Gerritsen e Waisman riportarono il primo caso

di tromboembolismo polmonare fatale in un neonato affetto da omocitinuria e McCully descrisse una degenerazione dell'intima e della lamina elastica interna in neonati affetti dalla stessa alterazione metabolica^{52,53}. La relazione fra iper-omocisteinemia e rischio cardiovascolare è stata negli anni successivi oggetto di numerosi studi, e nel 1995 Boushey e collaboratori dimostrarono che un incremento di 5 µM delle concentrazioni plasmatiche di omocisteina conferiva un rischio cardiovascolare aggiuntivo del 60% nell'uomo e dell'80% nella donna⁵⁴.

Come evidenziato nella precedente figura 2, l'omocisteina è una fonte rilevante di radicali liberi, nonché un potente inibitore della glutazione perossidasi. L'omocisteina sembra agire quindi negativamente su entrambi i versanti della bilancia ossidativa: l'aumentata produzione di radicali liberi e la riduzione dell'attività antiossidante glutazione-mediata, e ciò spiegherebbe i maggiori effetti avversi di questa molecola rispetto ad altri generatori di specie reattive⁵⁵. Allo stato attuale, tutti i principali effetti avversi sul sistema cardiovascolare attribui-

Tabella 1. Risultati di vari studi clinici con antiossidanti: è interessante notare come a parità di antiossidante e di dosaggio somministrato si siano osservati effetti diversi.

Studio/Autore (Anno)	Antiossidante (dosaggio)	Risultato
CHAOS/Stephens NG (1996) ⁵⁷	Vitamina E (400 UI/die)	Riduzione del tasso di reinfarti
Azen SP (1996) ⁵⁸	Vitamina E (1000 UI/die)	Rallentata progressione delle placche aterosclerotiche
ISLAND/Sochman J (1996) ⁵⁹	NAC (100 mg/kg/die)	Riduzione del 10% dell'area infartuale
Yokoi H (1997) ⁶⁰	Probucol (1 g/die)	Riduzione a 6 mesi del tasso di restenosi in pazienti sottoposti ad angioplastica coronarica
Ardissino D (1997) ⁶¹	NAC (600 mg/die) + nitroglicerina transdermica (10 mg/die)	Riduzione del 22% dell'end-point composito rispetto al placebo ¹
Rapola JM (1997) ⁶²	β-carotene (20 mg/die) α-tocoferolo (50 mg/die)	Negativo a 5.3 anni Negativo a 5.3 anni in pazienti con pregresso IMA
GISSI-P/Marchioli R (1999) ⁶³	Vitamina E (300 mg/die)	Nessuno in pazienti con pregresso IMA
SPACE/Boaz M (2000) ⁶⁴	Vitamina E (800 IU/die)	Riduzione del 46% dell'end point composito ²
HPS (2002) ⁶⁵	Vitamina E (600 mg/die)+ vitamina C (250 mg/die)+ β-carotene (20 mg/die)	Nessuno in pazienti ad alto rischio coronarico (pregresso IMA, ictus, diabete)
Tepel M (2003) ⁶⁶	NAC (600 mg bid)	Riduzione del 40% dell'end-point composito in pazienti dializzati ³

Legenda: NAC = N-acetilcisteina; ¹End point composito: mortalità totale + infarto del miocardio + angina persistente richiedente vascolarizzazione ²End-point composito: infarti fatali e non + ictus ischemici + casi di angina instabile + casi di trombosi arti inferiori; ³End-point composito: infarti fatali e non + necessità di rivascolarizzazioni coronariche + ictus + vasculopatia arti inferiori (amputazioni)

ti all'omocisteina, sembrano essere correlati esclusivamente alle proprietà ossidanti della molecola ed all'innescare dei processi flogistici conseguenti all'insulto endoteliale promosso da questo fuoco solforoso⁵⁶.

Trattamento anti-ossidante ed eventi coronarici

A fronte di un razionale forte per l'uso degli antiossidanti nella prevenzione degli eventi cardiovascolari, si osserva una sostanziale disomogeneità dei dati provenienti dagli studi clinici. La mancanza di prove conclusive a favore di un effetto forte degli antiossidanti in alcuni studi clinici recenti, segnatamente il Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto-Prevenzione (GISSI-P) e l'Heart Protection Study (HPS), devono far riflettere su tre aspetti:

- 1) Gli studi sono stati disegnati in modo idoneo a valutare l'efficacia del trattamento antiossidante da testare (durata, posologia, etc.)?
- 2) La molecola utilizzata è dotata di adeguato potenziale redox?
- 3) La presenza di altri farmaci nel protocollo di studio può "nascondere" l'effetto della molecola antiossidante in esame?

Studi clinici con vitamine

Prove favorevoli circa l'utilità del trattamento con vitamine antiossidanti provengono da diversi studi (epidemiologici, di farmacologia sperimentale e clinici). Studi osservazionali di ampie dimensioni come il MONICA, condotto su 38 popolazioni in 21 nazioni, hanno dimostrato l'esistenza di una relazione inversa fra concentrazioni sieriche di vitamina E ed infar-

to acuto⁶⁷. Questi risultati sono stati osservati anche da altri Autori⁶⁸. Per contro, i risultati degli studi clinici riportati in tabella 1 evidenziano risultati non sempre favorevoli. L'analisi di questi dati suggerisce che oltre alla dose sia determinante il potenziale ossido-riduttivo della molecola testata. L'allestimento di studi clinici con molecole dotate di un più elevato potenziale redox appare quindi auspicabile, e negli ultimi anni sono state indagate sostanze dotate di una maggiore attività riducente, quali l'acido alfa lipoico e la N-acetilcisteina.

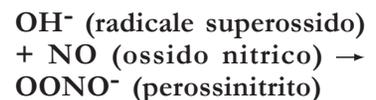
Studi con N-acetilcisteina

La N-acetilcisteina è un composto solforato in grado di ripristinare l'eventuale depauperamento della riserva antiossidante, determinando l'incremento delle scorte di glutatione ridotta (GSH) in organi e tessuti altamente sensibili all'equilibrio ossido-riduttivo (reni, polmoni, emazie, endotelio, etc.). Il glutatione, con un potenziale redox di -280 mV, è la principale sostanza riducente coinvolta nel mantenimento dell'omeostasi ossido-riduttiva. Numerose condizioni acute sono caratterizzate da deplezione delle riserve di GSH e qualunque molecola in grado di ripristinare rapidamente il sistema del glutatione risulta determinante nella risoluzione del quadro clinico. L'impiego della NAC è noto da molti anni nel trattamento dell'avvelenamento acuto da paracetamolo e nella prevenzione della nefropatia da mezzo di contrasto^{69,70}.

N-acetilcisteina e vasodilatazione

In questo paragrafo esamineremo esclusivamente gli effetti, accertati o in corso di valutazio-

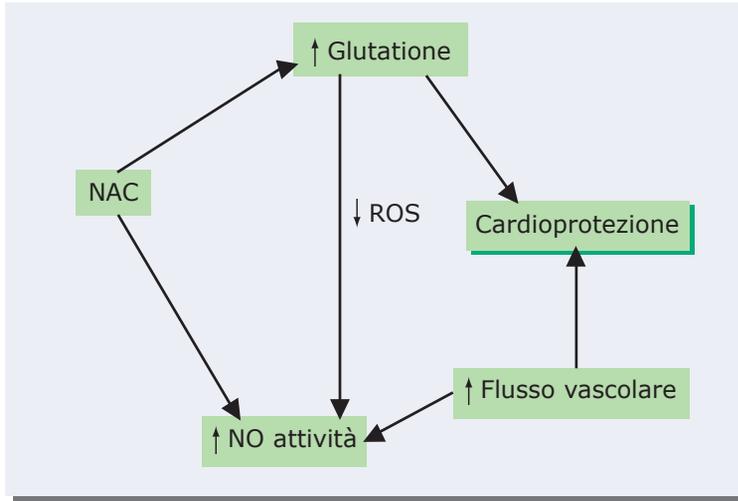
ne, della N-acetilcisteina sul sistema vascolare. La NAC è prontamente assorbita nell'apparato digerente, passa rapidamente in circolo e reintegra le riserve di GSH, meccanismo attraverso cui esprime i suoi effetti "tradizionali". In studi di farmacologia sperimentale su coronarie di cane, la N-acetilcisteina sembra però esercitare un effetto addizionale ed indipendente da quello GSH-mediato: questo effetto appare correlato alla conservazione delle scorte di ossido nitrico prodotto dall'endotelio; tale meccanismo protettivo nei confronti dell'NO sembra mediato dalla neutralizzazione di alcuni radicali liberi capaci di legarsi direttamente con le molecole di NO, inattivandole, secondo l'equazione:



La neutralizzazione dell'ossido nitrico da parte di radicali OH[·] correla direttamente con la formazione di perossinitrito, e la facile misura di questo prodotto della reazione indica il depauperamento di NO, effetto puntualmente osservato negli studi sperimentali⁷¹. Come noto, l'ossido nitrico è il più potente fattore di rilassamento vascolare oggi conosciuto e qualunque inattivazione o deficit secretorio di NO induce ridotta risposta vasomotoria e disfunzione endoteliale^{72,73}. Questo meccani-

I risultati non sempre confortanti del trattamento con vitamine hanno sollevato il dubbio circa la necessità di intervenire con molecole dotate di un maggior potenziale redox.

Figura 3. Possibili meccanismi attraverso cui la somministrazione di NAC induce protezione cellulare dall'eccesso di radicali liberi. Il re-integro delle scorte di glutazione appare in questo contesto complementare (effetto anti-ischemico indiretto) a quello primario esercitato sulle concentrazioni di NO (effetto anti-ischemico diretto).



simo è stato ben studiato da Lopez su arteria mesenterica di ratto ed è schematizzato in figura 3.

N-acetilcisteina e aterogenesi

Come precedentemente riportato, l'eccesso di radicali liberi a livello vascolare è direttamente coinvolto nell'innescare del processo aterogenetico (attraverso la perossidazione delle LDL) e, una volta che la placca si è formata, nella sua instabilità meccanica (attraverso l'attivazione delle MMP e delle citochine infiammatorie). E' lecito quindi chiedersi se la somministrazione di NAC possa interferire con i meccanismi di base summenzionati.

In uno studio condotto su pazienti con diabete di tipo 2, ma senza altri fattori noti di stress ossidativo (normotesi, normolipemici, non fumatori e non obesi), la somministrazione di NAC (1200 mg/die) ha ridotto l'espressione di VCAM-1, con parallelo aumento delle concentrazioni intraeritrocitarie di

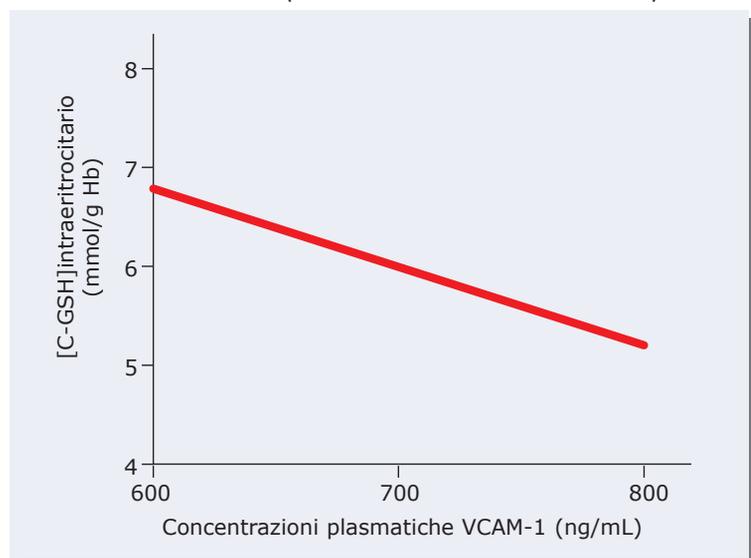
GSH (figura 4). Poiché nei soggetti diabetici l'incremento delle concentrazioni plasmatiche di VCAM-1 è inversamente correlato con le concentrazioni intraeritrocitarie di GSH, si può assumere che l'intero processo possa essere invertito ripristi-

nando il deficit di glutazione. In questo studio l'effetto di inversione fra glutazione e VCAM-1 è stato chiaramente osservato nei soggetti trattati con NAC ma non in quelli trattati con placebo. Ne consegue che la somministrazione di antiossidanti dotati di adeguato potenziale redox può risultare una misura protettiva nei confronti della iperregolazione, RS-mediata, delle VCAM-1 (e del conseguente danno vascolare), osservata nei pazienti con diabete di tipo 2.

N-acetilcisteina e sindromi coronariche acute

Due studi hanno dimostrato chiaramente che la somministrazione di NAC previene gli eventi coronarici e l'ischemia in opportune condizioni cliniche: 1) nel recente studio di Teipel, il farmaco è stato somministrato a pazienti dializzati ad alto rischio cardiovascolare con l'intento di verificare se la riduzione dell'imponente stress ossidativo, che caratterizza la nefropatia termi-

Figura 4. Effetti del trattamento con NAC (1200 mg/die) per 30 giorni in pazienti diabetici senza altri fattori di rischio cardiovascolare e di stress ossidativo. La riduzione delle concentrazioni plasmatiche di VCAM-1 è inversamente correlata al ripristino delle scorte intraeritrocitarie di GSH. (Dati da De Mattia G et al 1997⁷⁴).



nale, fosse positivamente influenzato dalla NAC⁶⁶; 2) nello studio di Ardissino, il farmaco in associazione a nitroglicerina transdermica è stato somministrato a pazienti con diagnosi di angina instabile⁶¹.

Pazienti con nefropatia terminale. Nello studio di Tepel, 132 pazienti in trattamento dialitico con età media di 62 anni sono stati assegnati a ricevere, oltre al trattamento standard, NAC (600 mg bid) o placebo. I pazienti sono quindi stati monitorati per una media di 14,5 mesi. Obiettivo dello studio era verificare se la somministrazione di NAC fosse in grado di ridurre una vasta gamma di eventi cardiovascolari (end-point composito): IMA (fatali e non fatali), ictus ischemici, amputazioni degli arti inferiori, necessità di angioplastica o bypass coronarico e mortalità totale per cause cardiovascolari. In figura 5 (a) sono riportati gli effetti del trattamento attivo rispetto al placebo in termini di riduzione del rischio relativo: si può osservare una riduzione dell'end-point composito pari al 40%.

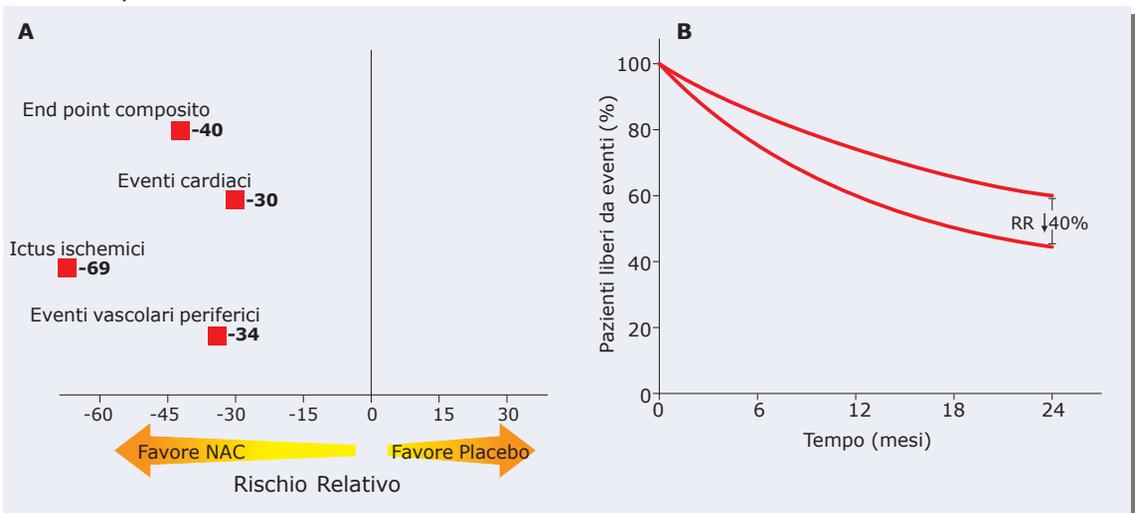
Questo studio ha chiaramente dimostrato che pazienti ad alto rischio di eventi cardio- e cerebrovascolari, quali sono quelli con malattia renale terminale, beneficiano del trattamento con N-acetilcisteina nonostante l'adozione di protocolli "ottimali", cioè con l'aggiunta del farmaco testato "in cima" ad altri trattamenti con provata efficacia (antiipertensivi, ipolipemizzanti, etc.), condizione sperimentale facilmente soggetta a "mascheramento dei benefici clinici dell'ultimo farmaco aggiunto".

Pazienti con angina instabile. Nello studio di Ardissino e collaboratori, 200 pazienti con angina instabile sono stati randomizzati in tre bracci di trattamento: 1) nitroglicerina transdermica (10 mg/die); 2) nitroglicerina transdermica (10 mg/die) più NAC (600 mg/die tid); 3) solo NAC (600 mg/die); 4) placebo⁶¹. I pazienti sono stati seguiti per 4 mesi con l'obiettivo di misurare il tasso di eventi (mortalità totale, infarti e necessità di rivascolarizzazione). Al termine del periodo di studio si

sono osservati eventi clinici nel 31% dei pazienti ricevanti nitroglicerina transdermica e nel 13% di quelli ricevanti il trattamento combinato, con una riduzione del rischio relativo pari al 23% ($p=0.0022$). I benefici maggiori sono apparsi quelli relativi al tasso di IMA, con una riduzione del rischio relativo pari al 41%, benché l'esiguo numero di eventi occorsi e la durata del trial non abbiano consentito di raggiungere la significatività statistica ($p=0.45$). I benefici del trattamento combinato sembrano ascrivibili ad una rallentata tolleranza alla nitroglicerina, evento limitante ben noto, ed al po-

La N-acetilcisteina costituisce ad oggi l'unica molecola che, in studi sperimentali e clinici, ha dimostrato di interferire con la produzione di specie reattive, sia in condizioni acute (nefropatia da mezzo di contrasto, avvelenamento da paracetamolo, etc), sia in pazienti con segni di aterosclerosi vascolare.

Figura 5. Riduzione del rischio associato al trattamento con NAC (a): oltre ad una riduzione significativa dell'end-point composito primario si registra una riduzione ancora maggiore degli ictus ischemici. In (b) curve di sopravvivenza liberi da eventi nei due bracci di trattamento.



tenziamento degli effetti antiaggreganti: entrambi questi effetti erano stati osservati in precedenti studi sperimentali⁷⁵⁻⁷⁸. Nello studio in questione è stata osservata una maggior incidenza di reazioni avverse nel braccio in terapia combinata, ma è probabile che in questo contesto dosi più basse di NAC siano sufficienti per raggiungere gli stessi risultati (600-1200 mg/die).

Conclusioni

Negli ultimi anni si sono accumulate evidenze sperimentali e cliniche sempre più convincenti circa il ruolo primario dei radicali liberi nella patogenesi della vasculopatia aterosclerotica. A fronte di questi dati certi e coerenti gli studi clinici con vitamine, in modo particolare con vitamina E, appaiono discordan-

ti, con benefici clinici talvolta significativi, spesso modesti e qualche volta del tutto assenti. Ne consegue che la supplementazione con vitamine antiossidanti tradizionali (vitamina-E, -C ed -A) non è in grado di "scovare" e neutralizzare efficacemente l'eccesso di radicali liberi, almeno in quei tessuti dove vi è una grande produzione di tali sostanze. Appare quindi necessario prendere in esame, in studi clinici disegnati *ad hoc*, molecole dotate di un maggior potenziale redox: in questo contesto i deludenti risultati dei recenti trial con vitamine non devono essere considerati conclusivi, ma piuttosto una nuova base di partenza, per studiare più in dettaglio sia i meccanismi di base del danno cellulare e molecolare ROS-mediato sia i potenziali effetti clinici di nuove molecole. Alla luce dei favorevoli risultati

ottenuti con N-acetilcisteina in modelli animali e, più recentemente, nell'uomo, questa molecola dovrebbe essere sottoposta ad una più ampia verifica, magari partendo, in particolare, dai soggetti gravati da maggior stress ossidativo (diabete, dislipidemia, fumo e sindrome metabolica). Un aiuto importante nello studio di questa e di altre molecole antiossidanti potrebbe venire dal dosaggio facilitato di numerosi marcatori di stress ossido-riduttivo, in modo da trattare solo i pazienti con maggiori concentrazioni urinarie di tali marcatori. Il dosaggio urinario di alcuni metaboliti sembra una via promettente e nei prossimi anni informazioni determinanti nella prognosi della malattia e nel monitoraggio degli effetti terapeutici potrebbe venire dall'impiego di tecniche diagnostiche più raffinate e sensibili. **TiM**

Bibliografia

1. Pryor WA. Free radicals in biological systems. *Sci Am* 1970; 223:70-76.
2. Cross CE, Halliwell B, Borish ET, et al. Oxygen radicals and human disease. *Ann Intern Med* 1987; 107:526-545.
3. Halliwell B. Antioxidant characterization; methodology and mechanism. *Biochem Pharmacol* 1995; 49:1341-1348.
4. Shihabi A, Li WG, Miller FJ, et al. Antioxidant therapy for atherosclerotic vascular disease: the promise and the pitfalls. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 282:H797-H802.
5. Rice-Evans CA, Burdon RH. *Free Radical Damage and Its Control*. Amsterdam: Elsevier 1994; 25-27.
6. Paolisso G, Tagliamonte MR, Rizzo MR, et al. Oxidative stress and advancing age: results in healthy centenarians. *J Am Geriatric Soc* 1998; 46:833-838.
7. Paolisso G, Giugliano D. Oxidative stress and insulin action: is there a relationship? *Diabetologia* 1996; 39:357-363.
8. Portaluppi F, Boari B, Manfredini R. Oxidative stress in essential hypertension. *Curr Pharm Des* 2004; 10:1695-1698.
9. Kedziora-Kornatowska K, Czuczejko J, Pawluk H, et al. The markers of oxidative stress and activity of the antioxidant system in the blood of elderly patients with essential arterial hypertension. *Cell Mol Biol Lett* 2004; 9 (4A):635-641.
10. Phillips M, Cataneo RN, Chema T, et al. Increased breath biomarkers of oxidative stress in diabetes mellitus. *Clin Chim Acta* 2004; 344:189-194.
11. Ohara Y, Peterson TE, Harrison DG. Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. *J Clin Invest* 1993; 91:2546-2551.
12. Parik T, Allikmets K, Teesalu R, et al. Oxidative stress and hyperinsulinaemia in essential hypertension: different facets of increased risk. *J Hypertens* 1996; 14:407-410.
13. Singal PK, Beamish RE, Dhallan NS. Potential oxidative pathways of catecholamines in the formation of lipid peroxides and genesis of heart disease. *Adv Exp Med Biol* 1983; 161:391-401.
14. Peterson DA, Asinger RW, El-sperger KJ, et al. Reactive oxygen species may cause myocardial reperfusion injury. *Biochem Biophys Res Commun* 1985; 127:87-93.
15. Harrison D, Griendling KK, Landmesser U, et al. Role of oxidative stress in atherosclerosis. *Am J Cardiol* 2003; 91(3A):7A-11A.
16. Anderson TJ. Oxidative stress, endothelial function and coronary atherosclerosis. *Cardiology* 1997; 42:701-714.
17. Parthasarathy S, Santanam N, Ramachandran S, et al. Oxidants and antioxidants in atherosclerosis. An appraisal. *J Lipid Res* 1999; 40:2143-2157.

18. **Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, et al.** Beyond cholesterol: modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med* 1989; 320:915-924.
19. **Witztum JL, Steinberg D.** Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J Clin Invest* 1991; 88:1785-1792.
20. **Cai H, Harrison DG.** Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res* 2000; 87:840-844.
21. **Ruef J, Peter K, Nordt TK, et al.** Oxidative stress and atherosclerosis: its relationship to growth factors, thrombus formation and therapeutic approaches. *Thromb Haemost* 1999; 82 (Suppl 1):32-37.
22. **Ceriello A.** Acute hyperglycaemia and oxidative stress generation. *Diabet Med* 1997; 14 (Suppl 3):S45-S49.
23. **Vincent HK, Powers SK, Stewart DJ, et al.** Obesity is associated with increased myocardial oxidative stress. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1999; 23:67-74.
24. **Haffner SM, Agil A, Mykkänen L, et al.** Plasma oxidisability in subjects with normal glucose tolerance, impaired glucose tolerance and NIDDM. *Diabetes Care* 1995; 18:646-653.
25. **Chalmers TC.** Antioxidants and cardiovascular disease: why do we still not have the answers? *Ann Intern Med* 1995; 123:887.
26. **Kris-Etherton PM, Lichtenstein AH, Howard BV, et al.** Nutrition Committee of the American Heart Association Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism. Antioxidant vitamin supplements and cardiovascular disease. *Circulation* 2004; 110:637-641.
27. **Rosen P, Nawroth PP, King G, et al.** The role of oxidative stress in the onset and progression of diabetes and its complications: a summary of a Congress Series sponsored by UNESCO-MCBN, the American Diabetes Association and the German Diabetes Society. *Diabetes Metab Res Rev* 2001; 17:189-212.
28. **Tesfamariam B.** Free radicals in diabetic endothelial cell dysfunction. *Free Radic Biol Med* 1994; 16:383-391.
29. **Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, et al.** The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic Biol Med* 1992; 13:341-390.
30. **Hink U, Li H, Mollnau H, et al.** Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Circ Res* 2001; 88:E14-E22.
31. **Sundaresan M, Yu ZX, Ferrans VJ, et al.** Requirement for generation of H₂O₂ for platelet-derived growth factor signal transduction. *Science* 1995; 270:296-299.
32. **Nickenig G, Harrison DG.** The AT1-type angiotensin receptor in oxidative stress and atherogenesis, part I: oxidative stress and atherogenesis. *Circulation* 2002; 105:393-396.
33. **Grover AK, Samson SE, Fomin VP, et al.** Effects of peroxide and superoxide on coronary artery: ANG II response and sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ pump. *Am J Physiology* 1995; 269:C546-C553.
34. **Daugherty A, Rateri DL, Dunn JL, et al.** Myeloperoxidase, a catalyst for lipoprotein oxidation, is expressed in human atherosclerotic lesions. *J Clin Invest* 1994; 94:437-444.
35. **Kameda K, Matsunaga T, Abe N, et al.** Correlation of oxidative stress with activity of matrix metalloproteinase in patients with coronary artery disease. Possible role for left ventricular remodelling. *Eur Heart J* 2003; 24:2180-2185.
36. **Sugiyama S, Okada Y, Sukhova GK, et al.** Macrophage myeloperoxidase regulation by granulocyte macrophage-colony stimulating factor in human atherosclerosis and implications in acute coronary syndromes. *Am J Pathol* 2001; 158:879-891.
37. **Heinecke JW.** Oxidants and antioxidants in the pathogenesis of atherosclerosis: implications for the oxidized low density lipoprotein hypothesis. *Atherosclerosis* 1998; 141:1-15.
38. **Alvarez B, Ruiz C, Chacon P, et al.** Serum values of metalloproteinase-2 and metalloproteinase-9 as related to unstable plaque and inflammatory cells in patients with greater than 70% carotid artery stenosis. *J Vasc Surg* 2004; 40:469-475.
39. **Newby AC.** Dual role of matrix metalloproteinases (matrixins) in intimal thickening and atherosclerotic plaque rupture. *Physiol Rev* 2005; 85:1-31.
40. **Little WC, Applegate RJ.** Role of plaque size and degree of stenosis in acute myocardial infarction. *Cardiol Clin* 1996; 14:221-228.
41. **Holdsworth RJ, McCollum PT, Bryce JS et al.** Symptoms, stenosis and carotid plaque morphology. Is plaque morphology relevant? *Eur J Vasc Endovasc Surg* 1995; 9:80-85.
42. **Forrester JS.** Role of plaque rupture in acute coronary syndromes. *Am J Cardiol* 2000; 86:15J-23J.
43. **Kabbani SS, Watkins MW, Holoch PA, et al.** Platelet reactivity in coronary ostial blood: a reflection of the thrombotic state accompanying plaque rupture and of the adequacy of anti-thrombotic therapy. *J Thromb Thrombolysis* 2001; 12:171-176.
44. **Kobayashi S, Inoue N, Ohashi Y, et al.** Interaction of oxidative stress and inflammatory response in coronary plaque instability: important role of C-reactive protein. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23:1398-1404.
45. **Miller FJ Jr, Gutterman DD, Rios CD, et al.** Superoxide production in vascular smooth muscle contributes to oxidative stress and impaired relaxation in atherosclerosis. *Circ Res* 1998; 82:1298-1305.
46. **Cane A, Bretion M, Koumanov K, et al.** Oxidant-induced arachidonic acid release and impairment of fatty acid acylation in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 1998; 274:C1040-C1046.
47. **Griendling KK, Sorescu D, Lassegue B, et al.** Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology. *Ar-*

- terioscler Thromb Vasc Biol 2000; 20:2175-2183.
48. **Freiman PC, Mitchell GC, Heistad DD, et al.** Atherosclerosis impairs endothelium-dependent vascular relaxation to acetylcholine and thrombin in primates. *Circ Res* 1986; 58:783-789.
 49. **Lembo G, Vecchione C, Izzo R, et al.** Noradrenergic vascular hyper-responsiveness in human hypertension is dependent on oxygen free radical impairment of nitric oxide activity. *Circulation* 2000; 102:552-557.
 50. **Souza HP, Souza LC, Anastacio VM, et al.** Vascular oxidant stress early after balloon injury: evidence for increased NAD(P)H oxidoreductase activity. *Free Radic Biol Med* 2000; 28:1232-1242.
 51. **Azumi H, Inoue N, Ohashi Y, et al.** Superoxide generation in directional coronary atherectomy specimens of patients with angina pectoris: important role of NAD(P)H oxidase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22:1838-1844.
 52. **Gerritsen T, Waisman HA.** Homocystinuria, an error in the metabolism of methionin. *Pediatrics* 1964; 33:413-420.
 53. **McCully KS.** Vascular pathology of homocysteinemia: implication for the pathogenesis of arteriosclerosis. *Am J Pathol* 1969; 56:111-128.
 54. **Boushey CJ, Beresford SA, Omenn GS, et al.** A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. Probable benefits of increasing folic acid intakes. *JAMA* 1995; 274:1049-1057.
 55. **Thambyrajah J, Townend JN.** Homocysteine and atherothrombosis-mechanism for injury. *Eur Heart J* 2000; 21:967-974.
 56. **Hajjar KA.** Homocysteine: a sulphorous fire. *J Clin Invest* 2001; 107:663-664.
 57. **Stephens NG, Parsons A, Schofield PM, et al.** Randomised controlled trial of vitamin E in patients with coronary disease: Cambridge Heart Antioxidant Study (CHAOS). *Lancet* 1996; 347:781-786.
 58. **Azen SP, Qian D, Mack WJ, et al.** Effect of supplementary antioxidant vitamin intake on carotid arterial wall intima-media thickness in a controlled clinical trial of cholesterol lowering. *Circulation* 1996; 94:2369-2372.
 59. **Sochman J, Vrbska J, Musilova B, et al.** Infarct Size Limitation: acute N-acetylcysteine defense (ISLAND trial): preliminary analysis and report after the first 30 patients. *Clin Cardiol* 1996; 19:94-100.
 60. **Yokoi H, Daida H, Kuwabara Y, et al.** Effectiveness of an antioxidant in preventing restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty: the Probuocol Angioplasty Restenosis Trial. *J Am Coll Cardiol* 1997; 30:855-862.
 61. **Ardissino D, Merlini PA, Savonitto S, et al.** Effect of transdermal nitroglycerin or N-acetylcysteine, or both, in the long-term treatment of unstable angina pectoris. *J Am Coll Cardiol* 1997; 29:941-947.
 62. **Rapola JM, Virtamo J, Ripatti S, et al.** Randomised trial of alpha-tocopherol and beta-carotene supplements on incidence of major coronary events in men with previous myocardial infarction. *Lancet* 1997; 349:1715-1720.
 63. **GISSI-Prevenzione Investigators.** Dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin E after myocardial infarction: results of the GISSI Prevenzione trial. *Lancet* 1999; 354:447-455.
 64. **Boaz M, Smetana S, Weinstein T, et al.** Secondary prevention with antioxidants of cardiovascular disease in endstage renal disease (SPACE): randomized placebo-controlled trial. *Lancet* 2000; 356:1213-1218.
 65. **Heart Protection Study Collaborative Group.** MCR/BHF Heart Protection Study of antioxidant vitamin supplementation in 20,536 high-risk individuals: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2002; 360:23-33.
 66. **Teipel M, van der Giet M, Statz M, et al.** The antioxidant acetylcysteine reduces cardiovascular events in patients with end-stage renal failure: a randomized, controlled trial. *Circulation* 2003; 107:992-995.
 67. **Tunstall-Pedoe H, Kuulasmaa K, Amouyel P, et al.** Myocardial infarction and coronary deaths in the World Health Organization MONICA Project. Registration procedures, event rates, and case-fatality rates in 38 populations from 21 countries in four continents. *Circulation* 1994; 90:583-612.
 68. **Kushi LH, Folsom AR, Prineas RJ, et al.** Dietary antioxidant vitamins and death from coronary heart disease in postmenopausal women. *N Engl J Med* 1996; 334:1156-1162.
 69. **Cotgreave IA.** N-acetylcysteine: pharmacological considerations and experimental and clinical applications. *Advances Pharmacology* 1997; 38:205-227.
 70. **Teipel M, van der Giet M, Schwarzfeld C, et al.** Prevention of radiographic-contrast-agent-induced reductions in renal function by acetylcysteine. *N Engl J Med* 2000; 343:180-184.
 71. **Arnelles DR, Stamler JS.** NO+, NO, and NO- donation by S-nitrosothiols: implications for regulation of physiological functions by S-nitrosylation and acceleration of disulfide formation. *Arch Biochem Biophys* 1995; 318:279-285.
 72. **Rodrigues AJ, Evora PR, Schaff HV.** Protective effect of N-acetylcysteine against oxygen radical-mediated coronary artery injury. *Braz J Med Biol Res* 2004; 37:1215-1224.
 73. **Lopez BL, Snyder JW, Birenbaum DS, et al.** N-acetylcysteine enhances endothelium-dependent vasorelaxation in the isolated rat mesenteric artery. *Ann Emerg Med* 1998; 32:405-410.
 74. **De Mattia G, Bravi MC, Laurienti O, et al.** Reduction of oxidative stress by oral N-acetyl-L-cysteine treatment decreases plasma soluble vascular cell adhesion molecule-1 concentrations in non-obese, non-dyslipidaemic, normotensive, patients with non-insulin-dependent diabetes. *Diabetologia* 1998; 41:1392-1396.
 75. **Horowitz JD, Antman EM, Lorell BH, et al.** Potentiation of

the cardiovascular effects of nitroglycerin by N-acetylcysteine. *Circulation* 1983; 68:1247-1253.

76. Torresi J, Horowitz JD, Dusting GJ. Prevention and reversal of tolerance to nitroglycerine

with N-acetylcysteine. *J Cardiovasc Pharmacol* 1985; 7:777-783.

77. Loscalzo J. N-Acetylcysteine potentiates inhibition of platelet aggregation by nitroglycerin. *J Clin Invest* 1985; 76:703-708.

78. Stamler J, Mendelsohn ME, Amarante P, et al. N-acetylcysteine potentiates platelet inhibition by endothelium-derived relaxing factor. *Circ Res* 1989; 65:789-795.