



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

Scuola di Dottorato in Medicina e Chirurgia
Corso di Dottorato in Scienze Biomediche
Coordinatore: Prof. Andrea Giacometti

**Impatto della supplementazione
con Ubiquinolo sulla funzione endoteliale
in soggetti a rischio di sviluppare
patologie cardiovascolari:
studio clinico spontaneo, in doppio cieco,
randomizzato, controllato con placebo,
a gruppi paralleli**

Tutor: Chiar.ma
Prof.ssa Laura Mazzanti

Dottorando:
Dott. Jacopo Sabbatinelli

XXX Ciclo
Triennio Accademico 2014/2017

INDICE

1.	ABSTRACT	1
1.1	Italiano	1
1.2	Inglese.....	2
2.	INTRODUZIONE	4
2.1	Misure di prevenzione delle malattie cardiovascolari	4
2.2	Dislipidemia e rischio cardiovascolare	11
2.3	L'aterosclerosi	18
2.4	Funzione e disfunzione endoteliale	28
2.5	Determinazione della funzione endoteliale	33
2.6	Flow-mediated dilation dell'arteria brachiale.....	37
2.7	Disfunzione endoteliale e rischio cardiovascolare	49
2.8	Il Coenzima Q10	53
3.	OBIETTIVI DELLO STUDIO	67
3.1	Endpoint primario	67
3.2	Endpoint secondari.....	67
4.	SOGGETTI E METODI.....	69
4.1	Disegno dello studio	69
4.2	Selezione e ritiro dei soggetti	70
4.3	Randomizzazione e cieco.....	74

4.4	Prodotto in studio	75
4.5	Valutazione degli endpoint primari e secondari	76
4.6	Deviazioni e violazioni del protocollo	82
4.7	Raccolta e gestione dei dati	84
4.8	Sicurezza	85
4.9	Considerazioni statistiche	86
5.	RISULTATI.....	88
5.1	Caratteristiche della popolazione in studio	88
5.2	Endpoint primario	89
5.3	Endpoint secondari.....	89
5.4	Correlazioni statistiche tra endpoint ed altre variabili in studio	91
6.	DISCUSSIONE	93
6.1	Analisi dei risultati.....	93
6.2	Considerazioni metodologiche	97
6.3	Limiti dello studio	99
6.4	Implicazioni cliniche ed ulteriori sviluppi	100
6.5	Conclusione.....	101
	BIBLIOGRAFIA	102
	FIGURE E TABELLE	121
	RINGRAZIAMENTI.....	146

1. ABSTRACT

1.1 Italiano

La maggior parte dei fattori di rischio cardiovascolari si traduce in un'aumentata produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), che a loro volta causano disfunzione endoteliale riducendo la biodisponibilità del mediatore vasodilatante ossido nitrico (NO). È noto che la supplementazione con Coenzima Q10 (CoQ10) migliora la performance cardiaca nello scompenso congestizio e nella cardiopatia ischemica, ed inoltre diminuisce significativamente la pressione arteriosa.

Un trial clinico in doppio-cieco, randomizzato, a gruppi paralleli, è stato condotto su 51 soggetti con rischio cardiovascolare moderato e disfunzione endoteliale per comprendere gli effetti della supplementazione con ubiquinolo sulla funzione endoteliale, misurata attraverso la determinazione ecografica non invasiva della flow-mediated dilation (FMD). I soggetti sono stati randomizzati in due gruppi di trattamento (ubichinolo, 100 mg o 200 mg/die) e un gruppo placebo. Durante ciascuna visita (T0, 4 e 8 settimane), sono stati misurati pressione arteriosa e FMD, parametri sieroematici (compreso il profilo lipidico), livelli plasmatici di CoQ10 ossidato/ridotto, NO e perossinitrito.

La somministrazione di ubiquinolo ha aumentato fortemente i livelli plasmatici di CoQ10 totale e ridotto. I soggetti assegnati ad entrambi i gruppi di trattamento hanno mostrato un

incremento nella FMD, senza differenze significative tra i due dosaggi. Tuttavia, in seguito all'analisi di biodisponibilità plasmatica di CoQ10, è stata dimostrata una relazione positiva tra l'incremento di FMD e il miglioramento dello stato ossidativo del CoQ10. Nessuna variazione significativa del profilo lipidico è stata riscontrata nei soggetti trattati. Un aumento dose-dipendente dei livelli plasmatici di NO è stato osservato nei soggetti trattati dopo 8 settimane. Esiste una correlazione positiva tra FMD e livelli di NO e, dunque, tra questi ultimi e la funzione endoteliale.

La FMD e lo stato ossidativo plasmatico migliorano significativamente dopo somministrazione di ubiquinolo. La biodisponibilità dell'ubichinolo si correla positivamente ai miglioramenti della FMD. Inoltre, l'influenza positiva della supplementazione con CoQ10 è indipendente dal profilo lipidico plasmatico, suggerendo un possibile effetto diretto dell'ubichinolo sulle cellule endoteliali.

1.2 Inglese

Most of the major cardiovascular risk factors are characterized by an increased production of reactive oxygen species (ROS), leading to endothelial dysfunction through breakdown of the vasodilating compound nitric oxide (NO). Supplementation with Coenzyme Q10 (CoQ10) positively affects heart performance in congestive heart failure and ischemic heart disease, along with a significant blood pressure lowering effect.

To understand the effects of ubiquinol supplementation on endothelial function, measured through non-invasive ultrasonographic assessment of flow-mediated dilation (FMD), a double-blind, randomized, parallel-groups clinical trial was carried out on 51 subjects with moderate cardiovascular risk and endothelial dysfunction. Subjects were randomized to

receive ubiquinol, 100 or 200 mg daily, or placebo. During each visit (T0, 4-weeks, 8-weeks) blood pressure, FMD, hematologic parameters (including lipid profile), reduced/oxidized CoQ10 levels, NO and peroxynitrite plasma levels were evaluated.

Ubiquinol administration strongly improved total and reduced CoQ10 plasma levels. Subjects assigned to both treatment groups showed an increased FMD compared with subjects in placebo group, with no significant difference between the two dosages. However, after CoQ10 plasma bioavailability analysis, a positive relationship between FMD increases and CoQ10 oxidative status improvements was demonstrated. No significant change in lipid profile was observed in treated subjects. A significant dose-dependent increase in NO plasma levels was observed in treated subjects after T2. NO plasma levels are positively related to FMD and, thus, to endothelial function.

FMD and plasma oxidative status are significantly improved following administration of ubiquinol. Bioavailability of ubiquinol is positively correlated with FMD improvements. Positive influence of CoQ10 supplementation is independent from plasma lipid profile, suggesting a direct effect of ubiquinol on endothelial cells.

2. INTRODUZIONE

La prevenzione delle malattie cardiovascolari (CVD) si basa sulla stima del rischio cardiovascolare globale, mirata a stratificare la popolazione sulla base della probabilità di sviluppare manifestazioni di malattia in un determinato arco di tempo [1]. Una metodica di screening efficace dovrebbe essere economica, relativamente non invasiva e riproducibile su larga scala. Le misure di screening dovrebbero rappresentare un valido strumento atto a predire il rischio di eventi fatali in pazienti con malattia nota e, idealmente, in soggetti sani.

L'individuazione di nuovi fattori di rischio emergenti, spesso non inclusi nei modelli tradizionali di stima del rischio cardiovascolare, rappresenta una sfida per la comunità scientifica. Di pari importanza sono lo sviluppo e l'adozione di misure di prevenzione primaria atte a contenere l'impatto delle patologie cardiovascolari sulla salute pubblica.

2.1 Misure di prevenzione delle malattie cardiovascolari

2.1.1 L'impatto delle malattie cardiovascolari

Nel continente europeo, le CVD rappresentano il 48% delle cause di morte e provocano ogni anno più di 4.3 milioni di decessi, di cui circa 800.000 in soggetti al di sotto dei 65 anni. La cardiopatia ischemica, responsabile di un decesso su 5, è la causa di morte più comune in

Europa, seguita dagli eventi cerebrovascolari [2]. La prevalenza delle CVD riconosce notevoli variazioni geografiche, con un chiaro gradiente da nord-est a sud-ovest nel tasso di mortalità standardizzato per età. In particolare, i paesi dell'Europa centrale ed orientale mostrano una mortalità più elevata rispetto ai paesi occidentali; i tassi di mortalità più bassi sono riscontrati in Francia, Portogallo, Italia, Spagna, Svizzera e Paesi Bassi. Da notare sono anche importanti variazioni nel tempo: storicamente, infatti, i Paesi del bacino del Mediterraneo mostravano un rischio cardiovascolare marcatamente più basso rispetto ai Paesi dell'Europa settentrionale ed orientale. Tuttavia, tali differenze si sono progressivamente assottigliate in seguito alla riduzione della mortalità in questi ultimi [3, 4].

I ricercatori hanno impiegato modelli epidemiologici di complessità variabile per giustificare la netta diminuzione della mortalità cardiovascolare negli ultimi decenni. I progressi più significativi sono stati compiuti nel trattamento delle sindromi coronariche acute, dell'ipertensione arteriosa e dello scompenso cardiaco, insieme all'implementazione di valide strategie di prevenzione secondaria. La maggioranza degli studi epidemiologici concorda sul fatto che la riduzione della mortalità sia dovuta principalmente ad interventi mirati a correggere i fattori di rischio piuttosto che al trattamento delle patologie che ne conseguono. Un contributo importante ma di entità non nota è sicuramente ascrivibile a cambiamenti nei fattori psicologici connessi all'ambiente lavorativo e alle interazioni sociali [5].

Sebbene la mortalità per CVD sia notevolmente diminuita in molti Paesi europei, lo stesso non si può affermare per la morbilità. Infatti, i tassi di dimissione ospedaliera per patologia cardiovascolare non diminuiscono nella stessa misura della mortalità. Le CVD comportano disabilità di grado variabile nei soggetti affetti e contribuiscono ad una quota maggioritaria della spesa per la salute pubblica. La prevalenza delle CVD sta crescendo sia per via del miglioramento delle strategie terapeutiche, sia per l'aumento dell'aspettativa di vita media.

Sulla base di queste considerazioni, è possibile affermare che le CVD rimarranno per decenni il maggior determinante di malattia nel mondo occidentale [6].

2.1.2 I fattori di rischio cardiovascolare tradizionali

È stato ampiamente dimostrato che esiste una relazione tra l'insorgenza di CVD e alcuni fattori di rischio legati agli stili di vita, che possono influenzare lo sviluppo e la progressione di malattia prima e dopo il verificarsi di un evento clinicamente rilevante [7].

Il concetto di rischio cardiovascolare globale, menzionato per la prima volta nelle linee guida europee del 1994, riflette a pieno l'eziologia multifattoriale delle CVD e riconosce il ruolo sinergico dei fattori di rischio, quando presenti contemporaneamente in uno stesso individuo. Per questo motivo, il trattamento dei fattori di rischio deve essere sempre mirato alla riduzione del rischio cardiovascolare globale piuttosto che alla correzione del singolo fattore [8].

La necessità di sviluppare interventi in grado di avere un impatto positivo sull'insieme dei fattori di rischio cardiovascolari ha indotto numerosi gruppi a condurre studi epidemiologici su grandi popolazioni al fine di individuare sistemi di valutazione del rischio applicabili su scala globale.

La Società Europea di Cardiologia (ESC, European Society of Cardiology) ha sviluppato un sistema di valutazione del rischio denominato SCORE (Systematic COronary Risk Evaluation). Lo SCORE si affianca all'analogo sistema nato dal Framingham Study statunitense, che tuttavia presenta alcuni limiti di applicabilità in quanto basato su una ristretta popolazione nordamericana [9].

La predisposizione genetica ha un contributo importante nello sviluppo delle CVD. Per questo motivo, una dettagliata anamnesi familiare di malattie coronariche e, più in genere, su base aterosclerotica, dovrebbe essere parte della valutazione clinica di tutti i pazienti con CVD e degli individui ad alto rischio. Ciononostante, fatta eccezione per alcuni rari casi, l'influenza della predisposizione familiare non rientra tra i fattori di rischio più forti [10].

Vi sono forti evidenze scientifiche a supporto del ruolo del fumo di sigaretta, della sedentarietà, di fattori nutrizionali e di fattori psicosociali nello sviluppo delle CVD. Nello studio INTERHEART, il 70% dei casi di primo infarto miocardico possono essere ricondotti al fumo e alla dislipidemia, e fino al 90% dei casi possono essere attribuiti ad una lista di nove fattori di rischio facilmente identificabili e modificabili [11]:

- Rapporto ApoB/ApoA1
- Fumo di sigaretta
- Ipertensione arteriosa
- Diabete
- Obesità addominale
- Fattori psicosociali
- Sedentarietà
- Scarso consumo di frutta e verdura
- Scarso consumo di alcol

Oltre ai sopracitati fattori di rischio modificabili, è necessario fare menzione del ruolo dei fattori di rischio non modificabili, età e genere. L'età avanzata rappresenta il più importante predittore individuale di CVD. Anche se l'età di per sé non causa CVD, questa riflette

l'insieme dei fattori di rischio accumulati con l'invecchiamento. Per quanto riguarda le differenze di genere, queste sono particolarmente evidenti per la cardiopatia ischemica: gli uomini hanno un rischio pari a 4-5 volte superiore rispetto alle donne. Questa sproporzione si attenua con l'avanzare dell'età, ma rimane comunque presente fino all'età di 85 anni. Simili differenze di genere sono presenti, seppur meno marcate, anche per ciò che concerne l'ictus [2]. Il minor rischio cardiovascolare osservato nelle donne è riconducibile all'azione protettiva esercitata dagli estrogeni. Tuttavia, i trial clinici eseguiti per valutare gli effetti cardioprotettivi della terapia ormonale hanno dato risultati contrastanti [12, 13]. È noto, infatti, che gli estrogeni esercitano numerose azioni opposte: da una parte rallentano le fasi precoci dell'aterosclerosi attraverso il loro effetto benefico sul profilo lipidico e sulla funzione endoteliale, dall'altra sono in grado di innescare eventi coronarici acuti attraverso meccanismi protrombotici e proinfiammatori.

2.1.3 La valutazione del rischio cardiovascolare globale

La stima degli effetti combinati sulla mortalità cardiovascolare di molteplici fattori di rischio è di gran lunga più complessa della valutazione dei singoli fattori di rischio. Sono state redatte diverse tipologie di tabelle di rischio per permettere al clinico una rapida ed accurata valutazione del rischio cardiovascolare, che possa costituire un valido supporto nelle scelte terapeutiche. Queste utilizzano l'età, il genere, l'abitudine tabagica, il colesterolo totale e la pressione sistolica per stimare il rischio di eventi cardiovascolari nei 10 anni successivi.

La tabella di rischio ad oggi utilizzata nelle linee guida dell'ESC è la SCORE (Figura A) [1]. Questo sistema di stima del rischio deriva da 12 studi di coorte Europei e comprende più di 200.000 soggetti, 3 milioni di anni-persona di osservazione e più di 7000 eventi cardiovascolari fatali. Il sistema SCORE può essere impiegato solo nei soggetti al di sotto dei

65 anni senza CVD nota. I soggetti con malattia aterosclerotica conclamata sono automaticamente considerati ad alto rischio e devono essere trattati di conseguenza.

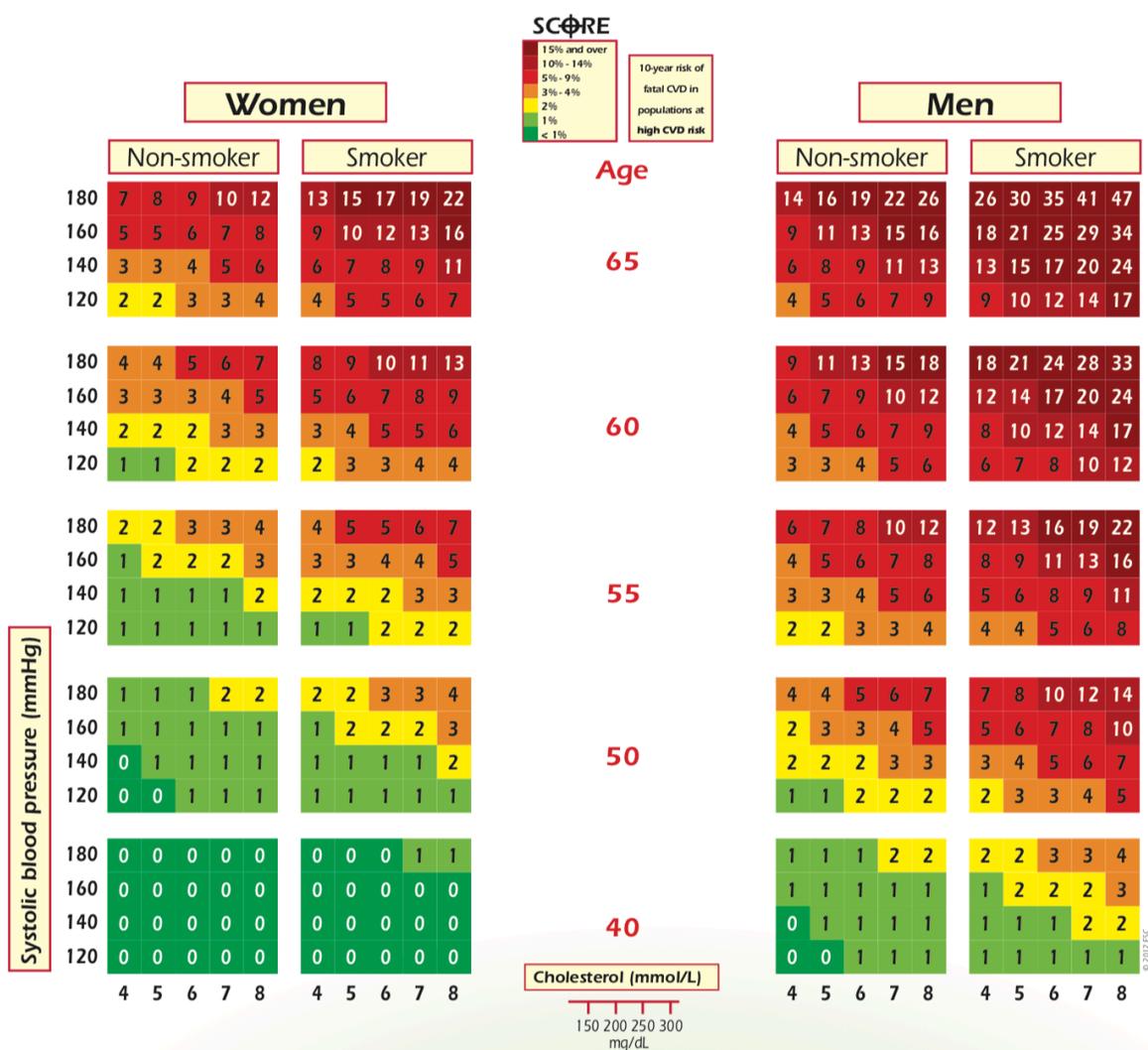


Figura A. Tabella SCORE: rischio a 10 anni di eventi cardiovascolari fatali nelle popolazioni a basso rischio (inclusa l'Italia), da *European Guidelines on CVD Prevention in Clinical Practice*, European Heart Journal (2012) 33, 1635–1701

La tabella SCORE ha molteplici funzioni:

- La stima del rischio di mortalità per CVD nei successivi 10 anni può essere desunta dalla semplice lettura della tabella;

- Il rischio relativo può essere rapidamente stimato comparando le celle nello stesso range di età;
- La tabella può essere utilizzata per fornire indicazioni sugli effetti del passaggio da una categoria di rischio all'altra, ad esempio per un soggetto che smette di fumare o che interviene sugli altri fattori di rischio;
- La tabella può essere seguita verticalmente per mostrare ai soggetti più giovani, tutti a basso rischio cardiovascolare, l'aumento del rischio con l'aumentare dell'età.

Agli individui con un basso rischio cardiovascolare dovrebbero essere offerti consigli sugli stili di vita adeguati a mantenere inalterato il loro livello di rischio. I soggetti con uno SCORE maggiore o uguale a 5% devono essere considerati ad alto rischio. Allo stesso modo devono essere considerati i soggetti che hanno:

- Livelli considerevolmente elevati di singoli fattori rischio, ad esempio pressione arteriosa >180/110 mmHg in singola rilevazione o cronicamente >160/110 mmHg;
- Colesterolo totale > 320 mg/dl;
- Colesterolo LDL > 240 mg/dl;
- Diabete mellito.

In accordo con quanto stabilito dalle linee guida dell'ESC, la stratificazione del rischio così ottenuta guida le strategie terapeutiche e di prevenzione primaria di diverse condizioni vascolari, incluse dislipidemia e cardiopatia ischemica.

2.2 Dislipidemia e rischio cardiovascolare

Le lipoproteine sono complessi di lipidi e proteine essenziali per il trasporto di colesterolo, trigliceridi e vitamine liposolubili [14]. In passato, il trattamento dei disordini delle lipoproteine era a carico di medici specializzati nel trattamento delle dislipidemie. Ad oggi, la dimostrazione dell'effetto positivo della terapia ipolipemizzante in termini di riduzione del rischio cardiovascolare globale ha fatto sì che la diagnosi e il trattamento delle dislipidemie sia di pertinenza internistica. Il numero di individui candidati alla terapia ipolipemizzante è in continuo incremento [15]. Lo sviluppo di farmaci sicuri, efficaci e ben tollerati ha contribuito enormemente all'ampliamento delle opzioni terapeutiche a disposizione del medico per il trattamento delle dislipidemie.

2.2.1 Classificazione delle dislipidemie

Fenotipo	I	IIa	IIb	III	IV	V
Lipoproteina predominante	Chilomicroni	LDL	LDL e VLDL	Chilomicroni e VLDL remnant	VLDL	Chilomicroni e VLDL
Trigliceridi	+++	N	+	++	++	+++
Colesterolo totale	+	+++	++	++	N/+	++
Colesterolo LDL	-	+++	++	-	-	-
Colesterolo HDL	---	N/-	-	N	--	---
Aspetto del plasma	Lattescente	Chiaro	Chiaro	Torbido	Torbido	Lattescente
Xantomi	Eruttivi	Tendinei e tuberosi	Assenti	Palmari, tuberoeruttivi	Assenti	Eruttivi
Pancreatite	+++	Assente	Assente	Assente	Assente	+++
Aterosclerosi	Assente	+++	+++	+++	+/-	+/-
Deficit molecolari	LDL e ApoC-II	Recettore LDL, PCSK9	Vari	ApoE	ApoA-V	ApoA-V

Tabella A. Classificazione delle dislipidemie secondo Fredrickson. N, normale.

Fredrickson e Levy classificarono le dislipidemie a seconda del tipo di lipoproteine che si accumulano nel sangue [16]. Tale sistema di classificazione è stato in seguito integrato con una classificazione legata all'eziologia e alla fisiopatologia delle dislipidemie. Una serie di condizioni genetiche sono associate all'accumulo plasmatico di specifiche classi di lipoproteine (Tabella A).

Alle dislipidemie primarie, che riconoscono specifiche cause genetiche, si affiancano dislipidemie secondarie, riscontrate in una vasta gamma di patologie (Tabella B).

Classe di lipoproteina alterata	Tipo di alterazione	Cause
LDL	Elevate	Ipotiroidismo, sindrome nefrosica, colestasi, porfiria acuta intermittente, anoressia nervosa, epatoma, farmaci (tiazidi, ciclosporina, carbamazepina).
	Ridotte	Epatopatia severa, malassorbimento, malnutrizione, malattia di Gaucher, malattie infettive croniche, ipertiroidismo.
HDL	Elevate	Alcol, esercizio fisico, farmaci (estrogeni)
	Ridotte	Fumo di sigaretta, diabete mellito di tipo 2, obesità, malnutrizione, malattia di Gaucher, farmaci (steroidi anabolizzanti, beta bloccanti).
VLDL	Elevate	Obesità, diabete mellito di tipo 2, glicogenosi, epatite, alcol, insufficienza renale, sepsi, stress, sindrome di Cushing, gravidanza, acromegalia, lipodistrofia, farmaci (estrogeni, beta bloccanti, glucocorticoidi, acido retinoico, resine leganti gli acidi biliari).
IDL	Elevate	Mieloma multiplo, gammopatia monoclonale, malattie autoimmuni, ipotiroidismo.
Chilomicroni	Elevati	Malattie autoimmuni, diabete mellito di tipo 2.
Lipoproteina (a)	Elevata	Insufficienza renale, infiammazione, menopausa, ipotiroidismo, acromegalia, farmaci (ormone della crescita, isotretinoina).

Tabella B. Forme secondarie di dislipidemia

Di particolare importanza sono le dislipidemie che si verificano in corso di obesità, diabete mellito, nefropatie, epatopatie, alcolismo cronico ed ipotiroidismo. In particolare, l'obesità si associa spesso a dislipidemia [17]. L'aumento della massa adipocitaria e la concomitante

insulinoresistenza hanno molteplici effetti sul metabolismo lipidico. Il trasporto di acidi grassi liberi dal tessuto adiposo al fegato è aumentato in corso di obesità, con conseguente formazione di trigliceridi secreti in circolo in forma di VLDL [18]. Inoltre, l'iperinsulinemia stimola la sintesi di acidi grassi a livello epatico [19]. A ciò si accompagna l'aumentato apporto dietetico di carboidrati semplici, che comporta aumentata produzione epatica di VLDL e LDL [20]. Inoltre, i livelli di colesterolo HDL tendono ad essere più bassi nell'obesità a causa della ridotta lipolisi [21]. Il calo ponderale si associa frequentemente ad una diminuzione dei livelli circolanti di VLDL e LDL, con un concomitante incremento dei livelli di colesterolo HDL [22].

2.2.2 Diagnosi delle dislipidemie: il profilo lipidico

Le linee guida Adult Treatment Panel III (ATPIII) del *National Heart, Lung and Blood Institute* del 2001 raccomandano che tutti gli adulti di età superiore ai 20 anni debbano misurare ogni 5 anni i livelli plasmatici di colesterolo, trigliceridi, colesterolo HDL e LDL dopo un digiuno di 12 ore [23]. Nella maggior parte dei laboratori analisi, i livelli di colesterolo totale e trigliceridi vengono misurati con metodo enzimatico. Successivamente, vengono misurati i livelli di colesterolo HDL dopo precipitazione delle lipoproteine contenenti apoB (VLDL e LDL) [24]. I livelli di colesterolo LDL vengono stimati utilizzando la seguente equazione, nota come formula di Friedewald [25]:

$$\text{LDL-C} = \text{Colesterolo totale} - \text{HDL-C} - (\text{Trigliceridi} / 5)$$

(Il colesterolo VLDL è stimato dividendo il valore di trigliceridi per 5, riflettendo il rapporto colesterolo:trigliceridi nelle lipoproteine VLDL).

Questa formula è ragionevolmente accurata se applicata su campioni di plasma in cui i livelli di trigliceridi non superino i 200 mg/dl. In caso contrario, i livelli di colesterolo LDL devono

essere determinati direttamente sul plasma o stimati sottraendo il valore di HDL al colesterolo totale. Quest'ultima stima, che prende il nome di "colesterolo non-HDL", rappresenta un target secondario di terapia particolarmente utile nei soggetti con ipertrigliceridemia [26]. La successiva valutazione clinica dei pazienti e il trattamento delle dislipidemie si basa sui livelli plasmatici di colesterolo LDL (o non-HDL) e sulla valutazione del rischio cardiovascolare globale.

Il primo passo obbligatorio nella gestione del paziente con dislipidemia è la determinazione delle specifiche classi di lipoproteine che hanno subito un rialzo. Una volta che la dislipidemia è stata accuratamente classificata sul piano fenotipico mediante la classificazione di Friedrickson, dovrebbero essere escluse eventuali cause di dislipidemia secondaria. In particolare, è necessario misurare la glicemia a digiuno nei pazienti con ipertrigliceridemia, determinare le funzionalità renale, epatica e tiroidea e indagare le abitudini alimentari, con particolare attenzione al consumo di alcol. Uno stile di vita sedentario, l'obesità e il fumo di sigaretta si associano a bassi livelli di colesterolo HDL; per questo motivo i pazienti dovrebbe ricevere adeguato supporto per questi fattori di rischio [27].

Una volta escluse le cause di dislipidemia secondaria, gli sforzi dovrebbero essere rivolti alla diagnosi del disturbo primario del metabolismo lipidico, dal momento che l'eziologia sottostante ha un effetto significativo sulle probabilità di sviluppare cardiopatia ischemica, sulla risposta alla terapia e sulla gestione di eventuali familiari del paziente affetti da disordini simili. Spesso, la diagnosi passa attraverso un'anamnesi dettagliata e, in alcuni casi, la determinazione del profilo lipidico dei membri della famiglia del paziente.

2.2.3 Trattamento delle dislipidemie: strategie ed obiettivi

Le linee guida elaborate dalle società scientifiche che si occupano di prevenzione cardiovascolare concordano sulla necessità di individuare dei livelli auspicabili di colesterolo LDL individualizzati sulla base dei fattori di rischio presenti nei singoli soggetti. Non è corretto, pertanto, parlare di livelli di riferimento per le singole classi di lipoproteine da applicare a tutta la popolazione. Questa considerazione deriva dal concetto di rischio cardiovascolare globale, abbondantemente trattato in precedenza, secondo il quale non sono tanto singoli fattori a determinare il rischio di eventi cardiovascolari fatali, quanto l'interazione tra di essi [27].

Le anomalie del profilo lipidico rientrano tra i fattori di rischio più influenti nello sviluppo dell'aterosclerosi. Le linee guida dell'ESC del 2016 per il trattamento delle dislipidemie raccomandano fortemente di modulare l'intensità degli interventi preventivi e terapeutici sulla base del rischio cardiovascolare globale. Pertanto, gli obiettivi del trattamento dovrebbero essere più stringenti con l'aumentare del rischio da moderato ad alto e molto alto. Per ogni 40 mg/dl di riduzione nei livelli di colesterolo LDL, il rischio di mortalità e morbilità cardiovascolare si riduce del 22%. Dall'analisi della letteratura, una riduzione del colesterolo LDL a 70 mg/dl o una riduzione relativa almeno del 50% fornisce il migliore beneficio in termini di riduzione del rischio. Nella maggior parte dei pazienti, questo obiettivo è raggiungibile con una monoterapia. Tale obiettivo va perseguito fortemente in quei soggetti che mostrano un rischio cardiovascolare molto alto (SCORE > 10%). L'obiettivo del trattamento, in termini di colesterolemia LDL, nei soggetti ad alto rischio (SCORE compreso tra 5% e 10%) è invece di 100 mg/dl. I soggetti con un rischio cardiovascolare moderato (SCORE compreso tra 1% e 5%) mantenere dei livelli di colesterolo LDL inferiori a 130 mg/dl [27].

Il primo intervento terapeutico è mirato alla correzione degli stili di vita inadeguati, a partire dalla sedentarietà. L'intervento farmacologico va considerato nei soggetti ad alto rischio o in quelli in cui gli interventi non farmacologici non abbiano ottenuto i risultati desiderati. Gli interventi terapeutici raccomandati nelle diverse classi di rischio cardiovascolare sono riassunti nella tabella seguente, tratta dalle linee guida ESC per la gestione delle dislipidemie.

Total CV risk (SCORE) %	LDL-C levels				
	<70 mg/dL <1.8 mmol/L	70 to <100 mg/dL 1.8 to <2.5 mmol/L	100 to <155 mg/dL 2.5 to <4.0 mmol/L	155 to <190 mg/dL 4.0 to <4.9 mmol/L	>190 mg/dL >4.9 mmol/L
<1	No lipid intervention	No lipid intervention	Lifestyle intervention	Lifestyle intervention	Lifestyle intervention, consider drug if uncontrolled
Class ^a /Level ^b	I/C	I/C	I/C	I/C	IIa/A
≥1 to <5	Lifestyle intervention	Lifestyle intervention	Lifestyle intervention, consider drug if uncontrolled	Lifestyle intervention, consider drug if uncontrolled	Lifestyle intervention, consider drug if uncontrolled
Class ^a /Level ^b	I/C	I/C	IIa/A	IIa/A	I/A
>5 to <10, or high risk	Lifestyle intervention, consider drug [*]	Lifestyle intervention, consider drug [*]	Lifestyle intervention and immediate drug intervention	Lifestyle intervention and immediate drug intervention	Lifestyle intervention and immediate drug intervention
Class ^a /Level ^b	IIa/A	IIa/A	IIa/A	I/A	I/A
≥10 or very high risk	Lifestyle intervention, consider drug [*]	Lifestyle intervention and immediate drug intervention			
Class ^a /Level ^b	IIa/A	IIa/A	I/A	I/A	I/A

^{*}In patients with MI, statin therapy should be considered irrespective of LDL-C levels.^{13,14}
^aClass of recommendation
^bLevel of evidence. References to level A: 15–41.
CV = cardiovascular; LDL-C = low-density lipoprotein-cholesterol; MI = myocardial infarction.

Tabella C. Strategie terapeutiche in funzione del rischio cardiovascolare globale e dei livelli di colesterolo LDL. SCORE, Systematic Coronary Risk Estimation.

Il trattamento non farmacologico delle dislipidemie comprende modificazioni dietetiche, in particolare per i pazienti con elevato colesterolo LDL, supplementi alimentari, ad esempio il riso rosso fermentato (che contiene lovastatina), calo ponderale ed esercizio fisico aerobico regolare [28].

La terapia farmacologica si avvale principalmente delle statine, farmaci inibitori dell'enzima 3-idrossi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) reduttasi. Le statine, inibendo la biosintesi di

colesterolo endogeno, aumentano la sintesi epatica di recettori per le LDL, portando ad un' aumentata rimozione delle LDL circolanti. Le statine attualmente disponibili differiscono per la loro potenza. Ad oggi, non esiste nessuna evidenza che le statine possano esercitare vantaggi aggiuntivi alla riduzione del colesterolo LDL e dei trigliceridi e ad un leggero incremento del colesterolo HDL. Le statine sono molto ben tollerate e possono essere assunte per via orale in monosomministrazione giornaliera [29]. Gli effetti avversi includono potenzialmente dispepsia, cefalea, astenia e dolori muscolari e articolari. Miopatia e rhabdomiolisi si verificano raramente in corso di trattamento con statine. Un'altra rara complicanza è l'epatopatia, motivo per il quale i pazienti in trattamento con statine dovrebbero effettuare un controllo annuale della funzionalità epatica [30]. Le statine possiedono un'elevata efficacia e un ottimo profilo di sicurezza; ciò le rende di gran lunga la classe di farmaci maggiormente impiegata per il trattamento delle dislipidemie [31].

Altre classi di farmaci, rivolte ai pazienti che hanno manifestato intolleranza alla terapia con statine o da utilizzare in combinazione a queste nel trattamento di particolari forme di dislipidemie, includono [32]:

- gli inibitori dell'assorbimento di colesterolo: ezetimibe;
- le resine sequestranti gli acidi biliari: colestiramina e colestipolo;
- la niacina, inibitore del trasporto degli acidi grassi non esterificati dal tessuto adiposo al fegato;
- i fibrati, agonisti di PPAR α , un fattore nucleare coinvolto nella regolazione del metabolismo lipidico
- gli acidi grassi omega-3, impiegati principalmente nel trattamento dell'ipertrigliceridemia.

La trattazione più approfondita dei singoli approcci terapeutici non rientra tra gli obiettivi della presente tesi.

2.3 L'aterosclerosi

Come già premesso, l'aterosclerosi rappresenta la causa principale di morte e di disabilità prematura nelle società sviluppate. Le previsioni attuali stimano che entro il 2020 le malattie cardiovascolari diventeranno il determinante principale di malattia a livello globale [33]. Sebbene i fattori di rischio sistemici sopra citati predispongano al suo sviluppo, l'aterosclerosi colpisce preferenzialmente alcune regioni del sistema circolatorio e ha diverse presentazioni cliniche che dipendono dal letto vascolare colpito. L'aterosclerosi delle coronarie causa comunemente infarto miocardico e angina pectoris. L'aterosclerosi delle arterie che irrorano il sistema nervoso centrale provocano ictus e ischemia cerebrale transitoria (TIA, transient ischemic attack). Nel circolo periferico, l'aterosclerosi causa claudicatio intermittens e gangrena, fino a compromettere irreversibilmente la vitalità degli arti. Il coinvolgimento della circolazione splanchnica può causare ischemia mesenterica. L'aterosclerosi può colpire i reni direttamente (es. stenosi dell'arteria renale) o come sito di ateroembolismo [34].

All'interno di uno specifico letto vascolare, le stenosi aterosclerotiche tendono ad avere carattere focale, di solito in regioni predisposte. Nel circolo coronarico, ad esempio, il tratto prossimale dell'arteria discendente anteriore di sinistra esibisce rappresenta un sito preferenziale di malattia aterosclerotica. In maniera simile, l'aterosclerosi colpisce le porzioni prossimali delle arterie renali e la biforcazione carotidea, nel tratto extracranico del circolo cerebrale. Infatti, le lesioni aterosclerotiche tendono a formarsi nei punti di ramificazione delle arterie, soggetti ad un flusso turbolento. Non tutte le manifestazioni

dell'aterosclerosi derivano da stenosi vascolare. Lo sviluppo di aneurismi, ad esempio, è un evento comune a livello aortico. In aggiunta alle stenosi focali, che limitano il flusso ematico in specifici siti, l'aterosclerosi non occlusiva dell'intima si verifica diffusamente nelle arterie affette, come dimostrato da studi ecografici intravascolari e postmortem [35].

L'aterogenesi, nella specie umana, si verifica tipicamente in un periodo di decenni. Lo sviluppo delle placche aterosclerotiche non ha un decorso lineare, bensì discontinuo, con periodi di relativa quiescenza interrotti da periodi di rapida evoluzione. Dopo un periodo silente generalmente prolungato, l'aterosclerosi può diventare clinicamente manifesta. Le espressioni cliniche dell'aterosclerosi possono essere croniche, come l'angina stabile e l'arteriopatia obliterante degli arti inferiori, o acute, quali l'infarto miocardico, l'ictus e la morte cardiaca improvvisa. In altri soggetti potrebbero non verificarsi manifestazioni cliniche nonostante la presenza di malattia aterosclerotica estesa all'esame postmortem [36].

2.3.1 Patogenesi dell'aterosclerosi

L'analisi sistematica dei risultati di studi sperimentali condotti su animali e sull'uomo suggeriscono che la stria lipidica rappresenti la lesione iniziale dell'aterosclerosi [37]. Queste lesioni precoci derivano da incrementi focali nel contenuto di lipoproteine nell'intima (Figura B). Questo accumulo di lipoproteine non deriva semplicemente da un'aumentata permeabilità endoteliale. Le lipoproteine si accumulano nell'intima delle arterie in seguito al loro legame con i costituenti della matrice extracellulare, aumentando la loro emivita all'interno della parete del vaso. Le lipoproteine si accumulano nello spazio extracellulare dell'intima delle arterie associandosi ai glicosamminoglicani, che ne rallentano la rimozione dalla parete vascolare. A questo livello, le lipoproteine possono andare incontro ad alterazioni ossidative. Numerose evidenze supportano il ruolo patogenetico dei prodotti di ossidazione delle lipoproteine nell'aterogenesi [38]. Le lipoproteine allontanate dagli

antiossidanti plasmatici possono essere particolarmente suscettibili all'ossidazione, dando origine ad idroperossidi, lisofosfolipidi, oxisteroli e prodotti aldeidici della perossidazione lipidica. Possono inoltre verificarsi alterazioni del corredo apoproteico in seguito a modificazioni degli amminoacidi o rottura dello scheletro proteico da parte, ad esempio, dell'acido ipocloroso prodotto dalla mieloperossidasi delle cellule infiammatorie che popolano la placca [39]. Le HDL modificate da questo meccanismo perdono la loro funzione di accettori di colesterolo e ciò spiega il collegamento esistente tra stress ossidativo e alterato trasporto inverso del colesterolo.

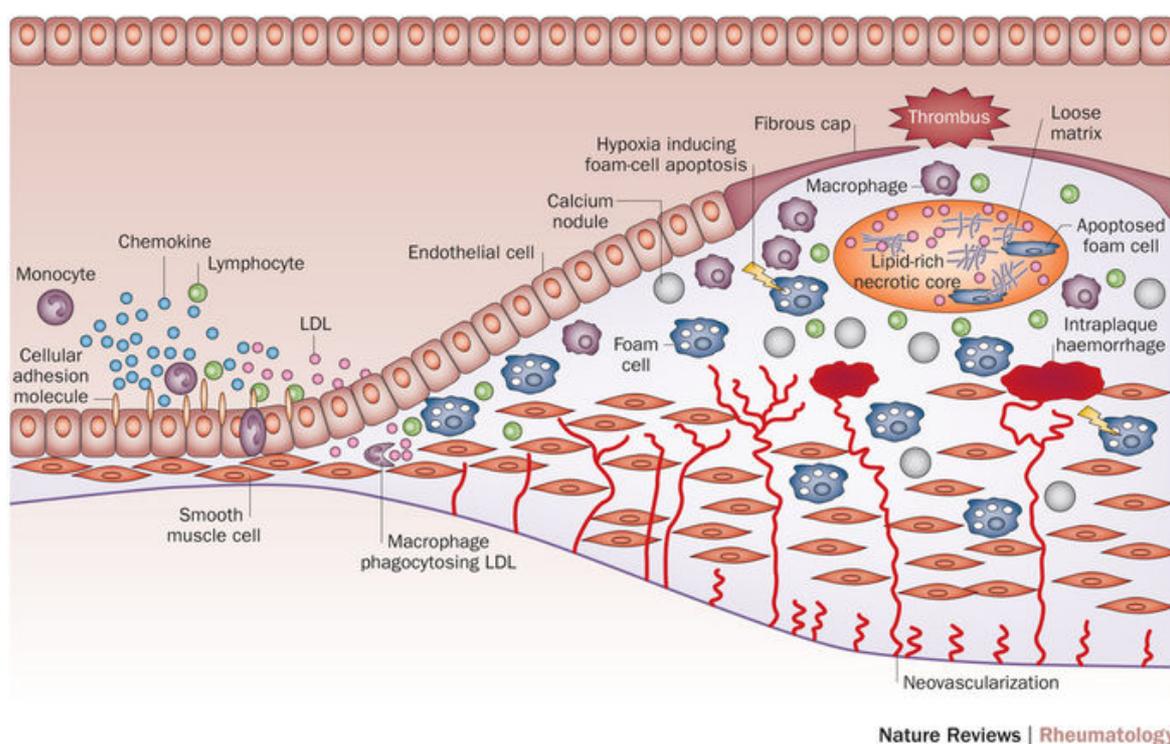


Figura B. Sviluppo della placca aterosclerotica. L'attivazione endoteliale conduce all'espressione di chemochine e di marker molecolari sulla superficie delle cellule endoteliali, che causa la migrazione e l'adesione delle cellule immunitarie, inclusi i monociti circolanti. Da *Atherosclerosis in rheumatoid arthritis: is it all about inflammation?*, Nature Reviews Rheumatology (2015) 11, 390-400

L'accumulo di leucociti caratterizza la formazione delle lesioni aterosclerotiche in fase precoce. Sin dal suo inizio, pertanto, l'aterogenesi coinvolge elementi infiammatori, un

processo in grado di fornire una teoria unificante della patogenesi di questa malattia [40]. Le cellule infiammatorie di più frequente riscontro nell'ateroma in evoluzione includono macrofagi di derivazione monocitaria e linfociti. Una serie di molecole di adesione e di recettori per i leucociti espressi sulla superficie endoteliale contribuiscono al reclutamento leucocitario nell'ateroma nascente. I costituenti delle LDL ossidate possono aumentare l'espressione di tali molecole. Il normale stress di parete (*shear stress*) dovuto al flusso laminare che si osserva nelle arterie sane aumenta l'espressione di NO e sopprime di norma l'espressione delle molecole che mediano l'adesione leucocitaria [41]. Per questo motivo, i siti prediletti per lo sviluppo delle lesioni aterosclerotiche sono le ramificazioni, che presentano un flusso ematico disturbato. L'esposizione delle cellule endoteliali allo shear stress da flusso laminare aumenta la trascrizione del Kruppel-like factor 2 (KLF2) e riduce l'espressione della proteina interagente con la tioredoxina (Txnip), la quale inibisce l'attività del composto antiossidante endogeno tioredoxina. Il KLF2 aumenta l'attività della eNOS, mentre i ridotti livelli di Txnip potenziano gli effetti della tioredoxina [42, 43]. Inoltre, lo shear stress esercita il suo ruolo protettivo stimolando le cellule endoteliali a produrre superossido dismutasi [44].

Una volta catturate sulla superficie delle cellule endoteliali da molecole di adesione, i monociti e i linfociti penetrano il monostrato endoteliale e si fermano nell'intima. Anche diverse citochine possono regolare l'espressione di molecole di adesione coinvolte nel reclutamento leucocitario, tra cui l'interleuchina 1 (IL-1) e il fattore di necrosi tumorale α (TNF- α) [45]. Dal momento che i prodotti di ossidazione delle lipoproteine possono indurre il rilascio di citochine dalla parete vascolare, questo meccanismo può fornire un ulteriore collegamento tra l'accumulo arterioso di lipoproteine e il reclutamento leucocitario.

Dopo essersi collocate all'interno della parete vascolare, i fagociti mononucleati si differenziano prima in macrofagi, poi in cellule schiumose, mediante un processo che

richiede l'uptake di lipoproteine tramite endocitosi mediata da recettore [46]. Si potrebbe supporre erroneamente che il recettore in questione sia quello classico per le LDL; tuttavia gli individui che mostrano un'espressione assente o difettiva di tale recettore (es. ipercolesterolemia familiare) hanno un elevato grado di aterosclerosi, con lesioni molto ricche in cellule schiumose. Diversi recettori "scavenger" espressi da macrofagi, invece, mediano l'endocitosi delle lipoproteine, preferenzialmente modificate [47].

2.3.2 Evoluzione dell'ateroma e insorgenza delle complicanze

Sebbene la stria lipidica preceda comunemente lo sviluppo di una più avanzata placca aterosclerotica, non tutte le strie lipidiche progrediscono in senso ateromatoso [48]. Normalmente, i fagociti mononucleati rimuovono le lipoproteine dalla lesione incipiente. Alcuni macrofagi infarciti di lipidi possono lasciare la parete arteriosa, diminuendone il contenuto lipidico. L'accumulo di lipidi e, con esso, la propensione allo sviluppo di ateroma, si verifica allorquando la capacità di rimozione dei macrofagi viene superata [49]. Anche il trasporto inverso del colesterolo da parte delle HDL contribuisce alla rimozione dei lipidi dalla placca. Il trasferimento del colesterolo dalle cellule alle HDL coinvolge molecole di superficie specializzate della famiglia ATP binding cassette (ABC). Il trasporto inverso del colesterolo mediato da questi trasportatori permette alle HDL cariche di colesterolo di tornare verso il fegato e di legarsi agli epatociti tramite il recettore scavenger B1. Successivamente gli epatociti metabolizzano il colesterolo ad acidi biliari escreti con la bile. Questa via di trasporto dai macrofagi agli epatociti contribuisce a spiegare parte delle azioni antiaterogeniche delle HDL [50].

Sulla base di queste considerazioni, si può affermare che i macrofagi giocano un ruolo fondamentale nell'equilibrio dell'accumulo lipidico nella parete vascolare in corso di aterosclerosi.

Alcune cellule schiumose particolarmente infarcite di lipidi possono andare incontro ad apoptosi. La morte di questi macrofagi porta alla formazione di un core ricco in lipidi nella placca aterosclerotica [51]. I macrofagi carichi di lipoproteine modificate possono sintetizzare citochine e fattori di crescita che innescano l'apoptosi e il differenziamento di ulteriori tipi cellulari. Mentre l'accumulo di cellule schiumose caratterizza la stria lipidica, la deposizione di tessuto fibroso caratterizza la più avanzata placca aterosclerotica. Le cellule muscolari lisce, responsabili di questo processo, vengono stimulate dai macrofagi a proliferare e a produrre nuova matrice extracellulare. Le citochine di più comune riscontro nella placca, tra cui IL-1 e TNF- α , possono indurre la produzione locale di fattori di crescita, tra cui il fattore di crescita di derivazione piastrinica (PDGF) e il fattore di crescita dei fibroblasti (FGF) [52]. Altre citochine derivate dai linfociti T attivati all'interno della lesione, come l'interferon γ (IFN- γ), può limitare la sintesi di alcune forme di collagene da parte delle cellule muscolari lisce. L'attivazione delle cellule muscolari lisce segna un punto critico di transizione tra un semplice accumulo di cellule schiumose e una lesione fibroadiposa [53].

In aggiunta ai mediatori sintetizzati in loco, i prodotti della coagulazione possono contribuire all'evoluzione dell'ateroma e all'insorgenza delle complicanze. Questo coinvolgimento giustifica l'uso del termine *aterotrombosi* per spiegare il forte collegamento tra aterosclerosi e trombosi. La formazione della stria lipidica comincia nel contesto di un endotelio morfologicamente intatto. Tuttavia, nelle strie lipidiche in fase avanzata, possono svilupparsi microscopiche soluzioni di continuità dell'endotelio. A questo livello, in seguito all'esposizione trombogenica della matrice cellulare, possono formarsi microtrombi ricchi in piastrine [54]. Le piastrine attivate rilasciano numerosi fattori che possono indurre un'ulteriore risposta fibrotica, tra cui PDGF e TGF- β [55, 56]. La trombina non solo genera fibrina durante la coagulazione, ma stimola anche recettori attivati dalle proteasi che inducono la migrazione, la proliferazione e l'attività delle cellule muscolari lisce [57]. Molti

di questi microtrombi intrarteriosi si risolvono senza manifestazioni cliniche in seguito a fibrinolisi locale, riassorbimento e riparazione endoteliale; altri possono portare a progressione della lesione data la loro azione stimolante sulle cellule muscolari lisce della media.

Con la progressione della lesione aterosclerotica, abbondanti plessi di microvasi si sviluppano in comunicazione con i *vasa vasorum* arteriosi [58, 59]. I neovasi possono contribuire all'insorgenza delle complicanze della lesione di diversi modi. Questi vasi forniscono un'abbondante superficie per il traffico leucocitario e può servire da porta di ingresso e uscita per i leucociti nell'ateroma [60]. I microvasi nella placca possono anche costituire un sito di emorragia intrapacca. In maniera simile alla retinopatia diabetica, i microvasi dell'ateroma sono molto friabili e pronti alla rottura. L'emorragia intrapacca può provocare trombosi in situ, con formazione locale di trombina, in grado di attivare le cellule muscolari lisce, come menzionato in precedenza. Le placche aterosclerotiche contengono spesso fibrina ed emosiderina, a dimostrazione della relativa frequenza di tali microemorragie [61].

Nelle placche aterosclerotiche si osserva anche un certo accumulo di calcio. Le proteine di normale riscontro nell'osso si localizzano anche nella lesione aterosclerotica (osteocalcina, osteopontina e proteine morfogeniche). La mineralizzazione delle placche aterosclerotiche mima molti aspetti della formazione ossea, anche in termini di secondi messaggeri e di fattori di trascrizione coinvolti [62, 63].

Anche le cellule muscolari lisce della placca aterosclerotica possono andare incontro ad apoptosi. Infatti, gli ateromi più complessi hanno spesso un carattere prevalentemente fibrosi, con relativamente scarsa cellularità. La scarsità di cellule muscolari lisce riflette la predominanza di mediatori citostatici quali TGF- β e IFN- γ [64]. Pertanto, durante

l'evoluzione della placca, un complesso equilibrio tra ingresso e fuoriuscita di lipoproteine e leucociti, proliferazione cellulare e apoptosi, produzione e rimodellamento di matrice extracellulare, calcificazione e neovascolarizzazione, contribuiscono alla formazione della lesione. Molteplici segnali, spesso in contrasto tra loro, regolano gli eventi cellulari descritti. Molti dei fattori correlati ai fattori di rischio cardiovascolari, tra cui quelli derivanti dalle lipoproteine, dal fumo di sigaretta e l'angiotensina II, provocano la sintesi di citochine proinfiammatorie e alterano il comportamento della parete vascolare [65].

2.3.3 Correlati clinici dell'aterosclerosi

Come già accennato in precedenza, gran parte degli ateriomi decorre asintomatica e non arriverà mai a causare manifestazioni cliniche. Numerosi pazienti con aterosclerosi diffusa possono morire per altre cause senza aver mai manifestato una complicanza legata all'aterosclerosi. Per comprendere le ragioni di tale variabilità nell'espressione clinica dell'aterosclerosi, è necessario fare alcune considerazioni sulle caratteristiche della placca.

Il rimodellamento arterioso durante la formazione dell'ateroma rappresenta un'importante determinante dell'evoluzione della lesione [66]. Durante la fase iniziale dello sviluppo dell'ateroma, la placca di norma si sviluppa all'esterno, in direzione abluminale. I vasi colpiti da aterosclerosi tendono ad aumentare di diametro, fenomeno noto come ingrandimento compensatorio. L'ateroma nascente non interferisce con il lume arterioso finché l'estensione della placca aterosclerotica non eccede il 40% circa dell'area delimitata dalla lamina elastica interna. Pertanto, durante gran parte della sua storia naturale, un ateroma non causerà stenosi [67].

Le stenosi in grado di limitare il flusso ematico si formano solo tardivamente e possono provocare angina da sforzo o *claudicatio intermittens*. Nel circolo coronarico e in altri

distretti, persino un'occlusione vascolare totale da parte di un ateroma non porta ad infarto. Lo stimolo ipossico derivante da ripetute *poussée* ischemiche induce caratteristicamente la formazione di vasi collaterali nel miocardio, attenuando le conseguenze dell'occlusione totale di una coronaria epicardica. Per contro, molte lesioni che causano sindromi coronariche del tipo angina instabile possono insorgere da placche aterosclerotiche che non producono una stenosi limitante il flusso. Tali lesioni possono presentare irregolarità minime del lume e non raggiungono criteri di significatività all'esame arteriografico. I trombi derivanti da tali lesioni non occlusive rendono conto della frequenza di infarto miocardico come manifestazione d'esordio della cardiopatia ischemica in almeno un terzo dei casi, in particolare in quei pazienti senza anamnesi precedente di angina stabile, sindrome causata dalle stenosi limitanti il flusso [60, 68].

Gli studi postmortem hanno permesso di elucidare il meccanismo alla base dell'instabilità delle placche che non causano stenosi critiche. Un'erosione superficiale dell'endotelio o una rottura di placca conclamata solitamente danno origine al trombo che causa angina instabile e/o infarto miocardico. Nel caso degli ateromi carotidei, un'ulcerazione più profonda può, con un meccanismo analogo, provocare attacchi ischemici cerebrali transitori. La rottura del cappuccio fibroso della placca permette il contatto tra i fattori di coagulazione ematici e il fattore tissutale, altamente trombogenico, espresso dalle cellule schiumose nel core lipidico. Se il trombo che si origina ha carattere occlusivo, si ha un'elevata probabilità di sviluppare infarto acuto del miocardio, specialmente in assenza di un circolo collaterale ben sviluppato che irrori i territori coinvolti. Ripetuti episodi di rottura di placca seguiti di guarigione spontanea accelerano la formazione di tessuto fibroso nel contesto della lesione, come risultato della riparazione del danno tissutale [69].

Non tutti gli ateromi esibiscono la stessa propensione alla rottura. Gli studi di anatomia patologica sulle lesioni che causano infarto del miocardio rivelano alcune caratteristiche

specifiche. Le placche che inducono la formazione di trombi potenzialmente fatali hanno cappucci fibrosi sottili, core lipidici relativamente estesi e un alto contenuto di macrofagi. In aggiunta, i pazienti con aterosclerosi attiva e sindromi coronariche acute mostrano segni di infiammazione disseminata. L'integrità del cappuccio fibroso della placca è regolata da numerosi mediatori dell'infiammazione [70]. Oltre ai summenzionati TGF- β e IFN- γ , le citochine derivate dai macrofagi attivati e dai linfociti T lesionali possono incrementare la produzione di enzimi proteolitici che degradano la matrice extracellulare del cappuccio fibroso. Pertanto, i mediatori dell'infiammazione possono compromettere la sintesi del collagene indispensabile per il mantenimento e la riparazione del cappuccio fibroso e innescare la degradazione delle macromolecole della matrice extracellulare, processo che indebolisce il rivestimento della placca e ne aumenta la suscettibilità alla rottura. A differenza delle placche che mostrano tali caratteristiche di vulnerabilità, quelle con una cospicua matrice extracellulare, con un cappuccio fibroso relativamente spesso e con uno scarso contenuto di fattore tissutale sembrano più resistenti alla rottura e meno propense a provocare trombosi [71].

In definitiva, le caratteristiche biologiche delle placche ateromatose, in aggiunta al grado di impegno luminale, influenzano le manifestazioni cliniche delle malattie cardiovascolari. Lo studio dell'aterogenesi fornirà nuovi elementi per comprendere i meccanismi che la mettono in relazione con i fattori di rischio già discussi in precedenza, indirizzare le strategie terapeutiche attuali verso il miglioramento della prognosi e suggerire nuovi bersagli terapeutici.

2.4 Funzione e disfunzione endoteliale

2.4.1 Il ruolo dell'endotelio nell'omeostasi vascolare

I processi patologici che portano all'aterosclerosi cominciano nell'infanzia, progrediscono lentamente attraverso una lunga fase subclinica e si manifestano clinicamente in un'epoca variabile, solitamente nell'adulto di mezza età. È stato ampiamente dimostrato che l'iniziazione e la progressione della malattia dipendono da profonde alterazioni dinamiche nella biologia vascolare [72]. L'endotelio gioca un ruolo fondamentale nella regolazione dell'omeostasi vascolare agendo come trasduttore di segnali circolanti in grado di modificare le caratteristiche fenotipiche della parete dei vasi. Le alterazioni della funzione endoteliale precedono lo sviluppo dei cambiamenti morfologici legati all'aterosclerosi e possono contribuire al verificarsi delle complicazioni cliniche ad essa collegate [73].

L'endotelio, sebbene formato da un monostrato di cellule epiteliali, è in grado di rispondere a segnali chimico-fisici tramite la produzione di un'ampia serie di fattori che regolano il tono vascolare, l'adesione cellulare, la resistenza ad eventi trombotici, la proliferazione delle cellule muscolari lisce e l'infiammazione della parete vascolare. L'importanza dell'endotelio è stata riconosciuta per la prima volta per il suo effetto sul tono vascolare, che si realizza sia attraverso la produzione e il rilascio di molteplici molecole vasoattive in grado di rilasciare o costringere il vaso, sia attraverso la risposta a mediatori vasoattivi circolanti come bradichinina e trombina. La modulazione del tono vascolare, oltre a riflettersi nella modulazione del rilascio di ossigeno ai tessuti periferici, è anche coinvolta nel rimodellamento della struttura vascolare stessa [74].

Nel 1980, gli esperimenti di Furchgott e Zawadzki hanno dimostrato per primi la presenza di un fattore vasodilatante di origine endoteliale, individuato in seguito come ossido nitrico

(NO). La sintesi di NO a partire dalla L-arginina, con formazione di citrullina, è catalizzata dall'enzima ossido nitrico sintasi, in presenza di cofattori come tetraidropterina, FAD, FMN e NADPH [75, 76]. Questo gas diffonde alle cellule muscolari lisce della tonaca media e attiva la guanilato ciclasi, con formazione del secondo messaggero cGMP, in grado di indurre vasodilatazione. Lo stress di parete, un induttore fondamentale dell'ossido nitrico sintasi endoteliale (eNOS), adatta la perfusione degli organi periferici alle variazioni della gittata cardiaca. Inoltre, l'enzima può essere attivato da molecole quali bradichinina, adenosina, fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF, in risposta all'ipossia) e serotonina (rilasciata in seguito all'aggregazione piastrinica). L'endotelio media anche l'iperpolarizzazione delle cellule muscolari lisce attraverso una via NO-indipendente, che aumenta la conduttanza del potassio e la conseguente propagazione della depolarizzazione del muscolo liscio, al fine di mantenere il tono vasodilatatore. Questa ultima via può compensare un'eventuale compromissione del tono vasodilatatore mediato dall'NO, in particolare a livello del microcircolo [77].

L'endotelio modula il tono vascolare anche in senso opposto, sia mediante la sintesi di endotelina e altri prostanoidi vasocostrittori, sia attraverso la conversione dell'angiotensina I ad angiotensina II che avviene sulla superficie endoteliale. Queste sostanze vasocostrittrici agiscono perlopiù localmente, ma alcune di esse, con i loro effetti sistemici, possono avere un ruolo nel rimodellamento arterioso.

In condizioni fisiologiche, l'NO ha un ruolo determinante nel mantenere la parete vascolare in uno stato quiescente inibendo l'infiammazione, la proliferazione cellulare e la trombosi. Questa azione si esplica in parte tramite s-nitrosilazione dei residui di cisteina in una serie di proteine, con riduzione della loro attività biologica [78]. Le proteine bersaglio includono il fattore di trascrizione NFkB, le proteine che controllano il ciclo cellulare e quelle coinvolte nella sintesi del fattore tissutale [79]. Inoltre, l'NO inibisce parzialmente la fosforilazione

ossidativa nei mitocondri [80]. Lo stress di parete indotto dal flusso laminare è il determinante di questo stato di quiescenza.

2.4.2 L'attivazione endoteliale nella patogenesi dell'aterosclerosi

Il fenomeno a cui comunemente ci si riferisce con disfunzione endoteliale rappresenta in realtà una attivazione endoteliale, in grado di contribuire all'insorgenza di patologie vascolari quando certe condizioni vengono soddisfatte. L'attivazione endoteliale rappresenta un passaggio dal fenotipo quiescente sopra menzionato a un fenotipico che coinvolge la difesa dell'ospite. Infatti, molti fattori di rischio cardiovascolari attivano meccanismi molecolari nell'endotelio che risultano nell'espressione di chemochine, citochine e molecole di adesione che mediano l'interazione con leucociti e piastrine al fine di contrastare gli agenti infettivi [81].

L'alterazione fondamentale coinvolta in questo processo è il passaggio da un silenziamento dei processi cellulari mediato dall'NO ad un'attivazione indotta dallo stress ossidativo. Le specie reattive dell'ossigeno (ROS), in presenza della superossido dismutasi, portano alla sintesi di perossido di idrogeno che, come l'NO, diffonde rapidamente attraverso l'endotelio e altera i residui di cisteina delle proteine alterandone la funzione. Tuttavia, a causa dei differenti meccanismi coinvolti, ciò si traduce in conseguenze ben differenti, tra cui la fosforilazione dei fattori di trascrizione, l'induzione del rimodellamento della cromatina nucleare e l'attivazione delle proteasi [82].

È importante notare come la eNOS, che normalmente contribuisce a mantenere lo stato quiescente dell'endotelio, possa, in circostanze appropriate, cominciare a produrre ROS nell'ambito dell'attivazione endoteliale. Questo fenomeno prende il nome di disaccoppiamento della eNOS e si traduce nella formazione di superossido nel caso in cui vi

sia una carenza del cofattore tetraidrobiopterina o nella sintesi di perossido di idrogeno in mancanza del substrato L-arginina. Per questi motivi, il comportamento bivalente della eNOS pone questo enzima al centro dell'omeostasi endoteliale [83].

In determinate circostanze, l'attivazione endoteliale e lo stress ossidativo contribuiscono all'aterogenesi e agli eventi clinici ad essa connessi. Il confine tra la normale risposta dell'ospite e una attivazione potenzialmente dannosa delle cellule endoteliali è dettato dalla natura, dalla durata e dalla combinazione di stimoli proinfiammatori. Numerosi fattori di rischio contribuiscono direttamente alla disfunzione endoteliale. Tra questi è importante ricordare: elevati livelli plasmatici di colesterolo LDL e LDL ossidate, bassi livelli di colesterolo HDL, elevati trigliceridi, ipertensione arteriosa, elevati livelli di proteina C reattiva (PCR) e fosfolipasi A2 associata alle lipoproteine circolanti (Lp-PLA2, un marker specifico di infiammazione vascolare [84]), iperglicemia, elevato rapporto omega-6:omega-3, iperinsulinemia, elevati livelli di omocisteina, elevato fibrinogeno, fumo di sigaretta, bassi livelli di vitamina D [85].

La produzione cronica di ROS può eccedere la capacità dei sistemi antiossidanti cellulari di natura enzimatica e non, contribuendo alla patologia vascolare tramite l'induzione di un'attivazione endoteliale sostenuta nel tempo. Una importante fonte di ROS è il mitocondrio, nel quale in condizioni fisiologiche la produzione di ROS da parte della fosforilazione ossidativa e la capacità dismutante della superossido dismutasi mitocondriale sono finemente bilanciate [86]. Questo equilibrio può essere alterato dall'ipossia o da condizioni che comportano un eccesso di substrati, come quello che si verifica nei disordini metabolici collegati all'obesità e al diabete mellito di tipo 2, caratterizzati da iperglicemia e da un aumento degli acidi grassi liberi circolanti [87]. Altre importanti fonti di stress ossidativo nell'endotelio sono gli enzimi NADPH ossidasi [88] e xantina ossidasi, la cui attività è aumentata nelle arterie dei pazienti con malattia coronarica [89].

Il signaling mediato dai ROS può essere innescato dall'esposizione a citochine infiammatorie, da fattori di crescita e dall'interazione dell'endotelio con i leucociti. L'interazione tra ROS e NO determina un circolo vizioso che sostiene l'attivazione e l'infiammazione endoteliale.

L'esposizione ripetuta e prolungata ai fattori di rischio cardiovascolari può portare all'esaurimento dell'azione protettiva dei sistemi antinfiammatori endogeni nelle cellule endoteliali. Come conseguenza di ciò, non solo si verifica disfunzione endoteliale, ma le cellule endoteliali possono anche perdere la loro integrità, assumere un fenotipo senescente ed entrare in circolo. I marker circolanti di tale danno includono frammenti derivati da cellule endoteliali attivate o apoptotiche [90]. È stato dimostrato un rialzo di questi marker nelle malattie aterosclerotiche periferiche e coronarica, come in altre patologie infiammatorie associate ad un aumentato rischio cardiovascolare quali l'artrite reumatoide e il lupus eritematoso sistemico [91].

L'integrità endoteliale dipende non solo dall'estensione del danno, ma anche dalla capacità endogena di riparazione. Due sono i meccanismi postulati per i processi di riparazione. Il primo prevede che le cellule endoteliali mature adiacenti alla lesione possano replicarsi localmente rimpiazzando le cellule danneggiate. Tuttavia questo meccanismo non riuscirebbe da solo a sopperire al danno endoteliale esteso che si verifica in presenza di numerosi fattori di rischio cardiovascolare. Un secondo meccanismo, ipotizzato recentemente, implica la presenza di progenitori circolanti di cellule endoteliali reclutati dal midollo osseo, in grado di differenziarsi in cellule endoteliali mature [92]. Il rilascio in circolo di tali cellule è in parte mediato dall'NO e pertanto potrebbe essere compromesso nei pazienti ad elevato rischio cardiovascolare. Per contro, è stato dimostrato che i fattori in grado di migliorare la funzione endoteliale e la biodisponibilità di NO, tra cui l'esercizio fisico e le statine, sono in grado di esercitare un potente effetto stimolante sul rilascio di

cellule progenitrici [93]. I fattori di rischio cardiovascolari, oltre ad interferire con il reclutamento dei progenitori circolanti, compromettono anche la differenziazione e la funzione di queste cellule. È importante notare che i progenitori circolanti delle cellule endoteliali possono differenziarsi in varie linee cellulari e sviluppare caratteristiche fenotipiche proprie di altre cellule della linea mieloide, quali macrofagi e cellule dendritiche [94].

L'importanza dell'equilibrio tra l'esposizione ai fattori di rischio e la capacità rigenerativa della determinazione del fenotipo clinico dell'endotelio è stata dimostrata grazie all'osservazione che i soggetti con un aumentato quantitativo di progenitori endoteliali circolanti hanno una funzione endoteliale conservata, nonostante la coesistenza di alti livelli di fattori di rischio.

2.5 Determinazione della funzione endoteliale

I primi esperimenti a dimostrazione della disfunzione endoteliale nelle coronarie aterosclerotiche furono condotti nel 1986 da Ludmer *et al.* mediante angiografia coronarica quantitativa dopo infusione intracoronarica di acetilcolina [95]. I loro studi hanno condotto ad un importante revisione del paradigma secondo cui l'aterosclerosi era ritenuta una malattia puramente strutturale. Le loro ricerche spostarono l'attenzione sulle manifestazioni funzionali dell'aterosclerosi quale l'eccessiva vasocostrizione come conseguenza dell'alterata funzione endoteliale. Successivamente, tecniche meno invasive furono sviluppate utilizzando la circolazione dell'avambraccio come surrogato delle arterie coronarie [96-98]. Ciascun approccio ha una serie di vantaggi e svantaggi e ciascuna metodica analizza letti vascolari diversi. Il principio, tuttavia, è comune: le arterie funzionanti si dilatano in risposta all'iperemia reattiva (vasodilatazione mediata dal flusso) o in seguito a stimoli farmacologici

quali l'infusione intra-arteriosa di sostanze in grado di indurre la vasodilatazione endotelio-indipendente, come acetilcolina, bradichinina e serotonina [99]. In diversi stati patologici, la vasodilatazione endotelio-dipendente è ridotta o assente. Tuttavia, indipendentemente dalla tecnica utilizzata, le risposte vascolari non sono determinate solo dallo stato funzionale delle arterie al momento della misurazione, bensì anche dalle condizioni strutturali delle arteriole di resistenza nel microcircolo. Inoltre, donatori esogeni di NO, come la nitroglicerina, possono essere impiegati per differenziare la risposta endotelio-dipendente da quella endotelio-indipendente. Una compromissione della funzione endotelio-indipendente si associa ad alterazioni strutturali del vaso e delle cellule muscolari lisce, piuttosto che a cambiamenti nell'endotelio.

Molteplici tecniche invasive e non-invasive sono state sviluppate negli ultimi anni per la valutazione della funzione endoteliale. Le tecniche invasive, che implicano infusioni intracoronariche o intrabrachiali di agenti vasoattive, sono ancora considerate il gold standard per la diagnosi precoce della disfunzione endoteliale. Alle metodiche invasive, si sono affiancati diversi approcci non-invasivi, con risultati comparabili in termini di affidabilità e riproducibilità.

2.5.1 Metodiche invasive

Le metodiche non invasive prevedono la misurazione della funzione endoteliale dei vasi epicardici e dei vasi di resistenza coronarici. Il vantaggio principale è di misurare la funzione endoteliale direttamente su letti vascolari di rilevanza clinica.

Allo scopo di determinare la risposta vasomotoria delle coronarie epicardiche, vengono eseguite coronarografie quantitative o ecografie intravascolari che documentano le variazioni endotelio-dipendenti dei diametri e delle sezioni vascolari. Dopo infusione di

acetilcolina, si ha una dilatazione dei segmenti vascolari con un endotelio intatto, mentre i segmenti vascolari con un endotelio disfunzionale o danneggiato rispondono con una vasocostrizione risultante dall'attivazione diretta dei recettori muscarinici espressi dalle cellule muscolari lisce della tonaca media [95]. Ulteriori misurazioni delle risposte endotelio-dipendenti includono quelle effettuate durante esercizio fisico [100] o a seguito di una tachicardia indotta artificialmente [101]. Questi stimoli inducono un incremento del flusso coronarico, cui segue un aumento dello stress di parete nel circolo coronarico, il quale dovrebbe tradursi in una dilatazione endotelio-dipendente dei vasi epicardici. L'osservazione della dilatazione mediata dal flusso (FMD, flow-mediated dilation) nelle coronarie epicardiche e della sua compromissione nell'aterosclerosi forniscono il razionale per studiare risposte simili nella circolazione periferica. Un ulteriore test "fisiologico" per misurare la reattività vascolare epicardica prevede la misurazione della risposta al freddo, nel quale il soggetto pone la mano in acqua ghiacciata. L'attivazione del sistema nervoso simpatico determina il rilascio di NO e di fattori iperpolarizzanti derivanti dall'endotelio attraverso la stimolazione dei recettori α_2 -adrenergici e la conseguente vasodilatazione nelle arterie sane [102]. Tuttavia, nell'endotelio disfunzionale, prevale la vasocostrizione mediata dai recettori α_1 -adrenergici espressi dalle cellule muscolari lisce della tonaca media, molto simile a quella osservata in risposta all'acetilcolina [103].

Le variazioni del flusso coronarico possono essere usate come surrogato della funzione del microcircolo coronarico [104]. La riserva di flusso coronarica esprime il rapporto tra il flusso coronarico massimo durante iperemia massimale coronarica indotta da appositi stimoli (es. esercizio) e il flusso coronarico a riposo. Questa risposta massimale ha due componenti, una endotelio-dipendente, l'altra endotelio-indipendente. Una riserva di flusso coronarico <2.0 è considerata non normale [105]. Per misurare la risposta endotelio-dipendente, viene

considerato l'incremento del flusso coronarico in risposta a vasodilatatori come l'acetilcolina, infusa a concentrazioni crescenti.

Altri metodi per stimare la funzione del microcircolo sono stati proposti. Uno di questi prevede la misura del numero di fotogrammi richiesti per il riempimento di un vaso distale a seguito dell'iniezione di un mezzo di contrasto [106]. Altri metodi, sempre di carattere invasivo, prevedono l'impiego della tomografia ad emissione di positroni, della risonanza magnetica cardiaca e dell'ecocardiografia [107-109].

2.5.2 Tecniche periferiche per la determinazione della funzione endoteliale

Per la determinazione della funzione endoteliale nel soggetto asintomatico, l'esecuzione di una coronarografia risulterebbe inappropriata. Per questo motivo, sono state sviluppate tecniche alternative non invasive o minimamente invasive. È necessario sottolineare che certi fenomeni patologici non possono essere spiegati esclusivamente alla luce della disfunzione endoteliale sistemica; è più probabile, infatti, che certi fattori in grado di determinare alterazioni locali del flusso possano contribuire a spiegare la fisiopatologia di determinate malattie [110, 111].

Uno degli approcci periferici prevede l'esecuzione della pletismografia a livello dell'avambraccio [97]. Questa tecnica, di impiego limitato per la sua natura semi-invasiva, misura le variazioni del flusso ematico nell'avambraccio attraverso una pletismografia venosa eseguita su entrambe le braccia prima e dopo l'infusione di sostanze vasoattive nell'arteria brachiale incannulata. Il vantaggio principale risiede nella possibilità di infondere gradualmente sostanze vasoattive, ormoni o farmaci (es. acetilcolina o nitroglicerina), in modo da quantificare le risposte endotelio-dipendente e indipendente in maniera dose-dipendente. I dosaggi impiegati hanno limitati effetti sistematici, permettendo allo

sperimentatore di utilizzare il braccio controlaterale come controllo interno. I risultati sono espressi in termini di rapporto delle variazioni del flusso misurate nelle due braccia e sono ampiamente riproducibili [112]. La risposta all'acetilcolina è significativamente ridotta dall'infusione intra-arteriosa di N-monometil-L-arginina (L-NMMA, un inibitore della eNOS), dimostrando un ruolo chiave per l'NO [113]. Va considerato il fatto che, specialmente nei pazienti con multipli fattori di rischio, anche i fattori iperpolarizzanti derivati dall'endotelio hanno un ruolo nel determinare il tono del microcircolo e la risposta agli agenti vasodilatatori [114].

Tuttavia, a causa delle variazioni nelle pressioni arteriose di partenza, nel flusso ematico a livello dell'avambraccio e delle diverse dimensioni degli arti, il confronto tra gruppi di soggetti e nel tempo relativamente ad uno stesso soggetto, sono di limitato valore. Sebbene la misurazione della vasodilatazione farmacologicamente indotta mediante questa tecnica possa fornire interessanti informazioni sulla fisiopatologia del microcircolo, questa non correla necessariamente con la risposta che si ha in seguito ad ischemia transitoria o all'esercizio fisico.

2.6 Flow-mediated dilation dell'arteria brachiale

La flow-mediated dilation (FMD) dell'arteria brachiale è una tecnica ultrasonografica non invasiva di largo impiego nell'ambito della ricerca sulla funzione endoteliale. La FMD è determinata dalla variazione del diametro dell'arteria brachiale in risposta ad una variazione del flusso ematico, che agisce come stimolo [98]. Quest'ultima consegue al rilascio del manicotto di uno sfigmomanometro posizionato sull'avambraccio e gonfiato a pressione sovrastolica. Nella fase post-ischemica si realizza il rilascio di NO dalle cellule endoteliale

che, come ampiamente discusso, media il rilasciamento delle cellule muscolari lisce e la conseguente dilatazione dell'arteria.

2.6.1 Tecnica di esecuzione

2.6.1.1 Preparazione del soggetto

Numerosi fattori influenzano la reattività vascolare mediata dal flusso, tra cui la temperatura ambientale, alcuni cibi, farmaci e stimoli simpatici. Per questo motivo, i soggetti dovrebbero rimanere a digiuno per 8-12 ore prima dell'esame, il quale dovrebbe svolgersi in una stanza tranquilla e a temperatura controllata. Tutti i farmaci vasoattivi dovrebbero essere sospesi per un intervallo di tempo pari ad almeno quattro volte la loro emivita, ove possibile. In aggiunta, i soggetti non dovrebbero praticare esercizio fisico, fumare, assumere caffè, cibi ad alto contenuto lipidico e vitamina C per almeno 4-6 ore prima dell'esame. Lo sperimentatore dovrebbe essere al corrente della fase del ciclo mestruale un cui si trovano le donne, dal momento che queste potrebbero influenzare il valore di FMD. Tutti questi fattori confondenti dovrebbero essere tenuti in considerazione nell'analisi statistica degli studi che analizzano l'impatto di un intervento sulla FMD [115].

2.6.1.2 Attrezzatura

L'ecografo utilizzato per l'esame deve disporre di un modulo vascolare che permetta l'acquisizione di immagini bidimensionali (2D), del Doppler e di un monitor ECG interno. La sonda richiesta deve essere di tipo lineare, operare ad una frequenza minima di 7 MHz ed in grado di acquisire immagini ad una risoluzione sufficiente per la successiva analisi. La qualità delle immagini è migliore utilizzando una sonda a banda larga (frequenze multiple, da 7 a 12 MHz). Il tempo di acquisizione di ogni frame in relazione al ciclo cardiaco è

determinato con una successiva registrazione dell'ECG nel monitor dell'ecografo [116]. Questo aspetto può essere automatizzato con l'impiego di software di elaborazione delle immagini dedicati allo studio della FMD in grado di operare il gating ECG [117].

2.6.1.3 Acquisizione delle immagini

Il soggetto viene fatto accomodare in posizione supina con il braccio (destro o sinistro, indifferentemente) in una posizione confortabile per l'acquisizione di immagini ecografiche dall'arteria brachiale, studiata al di sopra della fossa antecubitale sul piano longitudinale (Figura C). Deve essere selezionato un segmento in cui siano visibili chiaramente le tonache intime anteriore e posteriore tra il lume e la parete del vaso. La sezione trasversale dell'arteria brachiale non può essere utilizzata per determinare il diametro massimo dell'arteria a causa della scarsa definizione delle pareti laterali. In aggiunta all'imaging 2D in scala di grigi, sia l'M mode che l'A mode (tracking di parete) possono essere utilizzati per la misurazione continuativa dei diametri; tuttavia, queste tecniche sono soggette ad ampio errore. Durante l'acquisizione delle immagini, i reperi anatomici quali vene, fasce ed arterie collaterali devono essere annotati per assicurarsi sia di leggere lo stesso punto dell'arteria durante l'intera durata dello studio, sia per migliorare la riproducibilità di eventuali misurazioni successive. Per migliorare la resa dello studio e ridurre al minimo l'errore dovuto allo spostamento della sonda e/o del soggetto, è fortemente consigliato l'uso di un sistema stereotattico per il mantenimento in posizione della sonda e per fini aggiustamenti di quest'ultima [118] (Figura C).

2.6.1.4 FMD endotelio-dipendente

Per indurre artificialmente un aumento del flusso nell'arteria brachiale, il bracciale di uno sfigmomanometro viene posizionato a livello dell'avambraccio prima dell'inizio dello studio.



Figura C. Setting sperimentale per la determinazione della FMD dell'arteria brachiale. Il soggetto viene fatto accomodare in posizione supina con il braccio destro esteso ed immobilizzato. Una sonda ecografica lineare viene posizionata nel terzo distale del braccio, retta da un apposito sistema che minimizza gli spostamenti durante l'esame. Da *Impact of acute exercise on brachial artery flow-mediated dilatation in young healthy people*, Cardiovascular Ultrasound (2012) 10, 1476

È consigliabile annotare la distanza tra la piega antecubitale e il bracciale al fine di migliorare la riproducibilità di successive determinazioni. Viene successivamente acquisita un'immagine dell'arteria a riposo (baseline) per misurare il diametro iniziale e il flusso Doppler da un volume campione in posizione centrale della stessa arteria. Nel caso in cui venga impiegato un software dedicato per l'analisi delle immagini, è consigliabile studiare un tratto di arteria di lunghezza pari ad almeno 1 cm. Dopo la registrazione del calibro basale, l'arteria viene occlusa gonfiando il bracciale a pressione sovrasistolica. Di norma, il bracciale viene gonfiato ad una pressione superiore di almeno 50 mmHg a quella sistolica precedentemente misurata nel soggetto. Ciò causa un'ischemia localizzata e la conseguente dilatazione dei vasi di resistenza a valle grazie a meccanismi di autoregolazione. La durata

dell'ischemia deve essere di almeno 5 minuti. È stato dimostrato che per una durata di ischemia superiore ai 5 minuti non si hanno più variazioni della FMD. Al termine della fase di ischemia, il rilascio del bracciale induce un transitorio stato di elevato flusso a livello dell'arteria brachiale (iperemia reattiva) per perfondere i vasi di resistenza precedentemente dilatati. Il conseguente aumento dello shear stress provoca la dilatazione dell'arteria brachiale. L'immagine longitudinale dell'arteria viene registrata continuamente per almeno 2 minuti dopo il rilascio del bracciale, simultaneamente al tracciato Doppler pulsato per stimare il flusso durante l'iperemia reattiva. È utile registrare l'immagine per i 5 minuti successivi al rilascio del bracciale, al fine di registrare il ritorno al calibro basale, utilizzabile come controllo interno dell'accuratezza dell'acquisizione dell'immagine [119].

In alcuni studi è stata operata l'inversione del bracciale e del punto in cui viene registrato il diametro dell'arteria. Non è stato ancora raggiunto un consenso su quale posizionamento sia più corretto; tuttavia, quando il bracciale viene posizionato nella parte superiore del braccio, l'iperemia reattiva tipicamente induce una dilatazione maggiore, probabilmente a causa del reclutamento di un numero maggiore di vasi di resistenza. Questa modalità di posizionamento crea maggiori problematiche di ordine tecnico, dal momento che l'immagine è spesso distorta dal collasso dell'arteria brachiale e dallo slittamento dei tessuti molli durante le fasi di gonfiaggio e sgonfiaggio [120].

La FMD può essere misurata anche a livello delle arterie radiale, ascellare e femorali superficiali. Le arterie migliori per l'esecuzione di questa tecnica sono quelle con diametro a riposo compreso tra 2.5 e 5.0 mm. La lettura di arterie di calibro più piccolo è assai difficoltosa, mentre è difficile indurre vasodilatazione dei vasi più grandi [115].

2.6.2 Analisi dei dati

L'analisi accurata della reattività dell'arteria brachiale dipende fortemente dalla qualità delle immagini ecografiche.

2.6.2.1 Reperi anatomici

Il diametro dell'arteria brachiale dovrebbe essere misurato da scansioni longitudinali in cui l'interfaccia intima-lume sia visualizzabile sulle pareti prossimale (anteriore) e distale (posteriore). Queste interfacce sono meglio visualizzabili quando l'angolo di scansione è perpendicolare. Pertanto, la chiara visualizzazione di entrambe le pareti del vaso indica che il piano di scansione biseca il vaso in senso longitudinale e che il diametro misurato su queste immagini è attendibile. Una volta individuata la porzione di vaso su cui condurre l'analisi, i limiti entro cui misurare il diametro (interfaccia lume-intima o media-avventizia) devono essere identificate manualmente o tramite l'ausilio di un software di riconoscimento dei bordi. La variabilità nella determinazione del diametro è più alta quando questo viene misurato su un singolo punto piuttosto che determinato dalla media di più diametri misurati su un segmento del vaso. In maniera simile, immagini trasversali sono meno affidabili, dal momento che solo un punto viene utilizzato per la determinazione del diametro. Sulla base di queste premesse, la misurazione del diametro su un segmento del vaso richiede che l'immagine sia quanto più possibile allineata. Se il fascio di ultrasuoni non biseca perfettamente l'arteria, si verifica inevitabilmente una distorsione, gestibile da alcuni software di riconoscimento dei bordi [121] (Figura D).

2.6.2.2 Tempistiche della FMD

La FMD è un processo endotelio-dipendente che riflette il rilasciamento di un'arteria di conduzione quando esposta a shear stress crescente. L'incremento del flusso attraverso

l'arteria brachiale si verifica durante la fase di iperemia reattiva postocclusiva. Alcuni studi hanno dimostrato che il massimo incremento del calibro si verifica all'incirca 60 secondi dopo il rilascio del bracciale, o 45-60 secondi dopo il picco di flusso. Tale incremento del diametro può essere azzerato con l'uso dell'inibitore della eNOS L-NMMA, a dimostrazione del fatto che si tratta di un processo mediato dall'NO. Altre misure opzionali della risposta vasodilatante sono il tempo di massima risposta, la durata della risposta vasodilatatoria e l'area sotto la curva di dilatazione [122].

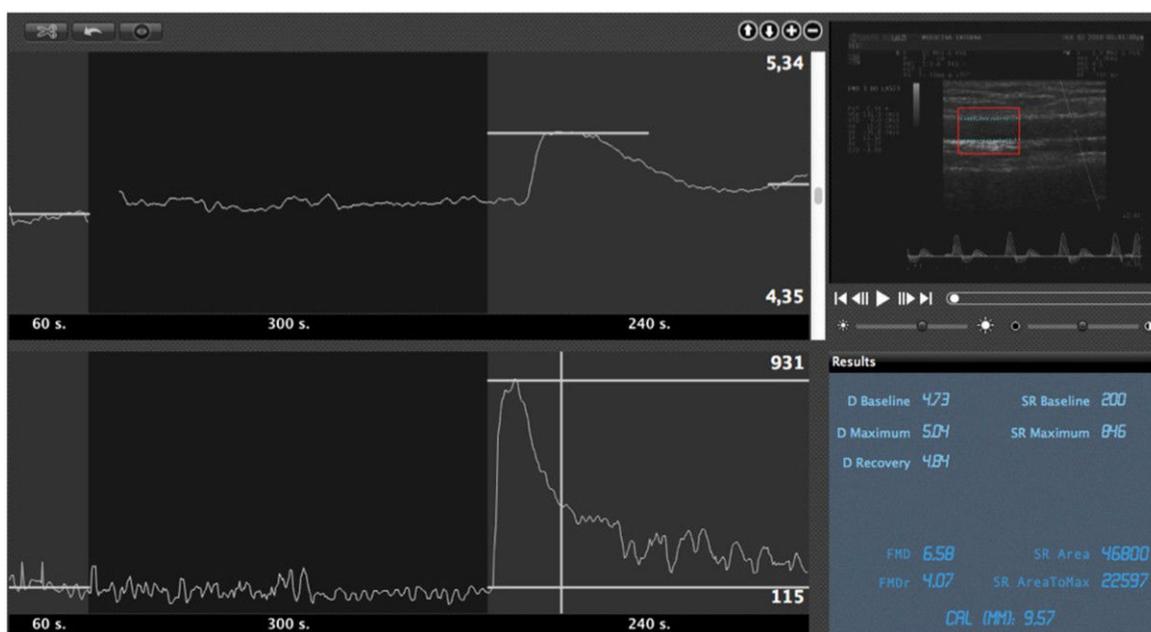


Figura D. Il software CardioVascular Suite, sviluppato da Quipu, Pisa, Italia, e utilizzato anche nel presente studio, permette l'analisi in tempo reale del segnale doppler e B-Mode durante la misurazione della FMD dell'arteria brachiale. I grafici mostrano le variazioni del diametro dell'arteria (pannello superiore) e lo stress di parete (pannello inferiore). Il pannello in basso a destra riporta i diametri basale e massimo dell'arteria brachiale, nonché il calcolo del valore di FMD. Da *Intima media thickness, pulse wave velocity, and flow mediated dilation*, Cardiovascular Ultrasound (2012) 10, 1476

2.6.2.3 Variazioni indotte dal ciclo cardiaco

Il diametro dell'arteria brachiale dovrebbe essere misurato continuamente nella stessa fase del ciclo cardiaco, obiettivo raggiungibile tramite l'impiego del gating ECG durante l'acquisizione delle immagini. L'inizio dell'onda R identifica la fine della diastole, mentre il

picco dell'onda T identifica la fine della sistole. Il diametro di picco sistolico è maggiore del diametro di fine diastole, dal momento che il vaso si dilata durante la sistole per assecondare l'aumento di pressione e volume generato dalla contrazione del ventricolo sinistro. L'ampiezza della dilatazione sistolica è influenzata dalla compliance del vaso e può essere ridotta da fattori quali l'invecchiamento e l'ipertensione (per ridotta biodisponibilità di NO). Pertanto, anche se non dimostrato rigorosamente, le caratteristiche funzionali dell'arteria brachiale potrebbero disturbare la misurazione della FMD se il diametro è misurato a fine sistole [123].

2.6.2.4 Interpretare la FMD

La FMD è tipicamente espressa in termini di variazione percentuale del calibro post-ischemia rispetto al calibro basale. Nonostante i numerosi studi condotti su soggetti sani, non esiste a tutt'oggi un consenso sul valore soglia di FMD al di sotto del quale si può parlare di disfunzione endoteliale. Ad ogni modo, dalla nostra analisi della letteratura e da determinazioni condotte su soggetti sani, abbiamo considerato il valore di FMD inferiore al 6% come indicatore di disfunzione endoteliale. Il diametro a riposo influenza la variazione percentuale in due modi. Innanzitutto, dato un qualsiasi valore assoluto di variazione di calibro, tanto maggiore è il diametro basale, tanto minore sarà la variazione percentuale. Secondo, le arterie più piccole sembrano dilatarsi più di quanto lo facciano le arterie di più grosso calibro. Entrambi questi fattori sono meritevoli di considerazione quando si confrontano le risposte vasodilatatorie tra individui e gruppi con differenti diametri a riposo. Per quegli studi in cui il confronto viene fatto sugli stessi individui prima e dopo un intervento, la variazione percentuale può rappresentare il metodo più semplice da utilizzare se il diametro basale rimane stabile nel tempo. Ad ogni modo, l'opzione migliore potrebbe

essere quella di misurare e annotare il diametro basale e la variazione in termini assoluti e relativi [124].

2.6.3 Curva di apprendimento: il ruolo dell'operatore

Nonostante la FMD possa sembrare una tecnica relativamente facile da eseguire, lo studio ecografico dell'arteria brachiale ha una significativa curva di apprendimento. Gli elementi necessari ad assicurare un'ottimale implementazione della tecnica sono riassunti in Tabella D. Idealmente, un medico adeguatamente istruito sui principi e sugli aspetti tecnici di ecografia vascolare è adatto all'esecuzione della tecnica. Il pieno apprendimento della tecnica richiede tipicamente diversi mesi e dipende sia dalle abilità tecniche dello sperimentatore, sia dalla frequenza con cui la tecnica viene eseguita. Il training deve essere idealmente effettuato da un medico esperto che può evidenziare le sorgenti di errore e gli artefatti ecografici che possono verificarsi durante l'esame. La pratica intensiva permette di raggiungere una migliore qualità delle immagini e una maggiore affidabilità dei dati ottenuti. Un importante aspetto della messa a punto di un protocollo che preveda l'impiego della FMD è costituito dalle questioni legate all'ergonomia. L'operatore dovrebbe sedere in una posizione comoda e posizionare la sonda in una posizione il più possibile fissa, istruendo il soggetto a minimizzare i movimenti del corpo e del capo. La qualità delle immagini e delle misurazioni si fonda sulla stabilità della sonda e sull'immobilità del soggetto in studio. È raccomandabile che il medico addetto all'esecuzione della FMD abbia effettuato almeno 100 misurazioni supervisionate prima di procedere in autonomia. In aggiunta, è raccomandato un minimo di 100 esami all'anno per mantenere la competenza acquisita. Queste raccomandazioni si basano in parte sui criteri di appropriatezza ecografica elaborati dalla Intersocietal Commission for the Accreditation of Vascular Laboratories. Per aumentare la

competenza del medico esecutore e risolvere eventuali situazioni generatrici di errore, sono utili delle sessioni di revisione delle immagini acquisite con personale specializzato.

Categoria	Tipo di alterazione
Preparazione del soggetto	Digiuno da più di 6 ore
	Astensione dal fumo di tabacco per le 6 ore precedenti
	Astensione dall'esercizio fisico per le 24 ore precedenti
	Astensione dal consumo di alcol e caffeina per le 12 ore precedenti
	Astensione dal consumo di cibi ricchi di polifenoli per le 18 ore precedenti
	Astensione dal consumo di supplementi dietetici per le 72 ore precedenti
	Astensione dall'assunzione di farmaci vasoattivi nella mattina dell'esame
	Mantenimento della posizione supina durante l'esame; acclimatazione di almeno 15 minuti in una stanza a temperatura controllata
	In caso di misurazioni ripetute, standardizzazione in base alla fase del ciclo mestruale
	In caso di misurazioni ripetute, esecuzione delle stesse nel medesimo momento della giornata
Acquisizione delle immagini	Registrazione continua del diametro dell'arteria brachiale
	Misurazione del diametro dell'arteria brachiale solo al termine della diastole
	Acquisizione simultanea del tracciato Doppler (dual-mode) per la quantificazione dello stress di parete
Analisi delle immagini	Utilizzo di un software per il riconoscimento automatico delle pareti
	Calcolo della FMD in base al reale diametro massimo raggiunto dall'arteria brachiale in fase post-ischemica
Validità dei dati acquisiti	Impiego di ecografisti addestrati all'esecuzione della tecnica
	In caso di misurazioni ripetute, esecuzione della tecnica da parte del medesimo medico

Tabella D. Requisiti richiesti per un'ottimale implementazione della tecnica per la misurazione della FMD dell'arteria brachiale.

La variabilità intraosservatore e interosservatore nell'acquisizione e nell'analisi delle immagini dovrebbe essere verificata periodicamente ad ogni variazione delle condizioni sperimentali. La variabilità delle immagini può essere giudicata con due ecografisti

indipendenti che impiegano la tecnica su una medesima serie di soggetti in tempi diversi. La riproducibilità più elevata si osserva in un breve intervallo di tempo, durante il quale è improbabile che la risposta vasodilatatoria vari per effetto di fattori ambientali o legati al soggetto. È utile, pertanto, eseguire due misurazioni nello stesso giorno a distanza di 60 minuti in due giorni consecutivi. Studi longitudinali in cui vengono testati gli effetti di uno o più interventi a distanza di settimane o mesi richiedono che le misure di riproducibilità sopra citate vengano effettuate a intervalli più lunghi. L'analisi delle immagini e la misurazione della risposta vasodilatatoria da più esami dovrebbe essere effettuata da uno sperimentatore operante in cieco. La determinazione della variabilità nelle misurazioni di norma viene condotta da un laboratorio specializzato nella gestione di trial multicentrici ed è propedeutica all'accreditamento periodico del sito sperimentatore [125].

Diversi approcci sono utilizzati per la misura della variabilità di due serie di misurazioni. Uno è il coefficiente di correlazione, che deriva dai dati che rappresentano l'intero range di misurazioni già ottenute nel medesimo setting in cui la tecnica verrà impiegata. Un secondo parametro è rappresentato semplicemente dalla media e dall'intervallo di differenze tra le misurazioni, che fornisce un'idea dei limiti inferiori di differenze che possono essere secondarie all'intervento o semplicemente ascritte alla variazione tra soggetti. Il terzo parametro, il coefficiente di variazione, esprime la dimensione della varianza di una misura in relazione alla media di tutte le misure condotte, ad esempio, su uno stesso soggetto. Dal momento che la FMD è espressa in termini percentuali, piccole differenze tra osservatori vengono enormemente amplificate. Non esiste una misura ideale della riproducibilità di questa tecnica. Alla luce di queste considerazioni, il modo migliore per analizzare la riproducibilità della FMD dell'arteria brachiale è disporre su un diagramma a punti i risultati ottenuti in tempi diversi, insieme alla linea di identità, accompagnati dai risultati dei tre parametri sopra descritti [126].

Un'attenzione rigorosa alla standardizzazione dei protocolli, al training degli operatori e al controllo di qualità continuo sono tutti elementi critici per ottenere dati che siano il più possibile validi e riproducibili.

2.6.4 Questioni metodologiche

Ad oggi, solo pochi centri hanno maturato un'esperienza nella tecnica tale da raggiungere elevati standard di accuratezza e ridurre così la variabilità della FMD. Ghiadoni *et al.* hanno valutato la variabilità nel tempo delle misure della FMD ottenute in più di 130 volontari sani in diversi centri di ricerca da operatori certificati come richiesto dalle linee guida, in condizioni sperimentali predeterminate, che includevano l'impiego di un dispositivo stereotattico di bloccaggio della sonda e di un software per il riconoscimento automatizzato delle pareti dell'arteria [127]. La loro ricerca ha dimostrato che l'aderenza ad un protocollo rigoroso è realizzabile in un setting multicentrico, assicurando misurazioni di alta qualità e, soprattutto, fornendo un'ottimale riproducibilità in un intervallo di tempo relativamente breve. Risultati simili sono stati ottenuti anche su pazienti con malattie cardiovascolari, con misure ripetute ad intervalli più lunghi. Questo approccio, che dovrebbe essere implementato in tutti gli studi che analizzano la FMD, si fonda sull'impiego di software che permettano la misurazione del calibro dell'arteria brachiale in tempo reale, con notevole miglioramento dell'affidabilità dei dati così ottenuti.

Altri aspetti importanti sono rappresentati dallo stimolo che induce la FMD, ossia il flusso durante l'iperemia reattiva, che può rappresentare un'importante misura della funzione microvascolare periferica. Nonostante possa sembrare ragionevole correggere il grado di vasodilatazione indotta per la quantificazione dello shear stress, le metodiche di normalizzazione finora proposte hanno fornito risultati contrastanti [128]. Inoltre, sono stati proposti metodi di calcolo alternativi della FMD, che minimizzino l'effetto della variabilità

del calibro basale (come spiegato in precedenza, maggiore è il diametro basale, minore sarà la variazione percentuale osservata). In ultimo, per venire incontro all'esigenza di misurare la funzione endoteliale a riposo e non in condizioni di iperemia, sollevata da alcuni gruppi di ricerca, è stata proposta la valutazione a livello dell'arteria brachiale della vasocostrizione durante il gonfiaggio del bracciale (low-flow-mediated constriction, FMC) [129]. Per quest'ultima tecnica, tuttavia, non è stato raggiunto il grado di standardizzazione necessario a garantire l'attendibilità dei risultati.

Una possibile implementazione dei protocolli prevede la misurazione della risposta vasodilatatoria endotelio-indipendente dopo somministrazione di nitroglicerina sublinguale a basse dosi. Questo approccio è richiesto al fine di ottenere livelli di vasodilatazione comparabili tra loro e per escludere la possibilità che un'alterata contrattilità delle cellule muscolari lisce possa influenzare la risposta endotelio-dipendente [130].

2.7 Disfunzione endoteliale e rischio cardiovascolare

A livello delle coronarie, la compromissione della funzione endoteliale si verifica precocemente nel corso dell'aterosclerosi in relazione a fattori di rischio sistemici [131] e ad un anomalo stress di parete [111]. Una lunga serie di evidenze scientifiche dimostra che la disfunzione endoteliale si associa con tutte le condizioni che predispongono all'aterosclerosi e alle malattie cardiovascolari [132]. La disfunzione endoteliale è stata osservata in pazienti con ipertensione arteriosa [133, 134], in soggetti normotesi con storia familiare di ipertensione [135], nei fumatori (attivi e passivi) [136], nelle dislipidemie [137], nell'invecchiamento [97], nel diabete mellito [138], nell'obesità [138], nei soggetti con iperomocisteinemia [139] e nei pazienti con malattie infiammatorie croniche [140]. Gli

effetti del rischio cardiovascolare sull'endotelio possono essere osservati già dall'infanzia [141].

Il carattere sistemico della disfunzione endoteliale [142] può spiegare perché la funzione endoteliale periferica (micro- e macrovascolare) si correla con quella coronarica [143]. I fenomeni fisiopatologici sottostanti le alterazioni funzionali dell'endotelio portano nel lungo periodo ad alterazioni strutturali dei vasi. Uno studio clinico del 2009 ha dimostrato che la FMD si correla alla progressione dello spessore intima-media (IMT, intima-media thickness) in popolazioni sane [144]. Per di più, a differenza della IMT, la diminuzione della FMD si correla con un aumento rischio cardiovascolare stimato secondo i criteri di Framingham. In maniera simile, è stata dimostrata la capacità della FMD di predire la progressione della IMT in donne ipertese in postmenopausa [145].

Alla luce di queste evidenze, si può affermare che la disfunzione endoteliale è significativamente associata al rischio cardiovascolare globale e può essere considerato un predittore degli effetti che tali fattori di rischio esercitano. Una possibile limitazione di questa interpretazione deriva dalle temporanee compromissioni della funzione endoteliale che possono essere indotte da patologie acute [146], dall'esercizio fisico [147] o da determinati cibi [148]. Per questo motivo, è necessario che la valutazione della funzione endoteliale si basi su più determinazioni condotte nel tempo.

La determinazione periferica della FMD si è dimostrata predittiva di eventi cardiovascolari aldilà dei fattori di rischio tradizionali in particolari coorti di pazienti, tra cui soggetti sottoposti a chirurgia vascolare elettiva, donne in postmenopausa e in soggetti con dolore toracico. Due studi, condotti uno su 435 e l'altro su 268 soggetti sani senza evidenza di patologia cardiovascolare e a basso rischio, hanno dimostrato che la FMD è un predittore indipendente di eventi cardiovascolari aggiuntivo ai fattori di rischio tradizionali, assenti

nelle coorti studiate [149, 150]. Nello studio Cardiovascular Health Study, la relazione tra funzione endoteliale (misurata in termini di FMD) e l'incidenza di eventi cardiovascolari maggiori è stata analizzata in una coorte di 2700 soggetti apparentemente sani di età superiore ai 72 anni. In un periodo di follow-up di 5 anni, la sopravvivenza libera da malattia era significativamente più alta nei pazienti con funzione endoteliale normale; tale relazione si è mantenuta significativa anche dopo aggiustamento per i fattori di rischio tradizionali [151]. È interessante notare come la FMD in combinazione con lo score di Framingham permette di classificare il rischio cardiovascolare in maniera migliore rispetto alla FMD e allo score di Framingham considerati singolarmente [152]. In tutti gli studi condotti a riguardo, l'aggiustamento per i fattori di rischio tradizionali ha indebolito la correlazione tra la funzione endoteliale e gli outcome clinici. Ciò deriva dal fatto che la disfunzione endoteliale è il meccanismo chiave attraverso il quale i fattori di rischio cardiovascolari esercitano la loro azione promotrice sull'aterosclerosi e sugli eventi avversi.

Nonostante i dati supportino un ruolo per la FMD come predittore di eventi cardiovascolari, la misurazione della funzione endoteliale non è ancora raccomandata dalle linee guida per la prevenzione dell'ESC [153] o della American Heart Association (AHA) [154] e hanno ricevuto un livello di raccomandazione inferiore a quello assegnato alla misurazione della IMT carotidea e del calcium score coronarico. Tale scetticismo riconosce le sue ragioni nello scarso valore prognostico della funzione endoteliale e nella mancanza di standardizzazione delle varie tecniche impiegate. Sebbene la FMD abbia una grande sensibilità nel predire eventi cardiovascolari avversi, permangono dei dubbi sulla sua specificità. Tuttavia, con adeguate implementazioni della metodica e l'impiego di software di analisi più accurati, la variabilità delle misure e, dunque, la specificità potrebbero migliorare notevolmente. Considerando la funzione endoteliale come un processo dinamico (ad esempio con l'esecuzione di più misure nel tempo) e seguendo protocolli standardizzati, si potrebbero

ottenere misure riproducibili, specialmente in centri specialistici [126]. Il vantaggio principale della misurazione della funzione endoteliale risiede nella rapida risposta ad eventuali interventi (es. trattamenti farmacologici). Inoltre, questa tecnica è l'unica a fornire informazioni su alterazioni funzionali dell'endotelio, a differenza della misurazione della IMT e del calcium score, che si limitano ad analizzare la struttura dei vasi e dunque a diagnosticare la malattia aterosclerotica ad uno stadio più avanzato.

Oltre ad essersi dimostrata un valido predittore di eventi cardiovascolari, la disfunzione endoteliale nelle arterie periferiche e nel circolo coronarico contribuisce anche alla progressione dell'aterosclerosi [144]. Le placche aterosclerotiche dei segmenti epicardici a più alto grado di disfunzione endoteliale sono quelle che mostrano la maggiore vulnerabilità [155]. Questi segmenti, caratterizzati dalla perdita di attività dell'NO e da un aumento dell'attività dell'endotelina-1, hanno una maggiore probabilità di progredire in senso stenotico [156].

È interessante notare che la disfunzione microvascolare può contribuire ad uno squilibrio nella regolazione della perfusione miocardica riducendo la capacità di aumentare la perfusione in risposta all'esercizio fisico e allo stress mentale, circostanze che possono condurre a ischemia miocardica [157]. Nel contesto dell'infarto miocardico, la disfunzione microvascolare va considerata un importante mediatore di tale evento avverso, piuttosto che una sua conseguenza [158]. Questa, infatti, inducendo una riduzione del flusso coronarico, altera lo stress di parete a livello epicardico e dunque riduce la funzione endoteliale, con conseguente progressione nella formazione del trombo. Il diabete mellito, insieme agli altri determinanti della sindrome metabolica, ad esempio, esercita effetti deleteri sulla perfusione miocardica e sull'estensione dell'ischemia nei pazienti con infarto miocardico acuto [159]. Per questi motivi, alla disfunzione endoteliale microvascolare va riconosciuto un ruolo clinicamente rilevante nella progressione del danno miocardico.

Nella prevenzione secondaria, molteplici studi dimostrano che i pazienti che non mostrano un'adeguata risposta in termini di FMD agli interventi terapeutici, hanno un aumentato rischio di futuri eventi cardiovascolari [160]. Questi dati supportano l'applicabilità della misurazione della funzione endoteliale nel monitoraggio della risposta alla terapia, ma studi più ampi sono richiesti per comprendere quanto terapie mirate al miglioramento della FMD possano migliorare gli outcome clinici.

Per ciò che concerne la prevenzione primaria, non esiste ancora un consenso su come misurare la funzione endoteliale in individui apparentemente sani a basso rischio cardiovascolare. La FMD potrebbe essere implementata nella pratica clinica quotidiana dopo un'attenta scelta di una combinazione di test non invasivi standardizzati e riproducibili su larga scala.

2.8 Il Coenzima Q10

Il Coenzima Q (CoQ10 nell'uomo) è un componente fondamentale della catena respiratoria mitocondriale e, per anni, è stato riconosciuto principalmente per il suo ruolo nella fosforilazione ossidativa. Solo in seguito, la sua presenza è stata dimostrata in altre frazioni subcellulari e nelle lipoproteine plasmatiche, dove è dotato di proprietà antiossidanti. Al CoQ10 è stato attribuito anche un effetto sull'espressione genica [161]. Queste tre funzioni forniscono un razionale per il suo impiego nella pratica clinica e come supplemento dietetico.

2.8.1 Struttura e funzione bioenergetica

Il CoQ10 è stato isolato e caratterizzato da Festenstein *et al.* nel 1955. Due anni dopo, Crane *et al.* dimostrarono che questo composto è parte della catena respiratoria mitocondriale

membrana mitocondriale interna, assume la forma di ubiquinolo in seguito a protonazione. Successivamente, il CoQ10 rilascia i protoni nello spazio intermembrana, ritornando nella sua forma ossidata, l'ubichinone. Questa traslocazione, che avviene a livello del complesso III, contribuisce (insieme alle pompe protoniche dei complessi I e IV) a generare un potenziale di membrana, formato da una componente legata alla differenza di potenziale e da una componente derivante dal gradiente di concentrazione degli idrogenioni. La forza protonmotrice così ottenuta viene attivamente impiegata dall'ATP sintasi (anche detta complesso V o F_0F_1 ATPasi) per la sintesi di ATP [165].

Ciascuna molecola di CoQ10 è in grado di legare due atomi di idrogeno (ossia due protoni e due elettroni), circolando o nella forma ossidata, detta ubichinone, o nella forma ridotta, detta ubiquinolo. Pertanto, è possibile definire l'ubichinone come un accettore di elettroni e l'ubichinolo come un donatore di elettroni nella catena respiratoria, più specificamente a livello delle creste formate dalla membrana mitocondriale interna. Sebbene il CoQ10 sia una molecola relativamente ingombrante, questa è altamente mobile nell'ambiente lipofilo del doppio strato fosfolipidico, in cui i diversi centri catalitici responsabili della fosforilazione ossidativa sono situati. Inoltre, la concentrazione totale del CoQ10 ha un ruolo critico nel determinare la velocità della catena respiratoria, così come il rapporto ubiquinolo/CoQ10 totale [166].

Quest'ultimo concetto permette di comprendere il razionale che collega la classica funzione bioenergetica protonmotrice del CoQ10 con il suo ruolo antiossidante. Da una parte, tutte le condizioni di aumentato stress ossidativo riducono la disponibilità di CoQ10 per la catena respiratoria [167]. Dall'altra, la somministrazione esogena di CoQ10 permette di supplire agli stati carenziali indotti dallo stress ossidativo e, dunque, di ripristinare la piena funzionalità della catena respiratoria [168].

2.8.2 Fonti endogene ed esogene

Il CoQ10, largamente diffuso in natura, è contenuto in molti tessuti vegetali e animali, parte della comune dieta umana. Tuttavia può anche essere sintetizzato dall'organismo, ragione per la quale non può essere definito una vitamina, secondo la definizione classica. Per questo motivo, i livelli di CoQ10 nei vari organi e tessuti dipendono sia da una biosintesi endogena, sia dall'assunzione esogena. La domanda metabolica e il tasso di turnover del CoQ10 dovrebbero essere presi in considerazione nel verificare lo "stato nutrizionale" del CoQ10.

Il contenuto di CoQ9 e CoQ10 di differenti tipi di alimenti è stato valutato da Kamei *et al.* [169]. Il CoQ9 è normalmente presente nei cereali, mentre il CoQ10 si ritrova in una più ampia varietà di fonti, che comprendono carne, latte, frutta e verdura. Le fonti nutrizionali di CoQ10 forniscono entrambe le forme, ubiquinone e ubiquinolo [170]. Ad esempio, entrambe le forme del CoQ10 sono presenti nella soia (in concentrazione pari a 6 µg/g), con l'ubichinolo presente in concentrazioni maggiori rispetto all'ubichinone. Il CoQ10 è presente anche nelle noci, nelle mandorle, negli oli vegetali e nelle verdure a foglia larga, in particolare gli spinaci. Alcuni tipi di pesci contengono quantità di CoQ10 relativamente elevate. A parità di peso, le sardine contengono più del doppio di CoQ10 rispetto alla carne di manzo (1.6 kg di sardine contengono 100 mg di CoQ10). Latte e derivati, invece, contengono un basso quantitativo di CoQ10. Rimane comunque difficile stabilire l'importanza relativa della sintesi endogena e dell'assunzione esogena. Uno studio clinico condotto su pazienti in regime di nutrizione parenterale totale (NPT), ha mostrato che in questi soggetti i livelli di CoQ10 si riducono del 50% in una settimana [171]. In questo caso è difficile stabilire se tale riduzione sia dovuta alle cause sistemiche che hanno portato il paziente a necessitare della NPT o se questa sia un effetto della NPT stessa.

La via biosintetica del CoQ10 condivide degli step con quella del colesterolo [165]. Infatti, colesterolo e coenzima Q rappresentano i prodotti finali di un'importante via biosintetica posta sotto il controllo di un enzima chiave, l'HMG-CoA reduttasi. Come esposto in precedenza, gli inibitori dell'HMG-CoA, le statine, rappresentano i farmaci di più largo impiego nelle dislipidemie. Dal momento che il CoQ10 e il colesterolo condividono la stessa via biosintetica, è ragionevole ipotizzare che la terapia con statine possa portare ad una riduzione dei livelli di CoQ10. Nel 1993, Littarru e collaboratori hanno dimostrato che simvastatina e pravastatina inibiscono la sintesi del CoQ10 al pari di quella del colesterolo, evidenza confermata successivamente da molti altri studi [172]. Nel 2001 venne dimostrata una chiara relazione tra l'uso di cerivastatina e la comparsa di rhabdomiolisi, di entità tale da provocare la morte di alcuni pazienti [173]. Gli effetti avversi delle statine includono debolezza muscolare, dolore, elevazione della creatin chinasi e delle transaminasi; tali effetti potrebbero essere in parte ascrivibili ad una carenza relativa di CoQ10 [174]. Si può ipotizzare, pertanto, che il trattamento con statine potrebbe aggravare quelle condizioni cliniche causate in parte dalla diminuzione dei livelli ematici di CoQ10. Una contrazione fisiologica dei livelli di CoQ10 si verifica con l'età e ciò potrebbe spiegare la maggiore suscettibilità degli anziani al danno muscolare da statine.

Sulla base di queste osservazioni, sembra logico ipotizzare che la supplementazione con CoQ10 possa rappresentare un appropriato strumento terapeutico per prevenire e contrastare gli effetti avversi del trattamento con statine. Ad oggi, solo pochi studi hanno dimostrato l'efficacia della supplementazione con CoQ10 nel miglioramento della mialgia e dell'astenia associata alle statine. Folkers *et al.* hanno dimostrato che l'introduzione della terapia con statine si associa ad un rapido deterioramento della performance cardiaca, rallentato in parte dalla concomitante somministrazione di CoQ10 [175]. Evidenze simili provengono dagli studi di altri gruppi di ricerca, che convergono nell'affermare che il CoQ10

possa offrire una valida alternativa all'interruzione del trattamento con statine nei pazienti dislipidemici [176]. Tuttavia, studi clinici randomizzati su coorti più ampie di pazienti sono richiesti per dimostrare il ruolo eziologico della carenza di CoQ10 nella miopatia associata alle statine.

2.8.3 Livelli plasmatici di Coenzima Q10

Il CoQ10 è presente anche nel sangue, oltre che a livello tissutale, dove viene trasportato dalle lipoproteine plasmatiche, principalmente dalle LDL. I livelli ematici di CoQ10 hanno implicazioni metaboliche e diagnostiche ben definite. Il CoQ10 è presente in ogni elemento corpuscolato del sangue. I leucociti e le piastrine, essendo dotati di mitocondri, contengono CoQ10. Questo, tuttavia, è contenuto anche nei globuli rossi, dove svolge un'azione antiossidante. La somministrazione di CoQ10 permette agli eritrociti di diventare più resistente al danno termico e preserva la funzione della loro pompa sodio-potassio. I livelli plasmatici di CoQ10 possono essere determinati al fine di monitorare l'aderenza all'eventuale supplementazione e monitorarne la biodisponibilità [177].

I livelli plasmatici di CoQ10 non correlano necessariamente con il contenuto tissutale. Le concentrazioni plasmatiche di CoQ10 sono rilevanti principalmente per due ragioni. Primo, queste riflettono la domanda metabolica dei tessuti periferici; secondo, il CoQ10 svolge un'azione antiossidante intrinseca proteggendo le LDL dal danno mediato dai ROS [178].

La maggioranza del CoQ10 è contenuto nel plasma, piuttosto che negli elementi corpuscolati. Circa il 60% del CoQ10 è associato alle LDL, il 26% alle HDL e il 14% ad altre lipoproteine. Nelle LDL, il CoQ10 si trova principalmente nella sua forma ridotta, l'ubichinolo. Dal momento che tutto il CoQ10 trasportato dal sangue è virtualmente legato al colesterolo, si ritiene che il contenuto di CoQ10 debba essere espresso sia in termini

assoluti di concentrazione ($\mu\text{g/ml}$), sia come rapporto CoQ10/colesterolo (nmol CoQ10/nmol di colesterolo) [179]. Infatti, i pazienti con ipercolesterolemia, avendo livelli più alti di LDL, hanno generalmente livelli più alti di CoQ10. Per questo motivo, un livello apparentemente alto di CoQ10 potrebbe in realtà risultare insufficiente.

Uno studio condotto su pazienti con scompenso cardiaco cronico ha dimostrato che i livelli plasmatici di CoQ10 e il rapporto CoQ10/colesterolo totale rappresentano predittori indipendenti di sopravvivenza. La forza dell'associazione tra bassi livelli di CoQ10 e mortalità è addirittura più elevata di quella osservata per l'NT-proBNP, un marker riconosciuto di scompenso cardiaco. Gli autori hanno pertanto ipotizzato che la carenza di CoQ10 possa rappresentare un importante meccanismo patogenetico associato ad una peggiore prognosi nello scompenso cardiaco cronico [180].

2.8.4 Proprietà antiossidanti

Oltre al già discusso ruolo bioenergetico, vi sono forti evidenze che dimostrano che il CoQ10 funziona da antiossidante solubile nelle membrane biologiche [181, 182]. L'ubichinolo agisce rallentando la propagazione delle reazioni a catena che conducono, ad esempio, alla perossidazione lipidica. Un altro importante meccanismo antiossidante prevede la capacità del CoQ10 di rigenerare l' α -tocoferolo, la forma attiva della vitamina E, riducendo il radicale tocoferile [183]. È importante notare che il CoQ10 è l'unico antiossidante liposolubile che le cellule animali sono in grado di sintetizzare "de novo" e per il quale esistono adeguati meccanismi enzimatici in grado di rigenerarne la forma ridotta [184]. La prima dimostrazione del ruolo antiossidante del CoQ10 risale a molti anni fa, quando si scoprì che il CoQ10 è in grado di inattivare la metaemoglobina, molecola in grado di innescare il danno ossidativo a livello del muscolo scheletrico e del miocardio [185].

Il ruolo antiossidante del CoQ10 è stato investigato principalmente a livello lipidico, con una particolare attenzione alla sua capacità di contrastare la perossidazione lipidica. Il CoQ10 è anche in grado di prevenire l'ossidazione delle proteine e del DNA, in maniera proporzionale ai suoi livelli plasmatici [186]. Non solo, il CoQ10 influenza positivamente anche l'attività degli enzimi deputati alla riparazione del DNA [187]. Questo ruolo può risultare fondamentale in quelle condizioni, anche congenite, dove gli effetti clinici rappresentano una conseguenza diretta del danno al DNA.

Il ruolo antiossidante del CoQ10 nei confronti delle lipoproteine plasmatiche è di vitale importanza, in quanto queste, specialmente le LDL, sono facilmente soggette all'ossidazione. In particolare, le LDL sono particolarmente ricche di acidi grassi polinsaturi, come l'acido linoleico e l'acido arachidonico, che sono facilmente perossidabili. La supplementazione dietetica con acido oleico (monoinsaturo), riduce significativamente la perossidabilità delle LDL [188]. L'ossidazione delle LDL è il risultato di un delicato equilibrio tra stress ossidativo ed efficacia dei meccanismi antiossidanti. Fino ai primi anni '90, si riteneva che l'acido ascorbico e l' α -tocoferolo fossero i primi antiossidanti ad intervenire e a consumarsi, seguiti dal licopene e dal carotene. Solo in seguito fu dimostrato che l'ubichinolo è l'antiossidante più reattivo nelle LDL e che la supplementazione orale con CoQ10, anche di pochi giorni, rende le LDL più resistenti al danno ossidativo [189]. La protezione delle LDL dall'ossidazione rappresenta uno degli effetti benefici dell'ubichinolo a livello arterioso. Ulteriori esperimenti hanno confermato che la vulnerabilità delle LDL è direttamente correlata al loro contenuto in acidi grassi polinsaturi e, dall'altra parte, inversamente correlata al contenuto di ubichinolo. La dimostrazione del ruolo protettivo dell'ubichinolo sulle LDL non rappresenta di per sé una dimostrazione del suo effetto antiaterogeno. Per spiegare tale meccanismo, Stocker *et al.* hanno dimostrato che la supplementazione con CoQ10 in topi knockout per l'ApoE riduce significativamente l'aterosclerosi della radice e

dell'arco aortico, ma non dell'aorta discendente toracica, mentre la vitamina E esercita la sua azione antiaterogena solo sull'arco aortico [190]. Un altro studio ha dimostrato che il trattamento con CoQ10 riduce significativamente la dimensione, l'ulcerazione, la capacità trombogena e l'emorragia delle placche aterosclerotiche [191].

Altro aspetto rilevante nella biologia del CoQ10 è il rapporto plasmatico tra la forma ossidata e quella ridotta. Lo stato ossidativo del CoQ10 è espresso generalmente come rapporto percentuale ubiquinolo/CoQ10 totale o ubiquinone/CoQ10 totale. Nel plasma fresco, il CoQ10 è presente quasi interamente in forma ridotta (95%). Una diminuzione nel rapporto ubiquinone/CoQ10 totale è un marker estremamente sensibile di un miglioramento nello stato dei sistemi antiossidanti. Un aumento del livello plasmatico totale protegge il CoQ10 dalla sua ossidazione spontanea. Analogamente, l'aumento del contenuto di CoQ10 nelle LDL le protegge dalla perossidazione [192]. Ad ulteriore prova di ciò, lo studio dei livelli plasmatici in una popolazione di individui indiani, notoriamente più suscettibili alle malattie cardiovascolari, ha dimostrato che questi hanno livelli plasmatici di ubiquinolo e di CoQ10 totale più bassi rispetto ad una popolazione cinese di controllo residente nella stessa zona [193].

2.8.5 Effetti benefici della supplementazione con Coenzima Q10

Nella catena respiratoria mitocondriale, il CoQ10 viene continuamente ridotto e ossidato da specifici enzimi. Anche nei sistemi extracellulari, come il plasma e il liquido seminale, il CoQ10 è presente in entrambe le forme, ubiquinone e ubiquinolo. Ciò significa che anche a livello extracellulare esistono diversi sistemi enzimatici in grado di rigenerare l'ubichinolo, le cosiddette CoQ10 reduttasi extra-mitocondriali [166]. Se si considerano le sue funzioni antiossidanti, l'ubichinolo è la forma attiva del CoQ10. La forma più comunque di CoQ10 come supplemento alimentare è quella ossidata. La multinazionale Kaneka, invece, detiene

il brevetto per la sintesi della forma ridotta. L'organismo umano è in grado di ridurre l'ubichinone a ubichinolo, tuttavia, la somministrazione diretta della forma ridotta può rivelarsi più efficace in alcune situazioni. È noto che la somministrazione prolungata di CoQ10 provoca leggeri incrementi del contenuto di ubichinolo nel cuore, nel muscolo scheletrico e in altri organi, mentre elevati quantitativi di CoQ10 vengono riscontrati nel fegato e nel plasma [194].

Il CoQ10 deve essere prima convertito a ubichinolo per essere assorbito dal tratto digerente. L'attività delle reduttasi sopramenzionate comporta l'inevitabile ossidazione di altre molecole donatrici di elettroni; ciò costituisce un ulteriore carico di lavoro biochimico per l'organismo. Inoltre, l'attività delle reduttasi, in particolare della DT-diaforasi (NQO1) e la concentrazione dei donatori di elettroni (tra cui il NADPH) subiscono un inevitabile declino con l'età [195].

Evidenze sperimentali permettono di affermare che la biodisponibilità dell'ubichinolo, somministrato per via orale, è superiore alla biodisponibilità dell'ubichinone. Per ottenere i livelli plasmatici di CoQ10 che si raggiungono in seguito alla somministrazione di ubichinolo è necessario un dosaggio di ubichinone 3 volte superiore. In maniera simile, a parità di dosaggio, gli effetti benefici, in termini biochimici e clinici, sono di gran lunga superiori quando il CoQ10 viene somministrato nella sua forma ridotta [196].

2.8.6 Ruolo del Coenzima Q10 nelle malattie cardiovascolari

Il CoQ10 è stato scoperto per la prima volta nel cuore, che ne contiene quantità molto elevate. I primi studi, risalenti agli anni '70, furono condotti su materiale biotico proveniente da interventi di cardiocirurgia e dimostrarono un certo grado di carenza di CoQ10 nel miocardio di pazienti con scompenso cardiaco, proporzionale alle manifestazioni cliniche

della patologia. Ulteriori studi si resero necessari per comprendere che la carenza di CoQ10, pur non rappresentando la causa dello scompenso, contribuiva al progressivo decadimento della performance cardiaca [197]. Sulla base di queste osservazioni, venne sperimentata la supplementazione di CoQ10 come trattamento complementare dello scompenso cardiaco cronico. Negli anni successivi fu dimostrato un effetto significativo del CoQ10 nella riduzione della pressione arteriosa, con un meccanismo che coinvolge probabilmente le proprietà antiossidanti del CoQ10 [198]. L'effetto positivo dell'ubichinolo nelle malattie cardiovascolari si basa sia sul suo ruolo bioenergetico, sia sul suo potere antiossidante, che contrasta efficacemente la disfunzione endoteliale.

I primi studi sull'impiego del CoQ10 in ambito cardiologico furono condotti dai gruppi di Folkers e Langsjoen. In particolare, un trial avviato nel 1981 dimostrò che la somministrazione di CoQ10 a soggetti affetti da cardiomiopatia dilatativa, in stadio NYHA III e IV, migliorava significativamente la funzione cardiaca e le condizioni cliniche, con associato aumento dei livelli plasmatici di CoQ10. In una coorte di 126 pazienti, la supplementazione con CoQ10 per 6 mesi migliorò significativamente la frazione di eiezione, dal 41% al 59%, valore vicino alla condizione fisiologica. Il 71% dei pazienti raggiunse un miglioramento significativo della frazione di eiezione dopo 3 mesi di trattamento, un ulteriore 16% dopo 6 mesi. In 106 soggetti si osservò il miglioramento di una o addirittura due classi NYHA di scompenso cardiaco, dovuto ad un netto incremento della performance cardiaca [199].

Successivi studi dimostrarono un significativo miglioramento nei pazienti della percezione del proprio stato di salute e della propria performance fisica, nonché la riduzione dei sintomi associati quali dispnea, nicturia e astenia. Inoltre, sempre con riferimento allo scompenso cardiaco, la percentuale di pazienti che richiedono uno o più ricoveri ospedalieri durante il trattamento con CoQ10 è pari a circa la metà dei pazienti trattati con placebo [200].

Nello scompenso cardiaco si assiste ad un aumento della produzione di radicali liberi. Il cuore è sotto il controllo del sistema nervoso autonomo e il cuore scompensato va incontro ad una serie di meccanismi reattivi che implicano un incrementato rilascio di catecolamine, che accelerano lo scompenso stesso. Ad esempio, la maggiore incidenza di aritmie nei pazienti scompensati può essere ragionevolmente collegata, almeno in parte, all'iperstimolazione cardiaca da parte delle catecolamine. In presenza di un loro eccesso, è inevitabile l'aumento dell'attività delle vie metaboliche deputate alla loro degradazione. Una di queste coinvolge l'anione superossido e, dunque, anche altri ROS [201]. In tale situazione si verifica un consumo di CoQ10, per cui è ipotizzabile che l'effetto benefico del CoQ10 in tale patologia sia legato anche al suo ruolo antiossidante.

Particolarmente meritevole di menzione è lo studio Q-Symbio, coordinato dal Prof. Mortensen, che ha indagato gli effetti del CoQ10 (100 mg/die) sui sintomi, sulla funzione cardiaca, sui marker biochimici (NT-proBNP) e sugli outcome a lungo termine, morbilità e mortalità, su 420 pazienti (di cui 202 trattati con CoQ10) con scompenso cardiaco [202]. Gli autori hanno concluso che la supplementazione di CoQ10 può migliorare la sopravvivenza nello scompenso cardiaco cronico, riducendo i tassi di ricovero per peggioramento della patologia e la mortalità cardiovascolare, come risultato del miglioramento della funzione cardiaca. In questo studio, il trattamento con CoQ10 ha ridotto anche la mortalità generale, con un ottimo profilo di sicurezza e tollerabilità.

2.8.7 Coenzima Q10 e funzione endoteliale

Come già trattato in precedenza, la ridotta biodisponibilità di NO è in grado di indurre disfunzione endoteliale a livello delle arterie di conduzione, condizione che predispone allo sviluppo di aterosclerosi. La biodisponibilità di NO varia in funzione della sua sintesi da parte delle cellule endoteliali e della sua eliminazione, potenzialmente accelerata dallo stress

ossidativo. È noto che l'anione superossido è uno dei responsabili principali dell'inattivazione dell'NO [203]. La matrice extracellulare è ricca di sistemi di difesa contro l'ossidazione dell'NO. Questi sono rappresentati principalmente dalla superossido dismutasi extracellulare (ecSOD), un enzima in grado di neutralizzare il superossido [204]. Partendo dall'ipotesi che il CoQ10 possa influenzare positivamente la funzione endoteliale, misurata tramite FMD, molti studi sono stati condotti su soggetti affetti da patologie notoriamente collegate all'aterosclerosi, quali il diabete mellito di tipo 2 [205] e la cardiopatia ischemica [206]. In particolare, il CoQ10 ha migliorato la funzione endoteliale in pazienti con malattia coronarica al pari dell'esercizio fisico aerobico. Non solo, la combinazione di CoQ10 ed esercizio fisico ha un effetto sinergico e migliora la funzione endoteliale più di quanto lo facciano i due interventi considerati singolarmente. Uno dei meccanismi proposti, e dimostrati da Littarru e collaboratori, è l'induzione, da parte del CoQ10, di un aumento dei livelli di ecSOD. Tale effetto è stato osservato in maniera ancora più evidente nei soggetti con un elevato grado di disfunzione endoteliale [207].

L'ubichinolo influenza anche i processi infiammatori che contribuiscono a determinare la disfunzione endoteliale tramite la riduzione della biodisponibilità di NO. L'impiego di modelli *in vitro* che permettono di simulare l'invecchiamento delle cellule endoteliali ha permesso di valutare l'effetto modulatore dell'ubichinolo sulla risposta infiammatoria associata alla senescenza. Nelle cellule endoteliali senescenti, l'aumentato rilascio di mediatori dell'infiammazione è indotto dalla modulazione di specifici pathway di signalling intracellulare regolati da piccoli RNA non codificanti, i miRNA. L'esposizione all'ubichinolo delle cellule endoteliali giovani provoca il silenziamento del signalling pro-infiammatorio, risultando in un ridotto rilascio di interleuchina-6, il principale mediatore del cosiddetto fenotipo secretorio associato alla senescenza (SASP) [208]. Un risultato simile è stato ottenuto sulle cellule senescenti, anche se il silenziamento dei miRNA non si è tradotto in

una riduzione significativa dei livelli di IL-6, probabilmente a causa dell'elevato carico infiammatorio a cui queste cellule sono sottoposte.

Riassumendo, è possibile affermare che sia la resistenza delle LDL alla perossidazione, sia la funzione endoteliale, sono influenzate positivamente dalle concentrazioni plasmatiche di ubiquinolo, fortemente incrementabili ricorrendo alla supplementazione esogena di CoQ10.

3. OBIETTIVI DELLO STUDIO

Alla luce delle considerazioni sopra esposte, l'obiettivo del nostro studio è stato quello di valutare l'impatto della supplementazione con ubiquinolo (coenzima Q10 ridotto, forma ridotta dell'ubichinone) sulla funzione endoteliale e sullo stress ossidativo. In particolare, gli endpoint primari e secondari dello studio sono i seguenti.

3.1 Endpoint primario

Variazione della vasodilatazione endotelio-dipendente, valutata mediante flow-mediated dilation (FMD) a livello dell'arteria brachiale, a 8 settimane dal reclutamento, con confronto tra soggetti trattati e gruppo placebo.

3.2 Endpoint secondari

Valutazione dei seguenti parametri, con confronto tra soggetti trattati e placebo:

- Variazione della vasodilatazione endotelio-dipendente a 4 settimane dal reclutamento;

- Variazione dei livelli di coenzima Q10 ossidato e ridotto a 4 e 8 settimane dal reclutamento;
- Valutazione dei livelli plasmatici di ossido nitrico, quantificati indirettamente in termini dei suoi metaboliti secondari (nitrati e nitriti) al reclutamento e dopo 8 settimane;
- Determinazione dei livelli plasmatici di perossinitrito mediante valutazione dell'inattivazione ossidativa dell'ossido nitrico a perossinitrito attraverso l'impiego di sonde fluorescenti al reclutamento e dopo 8 settimane.

4. SOGGETTI E METODI

4.1 Disegno dello studio

Lo studio Uicol QHHC-FMD-PILOT è un trial in doppio cieco, randomizzato, controllato da placebo, a gruppi paralleli condotto su 51 soggetti suddivisi in 3 gruppi di intervento.

L'arruolamento e le visite dei soggetti si sono svolte presso l'Unità Operativa Complessa di Cardiologia/UTIC/Telemedicina dell'Istituto Nazionale di Ricovero e Cura per Anziani (INRCA) di Ancona, tra settembre 2016 e giugno 2017.

Al momento di ciascuna visita, ai soggetti veniva richiesto di:

- Rimanere a digiuno per le 12 ore precedenti;
- Evitare il consumo di caffeina per le 72 ore precedenti;
- Evitare il consumo di alimenti ad alto contenuto lipidico il giorno precedente;
- Evitare il fumo di sigaretta per le 6 ore precedenti;
- Astenersi dall'esercizio fisico nelle 24 ore precedenti alla visita.

Durante la visita di Screening sono stati verificati i criteri di eleggibilità e, qualora soddisfatti, il soggetto è stato randomizzato in uno dei 3 gruppi in studio successivamente alla firma del modulo di consenso informato.

Durante ciascuna visita (Reclutamento, 4 settimane, 8 settimane), sono stati effettuati un breve esame obiettivo ed un prelievo di sangue venoso (circa 10 ml) per la valutazione dei livelli plasmatici di CoQ10 e degli altri endpoint secondari. Dopo una fase di acclimatamento della durata di almeno 30 minuti, sono state misurate la pressione arteriosa (su 3 misurazioni) e la FMD.

Al momento del reclutamento, e alla visita 1 (4 settimane), i soggetti hanno ricevuto il prodotto in studio assegnato, in accordo con la randomizzazione, per l'assunzione a domicilio nelle successive 4 settimane. Il prodotto in studio assegnato poteva essere ubiquinolo (100 o 200 mg al giorno), oppure placebo. I dettagli relativi alla natura del prodotto sono forniti da dossier accompagnatori in possesso del principal investigator. Il prodotto doveva essere assunto quotidianamente a colazione e a cena.

4.2 Selezione e ritiro dei soggetti

La dimensione campionaria è stata fissata in 51 soggetti, 17 per gruppo, adulti, sani, di sesso maschile o femminile. Dal momento che la FMD subisce delle variazioni dovute al ciclo mestruale, lo studio è stato condotto solo su donne in menopausa. I soggetti sono stati reclutati tra quelli che si sono recati autonomamente presso l'U.O.C. Laboratorio Analisi dell'INRCA per effettuare analisi di routine, che includessero il profilo lipidico completo. I criteri di inclusione ed esclusione vengono di seguito riportati.

4.2.1 Criteri di inclusione

- Uomini di età compresa tra 35 e 65 anni (compresi);
- Donne in menopausa da almeno un anno e di età inferiore ai 65 anni compresi;
- Soggetti che hanno ricevuto consigli finalizzati alla prevenzione primaria (es. stili di vita) ma mai trattati farmacologicamente;
- Valori di FMD al reclutamento compresi tra 2.5% e 6%.
- Indice di massa corporea (BMI) compreso tra 18.5 e 29.9 kg/m²;
- Livelli di colesterolo LDL (determinazione diretta) compresi tra 130 e 200 mg/dl, basati su precedente valutazione effettuata precedente presso il Laboratorio Analisi dell'INRCA non più di 60 giorni prima dell'arruolamento.

4.2.2 Criteri di esclusione

- Assunzione nell'anno precedente all'arruolamento di qualsiasi tipo di farmaco indicato per il trattamento di patologie cardiovascolari;
- Partecipazione ad altre sperimentazioni scientifiche di ogni tipo durante il trial;
- Variazione del peso corporeo superiore al 5% nel mese precedente all'arruolamento;
- Assunzione di terapie ipolipemizzanti nel mese precedente all'arruolamento, ivi compresi i supplementi alimentari noti per alterare il profilo lipidico, quali niacina (>100 mg/die), aglio (>600 mg/die), acidi grassi omega-3 (>1 g/die), estratto di riso rosso fermentato, fitostanoli/fitosteroli (>0.5 g/gie), fibra solubile (>1 g/die), chitosano (>1 g/die), acido linoleico coniugato (CLA, >3 g /die);

- Assunzione di farmaci inibitori della fosfodiesterasi (es. sildenafil citrato, tadalafil, vardenafil) e donatori di NO quali derivati della nitroglicerina (GTN) a lunga durata (isosorbide dinitrato, nitrato di amile/butile);
- Assunzione di corticosteroidi sistemici (ad eccezione di quelli inalatori), orlistat, resine leganti gli acidi biliari, terapia ormonale ciclica o discontinua (estrogeni, testosterone);
- Consumo di più di due unità alcoliche al giorno. Per unità si intendono 12 grammi di etanolo, ad esempio quelli contenuti in mezzo bicchiere di vino (125 ml), una lattina di birra o una dose di superalcolico (4 cl);
- Consumo di prodotti arricchiti in flavonoidi;
- Consumo di prodotti arricchiti in vitamina C;
- Diagnosi di diabete mellito di tipo 1 o 2, insufficienza renale o epatica, patologie tiroidee;
- Malattia cardiovascolare nota, inclusa l'anamnesi di eventi cardiovascolari quali stroke e infarto del miocardico, ad eccezioni giudicate non clinicamente significative dallo sperimentatore (es. lesioni aterosclerotiche in stadio iniziale osservate ecograficamente);
- Storia di patologie gastrointestinali significative quali stipsi severa, diarrea, malassorbimento, malattie infiammatorie croniche intestinali (morbo di Crohn, rettocolite ulcerosa);
- Storia di patologie psichiatriche gravi che, secondo il giudizio dello sperimentatore, possano compromettere un'ottimale partecipazione allo studio;

- Storia di neoplasie nei 5 anni precedenti l'arruolamento (ad eccezione di carcinomi basocellulari o squamocellulari cutanei trattati con successo);
- Sieropositività HIV nota;
- Storia di chirurgia bariatrica;
- Allergia al prodotto in studio o agli eccipienti contenuti nel prodotto in studio o nel placebo;
- Fumatori di più di 10 sigarette al giorno;
- Soggetti che, su giudizio dello sperimentatore, mostrano un elevato rischio di non aderenza al protocollo di studio.

4.2.3 Restrizioni dietetiche

Per l'intera durata dello studio, ai soggetti non era consentito assumere:

- Supplementi alimentari noti per alterare il profilo lipidico, quali niacina (>100 mg/die), aglio (>600 mg/die), acidi grassi omega-3 (>1 g/die), estratto di riso rosso fermentato, fitostanoli/fitosteroli (>0.5 g/die), fibra solubile (>1 g/die), chitosano (>1 g/die), acido linoleico coniugato (CLA, >3 g /die);
- Più di due unità alcoliche al giorno;
- Qualsiasi altro supplemento contenente ubiquinolo o ubiquinone;
- Supplementi a base di vitamina C.

4.2.4 Ritiro dei soggetti

I soggetti potevano ritirarsi dallo studio in ogni momento. In aggiunta, il principal investigator o figura da esso individuata poteva ritirare un soggetto dallo studio per qualsiasi ragione, nell'interesse del soggetto stesso. Ogni ritiro di un soggetto è stato seguito dalla compilazione di un modulo dedicato in cui venivano dichiarate le ragioni del ritiro, analizzando ogni eventuale evento avverso. Le ragioni del ritiro dei soggetti persi al follow up sono state indagate telefonicamente.

4.3 Randomizzazione e cieco

Per randomizzare i soggetti reclutati nei 3 gruppi di trattamento è stata utilizzata una sequenza di numeri casuali generata da un computer. A ciascun soggetto eleggibile è stato assegnato un numero, seguendo l'ordine di reclutamento nello studio. Il prodotto è stato assegnato a ciascun soggetto associandolo casualmente ad ogni numero precedente individuato. I soggetti che si ritirano dallo studio dopo aver ricevuto almeno una dose del prodotto non sono stati sostituiti.

Lo studio in doppio cieco prevede che sia il paziente, sia gli sperimentatori, non siano al corrente del prodotto assegnato fino al termine di tutte le procedure connesse al trial. Le capsule di placebo erano identiche in termini di colore, forma e peso alle capsule di ubichinolo, sebbene prive di principio attivo. La codifica che permetteva di risalire al tipo di prodotto somministrato partendo dal codice di trattamento è stata resa disponibile solo al farmacista incaricato della distribuzione dei prodotti.

4.3.1 Rottura dei codici

La rottura dei codici è stata operata solo al termine dello studio, dopo un incontro tra principal investigator e gli sperimentatori, una volta preso atto dell'assenza di eventi avversi e una volta finalizzati i dati sperimentali.

4.4 Prodotto in studio

Il prodotto in studio, ubichinolo 100 mg, è stato fornito in forma di capsule molli da Kaneka, Osaka, Giappone. Ciascuna capsula molle conteneva 100 mg di ubichinolo (Kaneka QH™, forma attiva del CoQ10). Il prodotto conteneva anche soia ed altri eccipienti: trigliceridi a media catena, gelatina, glicerina, palmitato di ascorbile, acqua purificata, cera d'api, lecitina di soia, estratto di annatto (E160b).

Il placebo si presentava in forma di capsule molli, di aspetto del tutto simile al prodotto in studio, ma privo di principio attivo.

I soggetti dovevano assumere quotidianamente due capsule molli secondo il seguente schema.

	Numero di capsule molli/die	
	Ubichinolo-QH 100 mg	Placebo
Gruppo A: Ubichinolo 200 mg/die	2	0
Gruppo B: Ubichinolo 100 mg/die	1	1
Gruppo C: Placebo	0	2

4.4.1 Modalità di somministrazione

I prodotti in studio, forniti sotto forma di capsule molli, sono stati assunti dai soggetti a domicilio la mattina e la sera, in concomitanza con i pasti (colazione e cena).

4.4.2 Modalità di conservazione

I prodotti in studio sono stati conservati nella Farmacia dell'INRCA di Ancona. Le confezioni di prodotto sono state rilasciate esclusivamente al principal investigator e alle figure da esso designate.

4.5 Valutazione degli endpoint primari e secondari

4.5.1 Visite eseguite sui soggetti

4.5.1.1 Visita T0 – Visita di reclutamento

La visita di reclutamento si apre con l'informativa scritta e orale sulle procedure e sul prodotto in studio fornita dallo sperimentatore al soggetto. Ai soggetti è stata fornita la possibilità di fare domande allo sperimentatore, nonché il tempo materiale per prendere una decisione in merito alla partecipazione allo studio. Ai soggetti che hanno fornito il consenso alla partecipazione sono stati forniti il modulo di consenso informato, da restituire firmato, l'informativa sulla privacy e la lettera al medico curante. Ai soggetti è stato ricordato di presentarsi a ciascuna visita seguendo le istruzioni riportate al punto 4.1.

La visita di reclutamento prevede le seguenti fasi:

- Firma del modulo di consenso informato;

- Verifica dei criteri di inclusione/esclusione;
- Anamnesi familiare e personale (patologica e farmacologica);
- Breve esame obiettivo;
- Misurazione di peso e altezza (per il calcolo del BMI).

I soggetti considerati eleggibili per la randomizzazione sono stati randomizzati mediante assegnazione di un numero progressivo di arruolamento. Successivamente sono state condotte le seguenti procedure:

- Illustrazione delle restrizioni dietetiche da seguire per l'intera durata dello studio;
- Raccolta di un campione ematico per l'analisi dei parametri di laboratorio (trigliceridi, colesterolo totale, colesterolo HDL, colesterolo LDL, glucosio, proteina C-reattiva, emocromo + formula leucocitaria, creatinina), dei livelli di CoQ10 ossidato/ridotto, ossido nitrico e perossinitrito;
- Acclimatazione;
- Misurazione della pressione arteriosa (media di tre misurazioni);
- Misurazione della funzione endoteliale mediante tecnica FMD.
- Consegna al soggetto dei prodotti in studio, in accordo con la randomizzazione;
- Consegna al soggetto del diario per la successiva compilazione.

I soggetti saranno istruiti sulle modalità di assunzione del prodotto e sulla compilazione del diario. Il diario e le confezioni del prodotto in studio, anche se vuote, dovranno essere restituiti alla visita successiva, programmata dopo 4 settimane.

4.5.1.2 Visita T1 e T2

Durante le visite T1 e T2, condotte rispettivamente a 4 e 8 settimane dall'arruolamento sono state effettuate le seguenti procedure:

- Conferma dei criteri di inclusione/esclusione;
- Verifica della compliance al trattamento e del rispetto delle restrizioni dietetiche;
- Annotazione di eventuali eventi avversi;
- Raccolta di un campione ematico per l'analisi dei parametri di laboratorio (trigliceridi, colesterolo totale, colesterolo HDL, colesterolo LDL, glucosio, proteina C-reattiva, emocromo + formula leucocitaria, creatinina), dei livelli di CoQ10 ossidato/ridotto, ossido nitrico e perossinitrito;
- Acclimatazione;
- Misurazione della pressione arteriosa (media di tre misurazioni);
- Misurazione della funzione endoteliale mediante tecnica FMD.
- Consegna al soggetto dei prodotti in studio, in accordo con la randomizzazione (solo visita T1);
- Consegna al soggetto del diario per la successiva compilazione (solo visita T1).

4.5.2 Misurazione della funzione endoteliale

La misurazione della funzione endoteliale è stata effettuata mediante la tecnica della flow-mediated dilation (FMD) dell'arteria brachiale da parte di un medico sperimentatore adeguatamente formato allo scopo. Un periodo di acclimatazione di almeno 30 minuti è

richiesto prima di iniziare la misurazione. Durante questo intervallo sono state fornite al soggetto informazioni sull'esame in questione. Il soggetto è stato posizionato supino su un lettino, mantenuto in posizione fissa, con il braccio destro appoggiato su un supporto dedicato. In tale fase, lo sperimentatore deve accertarsi che il lettino e il supporto si trovino allo stesso livello, che la mano e il gomito del soggetto siano appoggiati sul supporto con il palmo e la faccia volare verso l'alto, che le gambe del soggetto non siano incrociate e che non esistano condizioni che possano potenzialmente compromettere l'immobilità del soggetto durante l'intera durata della misurazione, che si svolge come segue:

- Posizionamento del soggetto sul lettino in posizione confortevole;
- Il braccio destro del soggetto è posizionato su un supporto dedicato e immobilizzato
- Il bracciale dello sfigmomanometro viene posizionato sull'avambraccio del soggetto e la distanza tra questo e la piega antecubitale (2-5 cm) viene annotata per le successive misurazioni;
- Posizionamento della sonda vascolare a livello dell'arteria brachiale, in maniera tale da ottenere un'immagine longitudinale del vaso il più possibile definita e stabile;
- Avvio della misurazione, della durata complessiva di 10 minuti:
 - Scansione basale (un minuto) per la misurazione del diametro basale dell'arteria;
 - Fase di ischemia (5 minuti) con occlusione del bracciale a 300 ± 30 mmHg;
 - Fase di iperemia reattiva (4 minuti), per la misurazione della dilatazione arteriosa e del diametro di recupero al termine dei 10 minuti.

Le immagini acquisite vengono elaborate dal software CardioVascular Suite (Quipu, Pisa, Italia), che permette il riconoscimento in tempo reale delle pareti dell'arteria in una regione di interesse precedentemente selezionata dall'operatore, nonché del tracciato doppler acquisito in dual mode per l'intera durata della misurazione. La FMD viene calcolata come rapporto percentuale tra il diametro massimo raggiunto dall'arteria nella fase di iperemia reattiva e il diametro basale registrato nel primo minuto. Nel caso in cui le immagini raccolte durante il primo minuto non siano di qualità sufficiente a determinare il diametro basale, lo sperimentatore può valutare la possibilità di utilizzare il diametro di recupero come opzione alternativa.

4.5.3 Analisi sierometriche

Prima di ciascuna visita, un prelievo di sangue venoso è stato eseguito su ciascun soggetto. Il sangue, prelevato in un contenitore eparinizzato, è stato centrifugato a 1600 g per 10 minuti a 4°C per la separazione del plasma, conservato a -80°C fino alla successiva determinazione di livelli di CoQ10. Un'aliquota di plasma è stata utilizzata per determinare i seguenti parametri: glicemia, creatinina, attività della alanina transaminasi (ALT), colesterolo totale, HDL, LDL, trigliceridi mediante metodo enzimatico-colorimetrico; creatinchinasi (CK) tramite elettrochemiluminescenza (ECLIA); proteina C-reattiva con metodo immunoturbidimetrico. Su sangue intero sono stati inoltre determinati l'emocromo e la formula leucocitaria. La velocità di eritrosedimentazione (VES) è stata misurata impiegando la tecnica di Westergren.

4.5.4 Determinazione dei livelli plasmatici di CoQ10

I livelli plasmatici di CoQ10 e il suo stato ossidativo sono stati determinati mediante cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) con rilevatore elettrochimico (ECD),

(Shiseido Co. Ltd., Tokyo, Giappone). Le fasi mobili sono state preparate come precedentemente descritto da Silvestri *et al.* [209], mediante autocampionatore Modello 3033, valvola di iniezione Modello 3012, colonna di concentrazione CQC, colonna di separazione CQS, pompa 1 e 2 Modello 3001 (Shiseido Co. Ltd., Tokyo, Giappone). Una particolarità di questo sistema è la presenza di una colonna riducente (CQR) che fa seguito a quella analitica, capace di ridurre i picchi corrispondenti alle forme ossidate dei due coenzimi, trasformandoli nelle rispettive forme ridotte. Il potenziale di ossidazione per il detector elettrochimico è di 650 mV. I livelli totali di entrambi i due coenzimi sono stati espressi in $\mu\text{g/g}$ muscolo mentre quelli delle rispettive forme ossidate come percentuale della forma ossidata su quella totale (% CoQ10 ossidato/CoQ10 totale).

4.5.5 Determinazione dei livelli di ossido nitrico

I livelli plasmatici di NO sono stati valutati mediante kit commerciale dedicato (Arbor Assay, Ann Arbor, USA, numero di catalogo K023-H1) che permette la determinazione quantitativa dell'NO totale nei fluidi biologici. Il kit consente la conversione enzimatica del nitrato a nitrito, operata dall'enzima nitrato reduttasi, seguita dalla rilevazione colorimetrica del nitrato in forma di azocomposto colorato che assorbe la luce visibile a 540 nm. La formazione dell'azocomposto si ottiene mediante reazione di Griess, che prevede l'aggiunta dei substrati sulfanilamide (reagente I di Griess) e N(1-naftil)etilendiamina (reagente II di Griess) [210, 211]. Il protocollo prevede la preliminare deproteinizzazione e la riduzione dei nitrati a nitriti in presenza di una reduttasi NADPH-dipendente, prima dell'aggiunta dei reagenti di Griess, permettendo così la misurazione complessiva dei livelli di nitrito (NO^{2-}) e nitrato (NO^{3-}) come espressione dei livelli plasmatici di NO [212, 213]. La concentrazione di NO in ciascun campione è stato determinato utilizzando una curva standard generata con concentrazioni note di nitriti e nitrati ed espressa come $\mu\text{mol/l}$ (μM). La determinazione è

stata effettuata con spettrofotometro Synergy HT (Biotek, Winooski, USA) utilizzando le piastre a 96 pozzetti fornite dal kit.

4.5.6 Determinazione dei livelli di perossinitrito

I livelli plasmatici di perossinitrito sono stati valutati mediante l'uso della sonda fluorescente idrossifenil fluoresceina (HPF, ThermoFisher, Waltham, USA), come precedentemente descritto [214]. Un'aliquota di plasma di 200 μ l è stata incubata per 30 minuti con una soluzione di HPF a concentrazione 5 μ M. Successivamente all'incubazione, la fluorescenza è stata misurata mediante spettrofluorometro Synergy HT (Biotek, Winooski, USA), ad una lunghezza d'onda di eccitazione di 475 nm ed una lunghezza d'onda di emissione di 520 nm. I livelli di perossinitrito sono stati espressi come unità arbitrarie di fluorescenza.

4.6 Deviazioni e violazioni del protocollo

Tutte le violazioni e deviazioni dal protocollo sono state annotate nel case report form (CRF) dallo sperimentatore. Violazioni e deviazioni sono state discusse prima della rottura dei codici e dell'analisi statistica. I soggetti per i quali siano state riscontrate deviazioni o violazioni del protocollo non sono stati inclusi nell'analisi per protocollo. Di seguito viene riportato l'elenco delle violazioni previste dalle deviazioni e delle violazioni previste per lo studio.

4.6.1 Deviazioni dal protocollo

4.6.1.1 Deviazioni minori

- Errori nell'assunzione del prodotto in studio che non compromettano la compliance globale al trattamento (es. dimenticanza nell'assunzione di non più di 3 capsule, prodotto assunto in orario non corretto);
- Mancata assunzione del trattamento per più di un giorno;
- Posticipo/anticipo di una delle visite di non più di 24 ore rispetto a quanto concordato;
- Mancata restituzione del prodotto non utilizzato;
- Mancata aderenza di lieve entità alla dieta prescritta.

4.6.1.2 Deviazioni maggiori

- Arrivo alla visita non in stato di digiuno;
- Mancata aderenza di entità significativa alla dieta prescritta;
- Mancata assunzione del prodotto per 3 volte consecutive o per 4 volte non consecutive;
- Posticipo/anticipo di una delle visite per più di 24 ore rispetto a quanto concordato;
- Mancato rispetto delle istruzioni fornite dagli sperimentatori.

4.6.2 Violazioni del protocollo

- Consenso informato non ottenuto o ottenuto in modalità difformi da quelle previste dal protocollo;
- Violazione dei criteri di inclusione ed esclusione;
- Assunzione di farmaci non ammessi dal protocollo;
- Mancata esecuzione di uno o più dei test o delle analisi previste dal protocollo.

4.7 Raccolta e gestione dei dati

La raccolta dei dati clinici, inclusi quelli relativi agli effetti avversi, è stata effettuata in un CRF specifico per ogni soggetto. L'accertamento della completezza e la conservazione dei dati rientrano sotto la responsabilità del principal investigator e del monitor.

Tutti i video relativi alle determinazioni FMD sono stati valutati da esperti (Quipu, Pisa, Italy) mediante software dedicati. Gli esperti hanno fornito commenti sulla qualità delle scansioni effettuate dallo sperimentatore e annotato i casi in cui siano stati operati aggiustamenti manuali dei diametri dell'arteria brachiale. La revisione degli studi FMD è stata compiuta da un revisore operante in cieco.

Il principal investigator o persona da esso designata conservano un registro di reclutamento confidenziale dove sono annotati tutti i codici identificativi e i dati di recapito dei soggetti. Tale registro, insieme a tutta la documentazione inerente lo studio, deve essere custodito all'interno della struttura. I dati dei soggetti sono stati trattati nel rispetto del D.Lgs. 196/2003.

4.8 Sicurezza

4.8.1 Eventi avversi

Per evento avverso (AE) si intendono tutte quelle complicanze indesiderate verificatesi in un soggetto, correlate o meno allo studio. Gli AE includono ogni nuova condizione, l'esacerbazione di condizioni preesistenti e il riscontro di parametri di laboratorio clinicamente rilevanti. Gli AE sono stati classificati in lievi, moderati o gravi a seconda dei sintomi mostrati dai soggetti. Per ciascun AE viene definita anche la probabilità che tale AE sia correlato all'assunzione del prodotto in studio (nulla, improbabile, possibile, probabile, certa). Tutti gli eventi avversi sono stati annotati nel CRF di ciascun soggetto, secondo il sistema ICD-9. Una volta completato lo studio, la modulistica relativa agli EA è stata trasmessa all'ente di farmacovigilanza cui fa capo la struttura in cui si è svolta la sperimentazione (INRCA, Ancona).

4.8.2 Eventi avversi studio-specifici

Gli eventi avversi possono riguardare il momento del prelievo ematico (ematomi, perdite di coscienza transitorie, danni alle strutture tendinee o nervose) e l'esecuzione della tecnica per la misurazione della FMD (ematomi, parestesie, dolore a livello dell'avambraccio). Raramente, l'ubichinolo può indurre disturbi gastrointestinali, calo dell'appetito, nausea, vomito, diarrea, costipazione e rash.

4.8.3 Eventi avversi gravi

Per evento avverso grave (SAE) si intende un AE che risulti in uno dei seguenti esiti: morte, eventi potenzialmente fatali, ospedalizzazione del paziente, disabilità/inabilità permanente o

significativa. Ogni evento clinico rilevante può essere considerato un SAE quando può compromettere una delle funzioni vitali del soggetto e richiedere attenzione medica o chirurgica per prevenire uno degli esiti sopra riportati.

4.9 Considerazioni statistiche

4.9.1 Stima della dimensione campionaria

La stima della dimensione campionaria è stata effettuata utilizzando il software G*Power (Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf, Germania). I parametri di riferimento utilizzati per la stima sono tratti da una meta-analisi di Gao *et al.* del 2012 condotta su 5 trial controllati randomizzati [215]. In particolare, uno dei trial considerati da tale meta-analisi [205] riporta una differenza di $1.60 \pm 1.16\%$ per i soggetti trattati e di $-0.40 \pm 2.24\%$ per i soggetti non trattati. Con una potenza dell'80% e un livello di significatività a due code pari al 5%, 14 soggetti sarebbero richiesti per ciascun gruppo.

Nel nostro studio, considerando un tasso di dropout del 20%, dovrebbe essere reclutato un totale di 52.5 soggetti. Per questo motivo, una dimensione campionaria di 51 soggetti è stata giudicata appropriata.

4.9.2 Definizione della popolazione in analisi

Tutti i soggetti che hanno ricevuto almeno una confezione del prodotto in studio sono stati inclusi nell'analisi di sicurezza. Tutti i soggetti su cui è stata condotta almeno una misurazione della FMD sono stati inclusi nella popolazione intention to treat (ITT). Tutti i soggetti in cui non siano state riportate deviazioni maggiori o violazioni del protocollo sono

stati inclusi nella popolazione per protocol (PP). Tutte le misure FMD di qualità sufficiente sono state utilizzate per l'analisi dei dati.

4.9.3 Analisi statistica

Le misurazioni della FMD sono state effettuate come segue:

- Misurazione 1: Tempo zero (Visita di reclutamento);
- Misurazione 2: a quattro settimane dall'arruolamento (Visita 1);
- Misurazione 3: a otto settimane dall'arruolamento (Visita 2).

Tutti i test statistici sono stati effettuati con software IBM SPSS Statistics per macOS versione 23.0 (Armonk, NY, USA). La valutazione degli effetti del prodotto tra i gruppi, in relazione agli endpoint primari e secondari, è stata effettuata confrontando ciascuna misura con le altre utilizzando il test parametrico ANOVA a una via seguito da test *t* di Student-Newman-Keuls multipli per il confronto tra coppie di gruppi. La normalità dei dati è stata verificata mediante il test di Kolmogorov-Smirnov. Il test di Pearson e la regressione lineare sono state utilizzate per valutare eventuali correlazioni tra FMD, livelli plasmatici di ubiquinololo, livelli di ossido nitrico e perossinitrito. Il livello di significatività è stato fissato a $p=0.05$ per ogni analisi statistica.

5. RISULTATI

5.1 Caratteristiche della popolazione in studio

Un totale di 78 soggetti rientranti nei criteri di inclusione riportati nel protocollo è stato sottoposto a misurazione della FMD (screening). Di questi, 51 hanno riportato un valore di FMD compreso tra 2.5% e 6.0%, come richiesto dal protocollo, e hanno fornito il consenso scritto alla partecipazione allo studio. In seguito alla randomizzazione, i 51 soggetti sono stati assegnati ad uno dei 3 gruppi: trattamento con ubiquinolo 200 mg/die (N=17), trattamento con ubiquinolo 100 mg/die (N=17), placebo (N=17). Durante il corso dello studio si sono ritirati 3 soggetti, di cui 2 appartenenti al gruppo ubiquinolo 100 mg/die e uno appartenente al gruppo placebo. La composizione della popolazione in studio e le motivazioni del ritiro dei 3 soggetti sono riportate nel diagramma di flusso CONSORT (Figura 1). I soggetti ritirati non sono stati eliminati dalla analisi intention-to-treat (ITT) e, come previsto dal protocollo, non sono stati sostituiti. La popolazione per-protocol (PP) risulta pertanto composta da 48 soggetti.

Le caratteristiche dei soggetti rilevate al reclutamento sono riportate in Tabella 1. I gruppi sono simili nella loro composizione per età, sesso, BMI e per una serie di valori chimico-clinici che includono il profilo lipidico, nel rispetto dei criteri di inclusione. Non si sono

verificati eventi avversi, deviazioni o violazioni del protocollo nell'intero periodo in cui si è svolto lo studio.

5.2 Endpoint primario

Al reclutamento, i soggetti randomizzati nei tre gruppi mostravano valori di FMD comparabili (Tabella 2). Il test ANOVA ad una via dimostra che, al termine dello studio (Visita 2, 8 settimane), i soggetti appartenenti ad entrambi i gruppi di trattamento hanno mostrato un aumento della FMD statisticamente significativo rispetto ai soggetti appartenenti al gruppo placebo (200 mg/die, $+1.28 \pm 0.9$ %; 100 mg/die, $+1.34 \pm 1.44$ %; placebo, -0.41 ± 1.51 %; $p < 0.001$; Figura 2). Un successivo test *t* di Student eseguito per confrontare le variazioni di FMD tra i gruppi di soggetti trattati ha dimostrato che l'aumento della FMD non è correlato al dosaggio somministrato (100 mg/die vs. 200 mg/die, $p = 0.88$).

5.3 Endpoint secondari

5.3.1 Variazione della vasodilatazione endotelio-dipendente (rilevazione intermedia)

Il test ANOVA ad una via eseguito per confrontare le variazioni di FMD tra i gruppi in studio a 4 settimane dal reclutamento non ha messo in evidenza differenze significative tra gruppi ($p = 0.65$; Tabella 2), seppure i gruppi trattati mostrano un lieve incremento della FMD, di entità maggiore rispetto a quello riscontrato nel gruppo placebo. Un maggiore incremento dei valori di FMD nei soggetti trattati si osserva nell'intervallo temporale compreso tra la visita 1 (4 settimane) e la visita 2 (8 settimane) ($p = 0.011$; Tabella 2).

5.3.2 Variazione dei livelli di coenzima Q10 ossidato e ridotto

I livelli plasmatici di Coenzima Q10 sono stati quantificati mediante HPLC a 4 e a 8 settimane dall'inizio del trattamento, come descritto nel protocollo. I valori ottenuti sono stati normalizzati per la concentrazione plasmatica di colesterolo totale e pertanto espressi come rapporto CoQ10/colesterolo totale ($\mu\text{mol/mol}$). Lo stato ossidativo del Coenzima Q10 è stato espresso come rapporto percentuale CoQ10 ossidato/CoQ10 totale. Al reclutamento, i livelli plasmatici di CoQ10 e lo stato ossidativo erano comparabili tra i gruppi in studio (Tabella 3).

Il test ANOVA ad una via eseguito per confrontare le differenze tra gruppi e valutare la compliance al trattamento ha confermato che la somministrazione di ubiquinolo aumenta significativamente i livelli plasmatici di CoQ10 dopo 4 e 8 settimane dall'inizio del trattamento ($p < 0.001$; Figura 3A). Le variazioni osservate sono dipendenti dal dosaggio somministrato. Il confronto delle variazioni dei livelli di CoQ10 tra la seconda (4 settimane) e la terza visita (8 settimane) non ha fornito differenze significative ($p = 0.97$).

Per quanto riguarda lo stato ossidativo del Coenzima Q10 (Figura 3B), già a 4 settimane dal reclutamento si osserva una riduzione fortemente significativa e dose-dipendente della quota di CoQ10 ossidato ($p < 0.001$; Tabella 3). Tale differenza si mantiene significativa anche nella misurazione eseguita a 8 settimane ($p < 0.001$; Tabella 3). Il confronto delle variazioni nello stato ossidativo del CoQ10 tra la seconda e la terza visita non ha fornito differenze significative ($p = 0.21$).

5.3.3 Valutazione dei livelli plasmatici di ossido nitrico

La misurazione dei livelli plasmatici di NO al reclutamento mostra livelli comparabili tra i tre gruppi (Tabella 4). La determinazione eseguita a 8 settimane dall'inizio del trattamento

ha mostrato un incremento significativo nei soggetti trattati, rispetto al gruppo placebo (200 mg/die, $+9.34 \pm 16.13 \mu\text{M}$; 100 mg/die, $+5.85 \pm 11.85 \mu\text{M}$; placebo, $-4.87 \pm 13.40 \mu\text{M}$; $p=0.016$; Figura 4A). Seppure vi siano delle differenze tra i due gruppi trattati con ubiquinolo, queste non raggiungono la significatività statistica ($p=0.49$).

5.3.4 Determinazione dei livelli plasmatici di perossinitrito

La determinazione dei valori plasmatici di anione perossinitrito, eseguita al reclutamento e ad 8 settimane dall'inizio del trattamento, non ha messo in evidenza differenze significative tra i gruppi in studio ($p=0.87$; Figura 4B).

5.4 Correlazioni statistiche tra endpoint ed altre variabili in studio

Per ciò che concerne il profilo lipidico, nessuna variazione significativa in termini di colesterolo totale, LDL, HDL e trigliceridi è stata riscontrata nei tre gruppi al termine del trattamento (dati non riportati). Allo stesso modo, nessuna variazione significativa è stata riscontrata negli altri marker siero-ematici studiati (emocromo, formula leucocitaria, ALT, creatinina, VES, PCR, glicemia). Multiple correlazioni lineari secondo Pearson sono state eseguite per mettere in relazione tra loro gli endpoint primari e secondari.

5.4.1 Correlazioni statistiche al reclutamento (T0) e al termine del trattamento (T2)

Al momento del reclutamento, i valori di FMD risultavano positivamente correlati ai livelli plasmatici di CoQ10 totale ($r=0.39$, $F=8.279$, $p=0.0061$; Figura 5A), ma non allo stato ossidativo del CoQ10 ($p=0.42$). Anche al termine del trattamento è stata dimostrata una correlazione positiva tra FMD e livelli plasmatici di CoQ10 totale ($r=0.33$, $F=5.769$, $p=0.02$; Figura 5B), ma non tra FMD e stato ossidativo del CoQ10 ($p=0.27$). Inoltre, considerando

tutte le misurazioni (T0 e T2), emerge una correlazione positiva tra i livelli plasmatici di NO e i valori di FMD ($r=0.20$, $F=3.931$, $p=0.049$; Figura 6). Nessun'altra correlazione tra le variabili in studio, considerando le singole visite, è stata identificata.

5.4.2 Correlazioni tra le variazioni degli endpoint al termine del trattamento

Con riferimento alla visita condotta alla fine del trattamento (T2) e considerando tutti i gruppi in studio, abbiamo dimostrato l'esistenza di una correlazione positiva tra le variazioni della FMD e quelle dei livelli plasmatici di CoQ10 ($r=0.33$, $F=5.668$, $p=0.022$; Figura 7A). Inoltre, una correlazione ancora più forte è stata riscontrata tra i miglioramenti della FMD e quelli dello stato ossidativo del CoQ10 ($r=0.35$, $F=6.565$, $p=0.014$; Figura 7B).

Analizzando i livelli di ossido nitrico, abbiamo confermato che le variazioni di FMD riflettono quelle della concentrazione plasmatica di NO ($r=0.36$, $F=6.802$, $p=0.012$; Figura 8). Gli incrementi dei livelli di CoQ10 totale si correlano con un'aumentata biodisponibilità di NO ($r=0.28$, $F=3.921$, $p=0.048$; Figura 9A), mentre la correlazione tra stato ossidativo del CoQ10 e concentrazione di NO, più debole, non è significativa ($p=0.09$; Figura 9B).

Un'ulteriore analisi è stata condotta escludendo i 20 soggetti in cui, a seguito del trattamento, sono stati misurati livelli di CoQ10 totale superiori a 500 $\mu\text{mol/mole}$ di colesterolo, corrispondente ad una concentrazione di CoQ10 di 2.5 $\mu\text{g/ml}$ in soggetti con livelli di colesterolo totale pari a 220 mg/dl. Al di sopra di tale soglia si ipotizza, infatti, che ulteriori incrementi di CoQ10 non producano ulteriori effetti benefici a livello cardiovascolare [216]. In questo caso, le variazioni dei livelli plasmatici di CoQ10 si correlano positivamente con quelle dei livelli di NO ($r=0.39$, $F=4.581$, $p=0.042$; Figura 10A) e, intuitivamente, dei valori di FMD ($r=0.32$, $F=6.206$, $p=0.016$; Figura 10B).

6. DISCUSSIONE

L'obiettivo principale del nostro studio è stato quello di valutare l'impatto della supplementazione orale con ubiquinolo sulla funzionalità endoteliale in soggetti con un rischio cardiovascolare moderato, che deriva da una condizione di dislipidemia, identificata dal nostro gruppo con un livello di plasmatico di colesterolo LDL compreso tra 130 e 200 mg/dl. Requisiti fondamentali per il reclutamento erano la non assunzione di terapia farmacologica ipocolesterolemizzante e l'assenza di altre patologie cardiovascolari o segni di danno d'organo.

L'analisi della funzione endoteliale è stata condotta mediante la misurazione della flow-mediated dilation (FMD) dell'arteria brachiale, una tecnica ecografica non invasiva che permette di stimare la funzione endoteliale in maniera accurata e riproducibile, se eseguita rispettando opportuni accorgimenti.

6.1 Analisi dei risultati

Per quanto concerne la FMD, ad una prima analisi dei dati relativi ai soggetti sottoposti a screening, nel 75% dei casi circa abbiamo osservato un valore $< 6.0\%$, riconducibile ad un certo grado di disfunzione endoteliale. È opportuno precisare che, nonostante gli sforzi compiuti da vari gruppi nell'intento di standardizzare la tecnica, non esiste ad oggi un valore

preciso di FMD al di sotto del quale sia possibile parlare con sicurezza di disfunzione endoteliale. Tuttavia, in seguito ad una attenta analisi della letteratura e sulla base di misurazioni preliminari da noi condotte su soggetti sani di età compresa tra i 20 e i 30 anni, ci è sembrato ragionevole stabilire una soglia pari al 6.0%.

Con riferimento all'endpoint primario dello studio, in entrambi i gruppi di soggetti trattati per 8 settimane con ubiquinolo abbiamo riscontrato un incremento significativo della FMD, pari a circa l'1.3%. L'incremento non è correlato al dosaggio somministrato (100 o 200 mg/die). Ciò potrebbe dipendere o da differenze nella compliance al trattamento o, più verosimilmente da una variabilità nella biodisponibilità dell'ubichinolo somministrato.

L'analisi dei livelli plasmatici di ubiquinolo ha messo in evidenza un forte incremento del CoQ10 totale nei soggetti trattati, proporzionale al dosaggio somministrato. Inoltre, la somministrazione di ubiquinolo ha migliorato lo stato ossidativo del CoQ10, espresso come rapporto tra la forma ossidata (ubichinone) e la concentrazione totale. I livelli plasmatici di CoQ10 sono aumentati già a 4 settimane dall'inizio del trattamento, per raggiungere un plateau che viene mantenuto fino alla rilevazione finale a 8 settimane. Il comportamento dei livelli di CoQ10 differisce da quello riscontrato per quanto riguarda la FMD; infatti, differenze significative rispetto alla condizione basale si riscontrano nei soggetti trattati solo a 8 settimane dall'inizio del trattamento. Possiamo perciò ipotizzare che sia necessario un intervallo di tempo più prolungato, nell'ordine di settimane, affinché la risposta dell'endotelio all'aumentata biodisponibilità di CoQ10 sia positiva. Le differenti concentrazioni riscontrate tra i gruppi trattati a diversi dosaggi confermano l'ottima aderenza al trattamento e il rispetto delle indicazioni fornite in fase di reclutamento.

È importante notare che, nei soggetti trattati con ubiquinolo, non sono state riscontrate variazioni nel profilo lipidico al termine dello studio. Questo risultato, in linea con quanto

riportato in letteratura [217], supporta un ruolo diretto dell'ubichinolo nel miglioramento della funzione endoteliale, indipendente dai livelli di colesterolo LDL, che pure hanno un ruolo determinante nell'insorgenza e nella progressione dell'aterosclerosi.

Il ruolo del CoQ10, e in particolare della sua forma ridotta ubichinolo, come determinante della funzione endoteliale è confermato anche dalle correlazioni tra i livelli plasmatici e la FMD. Già al reclutamento, abbiamo dimostrato una relazione positiva tra concentrazioni di CoQ10 e FMD, mantenuta anche nelle rilevazioni successive. Ancor più rilevante l'osservazione che gli incrementi nella concentrazione di CoQ10 sono proporzionali all'entità del miglioramento della FMD riscontrato nei soggetti trattati. Analogamente, abbiamo messo in evidenza una forte correlazione tra il miglioramento dello stato ossidativo del CoQ10 e gli incrementi di FMD, ad ulteriore conferma che l'ubichinolo rappresenta la forma attraverso la quale il CoQ10 esercita la sua funzione protettiva nei confronti dell'endotelio.

A dimostrazione che la misurazione della FMD sia una valida tecnica per la misurazione della risposta vascolare endotelio-dipendente, abbiamo dimostrato una forte correlazione lineare tra i livelli plasmatici di NO e i valori di FMD. Possiamo pertanto affermare che il miglioramento della funzione endoteliale da noi riscontrato nei soggetti trattati sia effettivamente dovuto ad un'aumentata biodisponibilità di NO. Ulteriori correlazioni hanno confermato, inoltre, la stretta interrelazione tra i tre principali parametri in studio, CoQ10, NO e FMD, che variano di pari passo nei soggetti da noi osservati. Non siamo riusciti tuttavia a dimostrare alcuna correlazione tra l'endpoint primario e i livelli di perossinitrito. In generale, i livelli di tale radicale appaiono relativamente bassi in tutti i soggetti studiati e non subiscono, dopo il trattamento, variazioni tali da giustificare un possibile effetto del CoQ10 sulla sua sintesi. Ciò potrebbe essere dovuto all'estrema volatilità di questo gas, che potrebbe scomporsi in metaboliti inattivi prima di raggiungere le cellule della parete vascolare [218].

Sebbene il ruolo del CoQ10 sia stato ampiamente indagato in soggetti sani e in diversi stati patologici, pochi sono gli studi che hanno valutato i suoi effetti sulla funzione endoteliale. Questi si sono concentrati perlopiù su patologie cardiovascolari conclamate, quali il diabete mellito di tipo 2 e la cardiopatia ischemica. Solo uno studio del 2000, realizzato da Raitakari *et al.* [219], ha valutato l'impatto della supplementazione di CoQ10 in soggetti sani non fumatori con elevati livelli di colesterolo totale. I valori di FMD riscontrati in questo studio sono sovrapponibili a quelli da noi raccolti al reclutamento, confermando che la sola dislipidemia è sufficiente a determinare una disfunzione endoteliale moderata, in assenza di ulteriori fattori di rischio. In questo caso, la somministrazione di 150 mg di ubiquinolo per 4 settimane ha incrementato i livelli plasmatici di CoQ10, ma non ha indotto miglioramenti significativi della FMD. I nostri risultati, ottenuti su una popolazione più ampia, concordano solo parzialmente con quelli di Raitakari; infatti, sebbene a 4 settimane dall'inizio del trattamento non abbiamo riscontrato miglioramenti della FMD, questi sono palesi dopo 8 settimane di trattamento, anche nel gruppo trattato con 100 mg al giorno. Il gruppo di Raitakari conferma inoltre che il CoQ10 aumenta la resistenza delle LDL all'ossidazione, proprietà che indagheremo in successivi studi sulla nostra coorte di soggetti.

I due trial effettuati su pazienti con cardiopatia ischemica del tipo angina stabile [206, 220] concordano nell'affermare che la supplementazione di 8 settimane con 300 mg giornalieri di CoQ10 migliorano di pari passo la FMD dell'arteria brachiale e la funzione bioenergetica mitocondriale, dimostrando l'importante ruolo di quest'ultima nell'omeostasi endoteliale. Il gruppo di Tiano, inoltre, ha dimostrato sugli stessi pazienti un aumento dei livelli di espressione dell'enzima ecSOD che, proteggendo l'NO dall'ossidazione a perossinitrito, lo rende più disponibile ad esercitare la sua azione protettiva nei confronti dell'endotelio.

Il trial di Watts *et al.* del 2002 [205] su 40 soggetti con diabete mellito di tipo 2 dimostra che la supplementazione per 12 settimane con 200 mg giornalieri di CoQ10 migliora la funzione

endoteliale, in misura simile a quanto da noi riscontrato (1.5% circa). Analogamente al nostro studio, non sono state riscontrate variazioni del profilo lipidico, della pressione arteriosa e del controllo glicemico.

6.2 Considerazioni metodologiche

La misurazione della FMD è una tecnica di largo impiego nell'analisi dei meccanismi attraverso i quali diversi stimoli sono in grado di alterare la funzione vascolare (es. esercizio fisico, fumo di sigaretta, ipercolesterolemia, ipertensione arteriosa) [147, 221-223]. È chiaro, tuttavia, che variazioni anche di modesta entità nell'approccio metodologico alla tecnica possono avere grande impatto sulla natura delle risposte rilevate. Molti studi recenti hanno identificato una serie di fattori che possono influenzare la validità, la riproducibilità e l'interpretazione degli studi basati sulla FMD, alcuni dei quali precedentemente già riportati (Tabella D).

Permangono, tuttavia, alcuni aspetti controversi. Il primo è legato al posizionamento del bracciale necessario per occludere il flusso a livello dell'arto superiore dove viene effettuata la misurazione. Nel nostro studio abbiamo aderito alla raccomandazione di molti autori [224], che convergono sul posizionamento della sonda a valle dell'arteria brachiale, a livello dell'avambraccio nel nostro caso, per assicurarci che la risposta vasodilatatoria sia il più possibile dipendente dall'endotelio e, dunque, dall'NO da esso rilasciato. Inoltre, abbiamo impiegato un software automatico di riconoscimento delle pareti del vaso, per minimizzare il più possibile gli errori legati alla manualità dell'operatore. Tale software individua anche il punto di massima dilatazione nella fase post-ischemica; contrariamente, sarebbe necessario stabilire un intervallo di tempo comune a tutti i soggetti (es. 60 secondi), trascorso il quale

misurare manualmente il diametro dell'arteria, con il rischio di sottostimare del 25-40% la reale entità della FMD [225].

Infine, sebbene esista un razionale fisiologico per considerare l'impatto dello stress di parete nell'interpretazione delle risposte FMD, esistono diversi fattori di difficile valutazione che possono influenzare questo aspetto a livello delle arterie di conduzione. Questi fattori potrebbero essere sia di natura metodologica (es. posizionamento del bracciale, durata della fase ischemica) [226] o fisiologica (es. rigidità dell'arteria, viscosità ematica) [227]. Ci sono molte evidenze contrastanti riguardo la normalizzazione del valore di FMD per lo stress di parete. È opportuno inoltre precisare che l'eventuale relazione tra FMD e stress di parete potrebbe essere di tipo non-lineare e, addirittura, variare in determinate condizioni ad oggi ignote [228]. Sulla base di queste evidenze, abbiamo deciso di misurare comunque lo stress di parete ad ogni misurazione, ma di non operare nessuna correlazione con i valori di FMD. La registrazione del tracciato doppler, pertanto, è stata da noi utilizzata esclusivamente come controllo interno, permettendo all'operatore di verificare il corretto posizionamento della sonda e la validità delle immagini acquisite.

Alla luce delle considerazioni sopra esposte, concordiamo con l'opinione degli autori che hanno indirizzato i loro sforzi verso una maggiore standardizzazione della tecnica FMD [116, 125, 224]. Gli operatori dovrebbero essere adeguatamente formati riguardo i principi fisiologici e tecnici alla base della FMD, nonché sull'interpretazione critica di quelle variazioni che possono verificarsi tra gruppi di soggetti e/o dopo uno specifico trattamento. Solo in questo modo sarà possibile aumentare l'accuratezza delle misurazioni e la validità di questa tecnica come strumento clinico per la stima del rischio cardiovascolare globale.

6.3 Limiti dello studio

La dimensione campionaria è relativamente limitata, nonostante questa sia stata determinata in seguito ad una specifica analisi statistica e i risultati ottenuti in termini di miglioramento della funzione endoteliale siano significativi. Nel nostro studio abbiamo scelto di misurare la sola FMD, escludendo il monitoraggio della vasodilatazione endotelio-indipendente che si esegue in seguito a somministrazione di nitroglicerina. Tale scelta minimizza sicuramente i rischi connessi alla procedura diagnostica; tuttavia non ci permette di stabilire con certezza se la disfunzione endoteliale riscontrata nei partecipanti allo studio rappresenti il risultato di una ridotta sintesi di NO da parte dell'endotelio oppure di una ridotta capacità delle cellule muscolari lisce della tonaca media di rispondere all'NO (effetto endotelio-indipendente). Ad ogni modo, diverse evidenze supportano il carattere endotelio-dipendente della FMD [113], nonché la sua associazione al rischio cardiovascolare globale.

Questa criticità è stata in parte affrontata determinando i livelli plasmatici di NO nei soggetti al reclutamento e alla fine del trattamento. È importante, tuttavia, far notare che i livelli di NO sono stati determinati su un campione di plasma raccolto prima della misurazione della FMD; per questo, non è possibile ascrivere i miglioramenti riscontrati ad un effettivo aumento del rilascio di NO nella fase post-ischemica, bensì ad un'aumentata biodisponibilità in toto di tale mediatore.

In ultimo, nel contesto della singola visita, è stata eseguita una sola misurazione della FMD. Ciò non ci consente di stimare la variabilità intrasoggetto, che potrebbe limitare l'impatto della relazione tra FMD e rischio cardiovascolare. Ad ogni modo, abbiamo cercato di minimizzare quei fattori che possono limitare la validità della tecnica impiegando attrezzatura dedicata utilizzata da un solo operatore adeguatamente formato e validato da

esperti di FMD. Inoltre, abbiamo cercato di non mutare le condizioni ambientali in cui si sono svolte le misurazioni del nostro studio.

6.4 Implicazioni cliniche ed ulteriori sviluppi

Il nostro studio da un lato contribuisce a rafforzare il ruolo della FMD come predittore di rischio cardiovascolare, dall'altro conferma in maniera più ampia le proprietà benefiche del CoQ10 sul sistema cardiovascolare, dimostrate in studi precedenti. La misurazione della FMD, quando eseguita da operatori esperti, può fornire un valido indicatore quantitativo della funzione endoteliale, facilmente utilizzabile per stratificare ulteriormente i soggetti a rischio cardiovascolare già identificati sulla base dei fattori di rischio tradizionali. I dati in nostro possesso confermano che la dislipidemia, anche in assenza di altre malattie cardiovascolari, costituisce di per sé un determinante di disfunzione endoteliale; d'altra parte, tuttavia, tale condizione può essere facilmente migliorata, se non risolta, dal trattamento non farmacologico con CoQ10. In tale contesto, abbiamo dimostrato l'affidabilità e la riproducibilità della FMD nel monitoraggio della risposta endoteliale ad un determinato intervento. La forte correlazione tra la FMD e i livelli plasmatici di CoQ10 e di NO ci permette di confermare la validità delle misure, requisito indispensabile affinché questa tecnica possa essere utilizzata anche in ambito clinico. Sono necessari, tuttavia, ulteriori studi per conseguire un elevato livello di standardizzazione della tecnica, minimizzando l'impatto dei fattori legati sia all'operatore, sia all'attrezzatura impiegata per l'elaborazione delle immagini.

Per ciò che concerne la supplementazione con CoQ10, il fatto che tale intervento abbia mostrato dei risultati positivi in termini di funzione endoteliale già dopo 8 settimane di trattamento supporta la nostra ipotesi che l'ubichinolo possa essere impiegato come valido

integratore alimentare da affiancare al trattamento farmacologico, indispensabile per ridurre i livelli di colesterolo LDL. Come già ribadito precedentemente, inoltre, la supplementazione con CoQ10 contribuisce a migliorare la tollerabilità delle statine, limitandone gli effetti avversi a livello muscolare. Tali considerazioni supportano la necessità di sperimentazioni di più lunga durata, che permettano anche il monitoraggio di specifici outcome, inclusa l'incidenza di eventi cardiovascolari, in soggetti sottoposti a diversi regimi di trattamento.

6.5 Conclusione

In conclusione, il nostro studio ha dimostrato che la supplementazione di CoQ10 esercita un effetto positivo sulla funzione endoteliale di soggetti con rischio cardiovascolare moderato ma senza evidenza clinica di patologia. Il miglioramento della funzione endoteliale si aggiunge ai numerosi effetti benefici di questa importante molecola antiossidante. I nostri promettenti risultati, tuttavia, dovranno essere confermati da ulteriori studi clinici, condotti su più larga scala, volti a determinare l'impatto del CoQ10, da solo e in associazione con altri supplementi, sul rischio cardiovascolare globale.

BIBLIOGRAFIA

1. Perk, J., et al., *European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice (version 2012). The Fifth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of nine societies and by invited experts)*. Eur Heart J, 2012. **33**(13): p. 1635-701.
2. Elizabeth Wilkins, L.W., Kremlin Wickramasinghe, Prachi Bhatnagar, Mike Rayner, Nick Townsendi, *European Cardiovascular Disease Statistics*. 2017: European Heart Network.
3. Kesteloot, H., S. Sans, and D. Kromhout, *Dynamics of cardiovascular and all-cause mortality in Western and Eastern Europe between 1970 and 2000*. Eur Heart J, 2006. **27**(1): p. 107-13.
4. Muller-Nordhorn, J., et al., *An update on regional variation in cardiovascular mortality within Europe*. Eur Heart J, 2008. **29**(10): p. 1316-26.
5. Pyorala, K. and D. Wood, *Prevention of coronary heart disease in clinical practice. European recommendations revised and reinforced*. Eur Heart J, 1998. **19**(10): p. 1413-5.
6. Walt, G., *WHO's World Health Report 2003*. BMJ, 2004. **328**(7430): p. 6.
7. Group, E.I.S., *Lifestyle and risk factor management and use of drug therapies in coronary patients from 15 countries; principal results from EUROASPIRE II Euro Heart Survey Programme*. Eur Heart J, 2001. **22**(7): p. 554-72.
8. Pyorala, K., et al., *Prevention of coronary heart disease in clinical practice: recommendations of the Task Force of the European Society of Cardiology, European Atherosclerosis Society and European Society of Hypertension*. Atherosclerosis, 1994. **110**(2): p. 121-61.
9. Conroy, R.M., et al., *Estimation of ten-year risk of fatal cardiovascular disease in Europe: the SCORE project*. Eur Heart J, 2003. **24**(11): p. 987-1003.

10. Qi, Q., et al., *Genetic predisposition to high blood pressure associates with cardiovascular complications among patients with type 2 diabetes: two independent studies*. Diabetes, 2012. **61**(11): p. 3026-32.
11. Yusuf, S., et al., *Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study*. Lancet, 2004. **364**(9438): p. 937-52.
12. dos Santos, R.L., et al., *Sex hormones in the cardiovascular system*. Horm Mol Biol Clin Investig, 2014. **18**(2): p. 89-103.
13. Harman, S.M., et al., *Menopausal hormone therapy and risk for cardiovascular disease in the WHI trial*. Ann Intern Med, 2010. **153**(1): p. 60-1; author reply 61-2.
14. Havel, R.J., H.A. Eder, and J.H. Bragdon, *The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum*. J Clin Invest, 1955. **34**(9): p. 1345-53.
15. Wyszynski, D.F., et al., *Relation between atherogenic dyslipidemia and the Adult Treatment Program-III definition of metabolic syndrome (Genetic Epidemiology of Metabolic Syndrome Project)*. Am J Cardiol, 2005. **95**(2): p. 194-8.
16. Beaumont, J.L., et al., *Classification of hyperlipidaemias and hyperlipoproteinaemias*. Bull World Health Organ, 1970. **43**(6): p. 891-915.
17. Nguyen, N.T., et al., *Association of hypertension, diabetes, dyslipidemia, and metabolic syndrome with obesity: findings from the National Health and Nutrition Examination Survey, 1999 to 2004*. J Am Coll Surg, 2008. **207**(6): p. 928-34.
18. Klop, B., J.W. Elte, and M.C. Cabezas, *Dyslipidemia in obesity: mechanisms and potential targets*. Nutrients, 2013. **5**(4): p. 1218-40.
19. Horton, J.D., J.L. Goldstein, and M.S. Brown, *SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver*. J Clin Invest, 2002. **109**(9): p. 1125-31.
20. Merkel, M., et al., *Compared with saturated fatty acids, dietary monounsaturated fatty acids and carbohydrates increase atherosclerosis and VLDL cholesterol levels in LDL receptor-deficient, but not apolipoprotein E-deficient, mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(23): p. 13294-9.
21. Nielsen, S., et al., *Splanchnic lipolysis in human obesity*. J Clin Invest, 2004. **113**(11): p. 1582-8.

22. Pelkman, C.L., et al., *Effects of moderate-fat (from monounsaturated fat) and low-fat weight-loss diets on the serum lipid profile in overweight and obese men and women*. Am J Clin Nutr, 2004. **79**(2): p. 204-12.
23. Lorenzo, C., et al., *The National Cholesterol Education Program - Adult Treatment Panel III, International Diabetes Federation, and World Health Organization definitions of the metabolic syndrome as predictors of incident cardiovascular disease and diabetes*. Diabetes Care, 2007. **30**(1): p. 8-13.
24. Carr, T.P., C.J. Andresen, and L.L. Rudel, *Enzymatic determination of triglyceride, free cholesterol, and total cholesterol in tissue lipid extracts*. Clin Biochem, 1993. **26**(1): p. 39-42.
25. Friedewald, W.T., R.I. Levy, and D.S. Fredrickson, *Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge*. Clin Chem, 1972. **18**(6): p. 499-502.
26. Hsia, S.H., *Non-HDL cholesterol: into the spotlight*. Diabetes Care, 2003. **26**(1): p. 240-2.
27. Catapano, A.L., et al., *2016 ESC/EAS Guidelines for the Management of Dyslipidaemias*. Eur Heart J, 2016. **37**(39): p. 2999-3058.
28. Stone, N.J., et al., *2013 ACC/AHA guideline on the treatment of blood cholesterol to reduce atherosclerotic cardiovascular risk in adults: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines*. J Am Coll Cardiol, 2014. **63**(25 Pt B): p. 2889-934.
29. Ridker, P.M. and N.R. Cook, *Statins: new American guidelines for prevention of cardiovascular disease*. Lancet, 2013. **382**(9907): p. 1762-5.
30. Mancini, G.B., et al., *Diagnosis, Prevention, and Management of Statin Adverse Effects and Intolerance: Canadian Consensus Working Group Update (2016)*. Can J Cardiol, 2016. **32**(7 Suppl): p. S35-65.
31. Jacobson, T.A., *NLA Task Force on Statin Safety--2014 update*. J Clin Lipidol, 2014. **8**(3 Suppl): p. S1-4.
32. Authors/Task Force, M., et al., *2016 ESC/EAS Guidelines for the Management of Dyslipidaemias: The Task Force for the Management of Dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and European Atherosclerosis Society (EAS) Developed with the special contribution of the European*

- Association for Cardiovascular Prevention & Rehabilitation (EACPR). Atherosclerosis*, 2016. **253**: p. 281-344.
33. Herrington, W., et al., *Epidemiology of Atherosclerosis and the Potential to Reduce the Global Burden of Atherothrombotic Disease*. *Circ Res*, 2016. **118**(4): p. 535-46.
 34. De Backer, G., et al., *European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: third joint task force of European and other societies on cardiovascular disease prevention in clinical practice (constituted by representatives of eight societies and by invited experts)*. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*, 2003. **10**(4): p. S1-S10.
 35. Stary, H.C., et al., *A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1995. **15**(9): p. 1512-31.
 36. Hausmann, D., et al., *Angiographically silent atherosclerosis detected by intravascular ultrasound in patients with familial hypercholesterolemia and familial combined hyperlipidemia: correlation with high density lipoproteins*. *J Am Coll Cardiol*, 1996. **27**(7): p. 1562-70.
 37. Navab, M., et al., *The Yin and Yang of oxidation in the development of the fatty streak. A review based on the 1994 George Lyman Duff Memorial Lecture*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1996. **16**(7): p. 831-42.
 38. Stocker, R. and J.F. Keaney, Jr., *Role of oxidative modifications in atherosclerosis*. *Physiol Rev*, 2004. **84**(4): p. 1381-478.
 39. Podrez, E.A., H.M. Abu-Soud, and S.L. Hazen, *Myeloperoxidase-generated oxidants and atherosclerosis*. *Free Radic Biol Med*, 2000. **28**(12): p. 1717-25.
 40. Gerszten, R.E., et al., *Chemokines, leukocytes, and atherosclerosis*. *J Lab Clin Med*, 2000. **136**(2): p. 87-92.
 41. Galkina, E. and K. Ley, *Vascular adhesion molecules in atherosclerosis*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007. **27**(11): p. 2292-301.
 42. Atkins, G.B., et al., *Hemizygous deficiency of Kruppel-like factor 2 augments experimental atherosclerosis*. *Circ Res*, 2008. **103**(7): p. 690-3.

43. Wang, X.Q., et al., *Thioredoxin interacting protein promotes endothelial cell inflammation in response to disturbed flow by increasing leukocyte adhesion and repressing Kruppel-like factor 2*. *Circ Res*, 2012. **110**(4): p. 560-8.
44. Chatzizisis, Y.S., et al., *Role of endothelial shear stress in the natural history of coronary atherosclerosis and vascular remodeling: molecular, cellular, and vascular behavior*. *J Am Coll Cardiol*, 2007. **49**(25): p. 2379-93.
45. Bruunsgaard, H., et al., *Ageing, tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and atherosclerosis*. *Clin Exp Immunol*, 2000. **121**(2): p. 255-60.
46. Yu, X.H., et al., *Foam cells in atherosclerosis*. *Clin Chim Acta*, 2013. **424**: p. 245-52.
47. Moore, K.J. and M.W. Freeman, *Scavenger receptors in atherosclerosis: beyond lipid uptake*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006. **26**(8): p. 1702-11.
48. Nakashima, Y., et al., *Early human atherosclerosis: accumulation of lipid and proteoglycans in intimal thickenings followed by macrophage infiltration*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007. **27**(5): p. 1159-65.
49. Tabas, I. and K.E. Bornfeldt, *Macrophage Phenotype and Function in Different Stages of Atherosclerosis*. *Circ Res*, 2016. **118**(4): p. 653-67.
50. Nofer, J.R., et al., *HDL and arteriosclerosis: beyond reverse cholesterol transport*. *Atherosclerosis*, 2002. **161**(1): p. 1-16.
51. Tabas, I., *Consequences and therapeutic implications of macrophage apoptosis in atherosclerosis: the importance of lesion stage and phagocytic efficiency*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005. **25**(11): p. 2255-64.
52. Tedgui, A. and Z. Mallat, *Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways*. *Physiol Rev*, 2006. **86**(2): p. 515-81.
53. Eid, R.E., et al., *Interleukin-17 and interferon-gamma are produced concomitantly by human coronary artery-infiltrating T cells and act synergistically on vascular smooth muscle cells*. *Circulation*, 2009. **119**(10): p. 1424-32.
54. Huo, Y. and K.F. Ley, *Role of platelets in the development of atherosclerosis*. *Trends Cardiovasc Med*, 2004. **14**(1): p. 18-22.

55. Raines, E.W., *PDGF and cardiovascular disease*. Cytokine Growth Factor Rev, 2004. **15**(4): p. 237-54.
56. Robertson, A.K., et al., *Disruption of TGF-beta signaling in T cells accelerates atherosclerosis*. J Clin Invest, 2003. **112**(9): p. 1342-50.
57. Gorlach, A., et al., *Thrombin activates the hypoxia-inducible factor-1 signaling pathway in vascular smooth muscle cells: Role of the p22(phox)-containing NADPH oxidase*. Circ Res, 2001. **89**(1): p. 47-54.
58. Mulligan-Kehoe, M.J. and M. Simons, *Vasa vasorum in normal and diseased arteries*. Circulation, 2014. **129**(24): p. 2557-66.
59. Langheinrich, A.C., et al., *Vasa vasorum and atherosclerosis - Quid novi?* Thromb Haemost, 2007. **97**(6): p. 873-9.
60. Rademakers, T., et al., *Plaque-associated vasa vasorum in aged apolipoprotein E-deficient mice exhibit proatherogenic functional features in vivo*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2013. **33**(2): p. 249-56.
61. Fishbein, M.C., *The vulnerable and unstable atherosclerotic plaque*. Cardiovasc Pathol, 2010. **19**(1): p. 6-11.
62. Flammer, A.J., et al., *Osteocalcin positive CD133+/CD34-/KDR+ progenitor cells as an independent marker for unstable atherosclerosis*. Eur Heart J, 2012. **33**(23): p. 2963-9.
63. Reyes-Garcia, R., et al., *Relationship between serum levels of osteocalcin and atherosclerotic disease in type 2 diabetes*. Diabetes Metab, 2012. **38**(1): p. 76-81.
64. Wu, G., et al., *LincRNA-p21 regulates neointima formation, vascular smooth muscle cell proliferation, apoptosis, and atherosclerosis by enhancing p53 activity*. Circulation, 2014. **130**(17): p. 1452-1465.
65. Barbieri, S.S., et al., *Cytokines present in smokers' serum interact with smoke components to enhance endothelial dysfunction*. Cardiovasc Res, 2011. **90**(3): p. 475-83.
66. Poli, G., et al., *Cholesterol oxidation products in the vascular remodeling due to atherosclerosis*. Mol Aspects Med, 2009. **30**(3): p. 180-9.
67. Miao, C., et al., *Positive remodeling of the coronary arteries detected by magnetic resonance imaging in an asymptomatic population: MESA (Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis)*. J Am Coll Cardiol, 2009. **53**(18): p. 1708-15.

68. Sluimer, J.C. and M.J. Daemen, *Novel concepts in atherogenesis: angiogenesis and hypoxia in atherosclerosis*. J Pathol, 2009. **218**(1): p. 7-29.
69. Sakakura, K., et al., *Pathophysiology of atherosclerosis plaque progression*. Heart Lung Circ, 2013. **22**(6): p. 399-411.
70. Insull, W., Jr., *The pathology of atherosclerosis: plaque development and plaque responses to medical treatment*. Am J Med, 2009. **122**(1 Suppl): p. S3-S14.
71. Virmani, R., et al., *Atherosclerotic plaque progression and vulnerability to rupture: angiogenesis as a source of intraplaque hemorrhage*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005. **25**(10): p. 2054-61.
72. Ross, R., *Atherosclerosis is an inflammatory disease*. Am Heart J, 1999. **138**(5 Pt 2): p. S419-20.
73. Vita, J.A. and J.F. Keaney, Jr., *Endothelial function: a barometer for cardiovascular risk?* Circulation, 2002. **106**(6): p. 640-2.
74. Ross, R., *The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s*. Nature, 1993. **362**(6423): p. 801-9.
75. Schechter, A.N. and M.T. Gladwin, *Hemoglobin and the paracrine and endocrine functions of nitric oxide*. N Engl J Med, 2003. **348**(15): p. 1483-5.
76. Furchgott, R.F., *The 1996 Albert Lasker Medical Research Awards. The discovery of endothelium-derived relaxing factor and its importance in the identification of nitric oxide*. JAMA, 1996. **276**(14): p. 1186-8.
77. Forstermann, U. and T. Munzel, *Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace*. Circulation, 2006. **113**(13): p. 1708-14.
78. Kypreos, K.E., et al., *Regulation of endothelial nitric oxide synthase and high-density lipoprotein quality by estradiol in cardiovascular pathology*. J Cardiovasc Pharmacol Ther, 2014. **19**(3): p. 256-68.
79. Ghosh, S. and M. Karin, *Missing pieces in the NF-kappaB puzzle*. Cell, 2002. **109** Suppl: p. S81-96.
80. Moncada, S. and J.D. Erusalimsky, *Does nitric oxide modulate mitochondrial energy generation and apoptosis?* Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. **3**(3): p. 214-20.
81. Hansson, G.K., *Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease*. N Engl J Med, 2005. **352**(16): p. 1685-95.

82. Breton-Romero, R. and S. Lamas, *Hydrogen peroxide signaling in vascular endothelial cells*. Redox Biol, 2014. **2**: p. 529-34.
83. Li, H. and U. Forstermann, *Uncoupling of endothelial NO synthase in atherosclerosis and vascular disease*. Curr Opin Pharmacol, 2013. **13**(2): p. 161-7.
84. Braun, L.T. and M.H. Davidson, *Lp-PLA2: A new target for statin therapy*. Curr Atheroscler Rep, 2010. **12**(1): p. 29-33.
85. Deanfield, J.E., J.P. Halcox, and T.J. Rabelink, *Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance*. Circulation, 2007. **115**(10): p. 1285-95.
86. Zhang, D.X. and D.D. Gutterman, *Mitochondrial reactive oxygen species-mediated signaling in endothelial cells*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007. **292**(5): p. H2023-31.
87. Nishikawa, T. and E. Araki, *Impact of mitochondrial ROS production in the pathogenesis of diabetes mellitus and its complications*. Antioxid Redox Signal, 2007. **9**(3): p. 343-53.
88. Datla, S.R. and K.K. Griendling, *Reactive oxygen species, NADPH oxidases, and hypertension*. Hypertension, 2010. **56**(3): p. 325-30.
89. Li, H., S. Horke, and U. Forstermann, *Oxidative stress in vascular disease and its pharmacological prevention*. Trends Pharmacol Sci, 2013. **34**(6): p. 313-9.
90. Liu, R., et al., *Oxidative stress induces endothelial cell senescence via downregulation of Sirt6*. Biomed Res Int, 2014. **2014**: p. 902842.
91. Abbas, M., et al., *Endothelial Microparticles From Acute Coronary Syndrome Patients Induce Premature Coronary Artery Endothelial Cell Aging and Thrombogenicity: Role of the Ang II/AT1 Receptor/NADPH Oxidase-Mediated Activation of MAPKs and PI3-Kinase Pathways*. Circulation, 2017. **135**(3): p. 280-296.
92. Basile, D.P. and M.C. Yoder, *Circulating and tissue resident endothelial progenitor cells*. J Cell Physiol, 2014. **229**(1): p. 10-6.
93. De Biase, C., et al., *Effects of physical activity on endothelial progenitor cells (EPCs)*. Front Physiol, 2013. **4**: p. 414.
94. Li Calzi, S., et al., *EPCs and pathological angiogenesis: when good cells go bad*. Microvasc Res, 2010. **79**(3): p. 207-16.

95. Ludmer, P.L., et al., *PARADOXICAL VASOCONSTRICTION INDUCED BY ACETYLCHOLINE IN ATHEROSCLEROTIC CORONARY-ARTERIES*. New England Journal of Medicine, 1986. **315**(17): p. 1046-1051.
96. Anderson, T.J., et al., *Microvascular Function Predicts Cardiovascular Events in Primary Prevention Long-Term Results From the Firefighters and Their Endothelium (FATE) Study*. Circulation, 2011. **123**(2): p. 163-169.
97. Linder, L., et al., *INDIRECT EVIDENCE FOR RELEASE OF ENDOTHELIUM-DERIVED RELAXING FACTOR IN HUMAN FOREARM CIRCULATION INVIVO - BLUNTED RESPONSE IN ESSENTIAL-HYPERTENSION*. Circulation, 1990. **81**(6): p. 1762-1767.
98. Corretti, M.C., et al., *Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery - A report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force*. Journal of the American College of Cardiology, 2002. **39**(2): p. 257-265.
99. Flammer, A.J. and T.F. Luescher, *Human endothelial dysfunction: EDRFs*. Pflugers Archiv-European Journal of Physiology, 2010. **459**(6): p. 1005-1013.
100. Gordon, J.B., et al., *ATHEROSCLEROSIS INFLUENCES THE VASOMOTOR RESPONSE OF EPICARDIAL CORONARY-ARTERIES TO EXERCISE*. Journal of Clinical Investigation, 1989. **83**(6): p. 1946-1952.
101. Nabel, E.G., A.P. Selwyn, and P. Ganz, *PARADOXICAL NARROWING OF ATHEROSCLEROTIC CORONARY-ARTERIES INDUCED BY INCREASES IN HEART-RATE*. Circulation, 1990. **81**(3): p. 850-859.
102. Tschudi, M., et al., *IMPORTANCE OF ENDOTHELIUM-DERIVED NITRUX OXIDE IN PORCINE CORONARY RESISTANCE ARTERIES*. American Journal of Physiology, 1991. **260**(1): p. H13-H20.
103. Nabel, E.G., et al., *DILATION OF NORMAL AND CONSTRICTION OF ATHEROSCLEROTIC CORONARY-ARTERIES CAUSED BY THE COLD PRESSOR TEST*. Circulation, 1988. **77**(1): p. 43-52.
104. Beltrame, J.F., F. Crea, and P. Camici, *Advances in Coronary Microvascular Dysfunction*. Heart Lung and Circulation, 2009. **18**(1): p. 19-27.
105. Camici, P.G. and F. Crea, *Medical progress - Coronary microvascular dysfunction*. New England Journal of Medicine, 2007. **356**(8): p. 830-840.

106. Gibson, C.M., et al., *TIMI frame count: A quantitative method of assessing coronary artery flow*. *Circulation*, 1996. **93**(5): p. 879-888.
107. Schindler, T.H., et al., *Cardiac PET Imaging for the Detection and Monitoring of Coronary Artery Disease and Microvascular Health*. *Jacc-Cardiovascular Imaging*, 2010. **3**(6): p. 623-640.
108. Utz, W., et al., *Blood oxygen level-dependent MRI of tissue oxygenation - Relation to endothelium-dependent and endothelium-independent blood flow changes*. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 2005. **25**(7): p. 1408-1413.
109. Leung, D.Y. and M. Leung, *Significance and assessment of coronary microvascular dysfunction*. *Heart*, 2011. **97**(7): p. 587-595.
110. Gimbrone, M.A., et al., *Endothelial dysfunction, hemodynamic forces, and atherogenesis*, in *Atherosclerosis V: The Fifth Saratoga Conference*, F. Numano and M.A. Gimbrone, Editors. 2000. p. 230-240.
111. McLenachan, J.M., et al., *Early evidence of endothelial vasodilator dysfunction at coronary branch points*. *Circulation*, 1990. **82**(4): p. 1169-73.
112. Petrie, J.R., et al., *How reproducible is bilateral forearm plethysmography?* *British Journal of Clinical Pharmacology*, 1998. **45**(2): p. 131-139.
113. Joannides, R., et al., *NITRIC-OXIDE IS RESPONSIBLE FOR FLOW-DEPENDENT DILATATION OF HUMAN PERIPHERAL CONDUIT ARTERIES IN-VIVO*. *Circulation*, 1995. **91**(5): p. 1314-1319.
114. Taddei, S., et al., *Identification of a cytochrome P450C9-derived endothelium-derived hyperpolarizing factor in essential hypertensive patients*. *Journal of the American College of Cardiology*, 2006. **48**(3): p. 508-515.
115. Thijssen, D.H., et al., *Assessment of flow-mediated dilation in humans: a methodological and physiological guideline*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2011. **300**(1): p. H2-12.
116. Donald, A.E., et al., *Methodological approaches to optimize reproducibility and power in clinical studies of flow-mediated dilation*. *Journal of the American College of Cardiology*, 2008. **51**(20): p. 1959-1964.
117. Faita, F., et al., *Comparison of two automatic methods for the assessment of brachial artery flow-mediated dilation*. *J Hypertens*, 2011. **29**(1): p. 85-90.

118. Charakida, M., et al., *Assessment of atherosclerosis: the role of flow-mediated dilatation*. European Heart Journal, 2010. **31**(23): p. 2854-U24.
119. Inoue, T., et al., *Flow-mediated vasodilation as a diagnostic modality for vascular failure*. Hypertens Res, 2008. **31**(12): p. 2105-13.
120. Peretz, A., et al., *Flow mediated dilation of the brachial artery: an investigation of methods requiring further standardization*. BMC Cardiovasc Disord, 2007. **7**: p. 11.
121. Harris, R.A., et al., *Ultrasound Assessment of Flow-Mediated Dilatation*. Hypertension, 2010. **55**(5): p. 1075-1085.
122. Kooijman, M., et al., *Flow-mediated dilatation in the superficial femoral artery is nitric oxide mediated in humans*. J Physiol, 2008. **586**(4): p. 1137-45.
123. Gemignani, V., et al., *Ultrasound measurement of the brachial artery flow-mediated dilatation without ECG gating*. Ultrasound Med Biol, 2008. **34**(3): p. 385-91.
124. Atkinson, G., et al., *A new approach to improve the specificity of flow-mediated dilatation for indicating endothelial function in cardiovascular research*. J Hypertens, 2013. **31**(2): p. 287-91.
125. Ghiadoni, L., et al., *Evaluation of endothelial function by flow mediated dilatation: methodological issues and clinical importance*. High Blood Press Cardiovasc Prev, 2015. **22**(1): p. 17-22.
126. Greyling, A., et al., *Adherence to guidelines strongly improves reproducibility of brachial artery flow-mediated dilatation*. Atherosclerosis, 2016. **248**: p. 196-202.
127. Ghiadoni, L., et al., *Assessment of flow-mediated dilatation reproducibility: a nationwide multicenter study*. J Hypertens, 2012. **30**(7): p. 1399-405.
128. Atkinson, G., *Shear rate normalization is not essential for removing the dependency of flow-mediated dilatation on baseline artery diameter: past research revisited*. Physiol Meas, 2014. **35**(9): p. 1825-35.
129. Ostrem, J.D., et al., *Presence of a high-flow-mediated constriction phenomenon prior to flow-mediated dilatation in normal weight, overweight, and obese children and adolescents*. J Clin Ultrasound, 2015. **43**(8): p. 495-501.
130. Naylor, L.H., et al., *Measuring peripheral resistance and conduit arterial structure in humans using Doppler ultrasound*. J Appl Physiol (1985), 2005. **98**(6): p. 2311-5.

131. Vita, J.A., et al., *Coronary vasomotor response to acetylcholine relates to risk factors for coronary artery disease*. *Circulation*, 1990. **81**(2): p. 491-7.
132. Brunner, H., et al., *Endothelial function and dysfunction. Part II: Association with cardiovascular risk factors and diseases. A statement by the Working Group on Endothelins and Endothelial Factors of the European Society of Hypertension*. *Journal of Hypertension*, 2005. **23**(2): p. 233-246.
133. Panza, J.A., et al., *ABNORMAL ENDOTHELIUM-DEPENDENT VASCULAR RELAXATION IN PATIENTS WITH ESSENTIAL-HYPERTENSION*. *New England Journal of Medicine*, 1990. **323**(1): p. 22-27.
134. Treasure, C.B., et al., *EPICARDIAL CORONARY-ARTERY RESPONSES TO ACETYLCHOLINE ARE IMPAIRED IN HYPERTENSIVE PATIENTS*. *Circulation Research*, 1992. **71**(4): p. 776-781.
135. Taddei, S., et al., *Defective L-arginine-nitric oxide pathway in offspring of essential hypertensive patients*. *Circulation*, 1996. **94**(6): p. 1298-1303.
136. Zeiher, A.M., V. Schachinger, and J. Minners, *LONG-TERM CIGARETTE-SMOKING IMPAIRS ENDOTHELIUM-DEPENDENT CORONARY ARTERIAL VASODILATOR FUNCTION*. *Circulation*, 1995. **92**(5): p. 1094-1100.
137. Spieker, L.E., et al., *High-density lipoprotein restores endothelial function in hypercholesterolemic men*. *Circulation*, 2002. **105**(12): p. 1399-1402.
138. Steinberg, H.O., et al., *Obesity/insulin resistance is associated with endothelial dysfunction - Implications for the syndrome of insulin resistance*. *Journal of Clinical Investigation*, 1996. **97**(11): p. 2601-2610.
139. Viridis, A., et al., *Mechanisms responsible for endothelial dysfunction induced by fasting hyperhomocystinemia in normotensive subjects and patients with essential hypertension*. *Journal of the American College of Cardiology*, 2001. **38**(4): p. 1106-1115.
140. Hurlimann, D., et al., *Anti-tumor necrosis factor-alpha treatment improves endothelial function in patients with rheumatoid arthritis*. *Circulation*, 2002. **106**(17): p. 2184-2187.
141. Charakida, M., et al., *Endothelial dysfunction in childhood infection*. *Circulation*, 2005. **111**(13): p. 1660-1665.
142. Anderson, T.J., et al., *SYSTEMIC NATURE OF ENDOTHELIAL DYSFUNCTION IN ATHEROSCLEROSIS*. *American Journal of Cardiology*, 1995. **75**(6): p. B71-B74.

143. Bonetti, P.O., et al., *Noninvasive identification of patients with early coronary atherosclerosis by assessment of digital reactive hyperemia*. Journal of the American College of Cardiology, 2004. **44**(11): p. 2137-2141.
144. Halcox, J.P.J., et al., *Endothelial Function Predicts Progression of Carotid Intima-Media Thickness*. Circulation, 2009. **119**(7): p. 1005-1012.
145. Rossi, R., et al., *Endothelial function affects early carotid atherosclerosis progression in hypertensive postmenopausal women*. Journal of Hypertension, 2011. **29**(6): p. 1136-1144.
146. Charakida, M., et al., *Endothelial response to childhood infection: The role of mannose-binding lectin (MBL)*. Atherosclerosis, 2010. **208**(1): p. 217-221.
147. Dawson, E.A., et al., *Changes in vascular and cardiac function after prolonged strenuous exercise in humans*. Journal of Applied Physiology, 2008. **105**(5): p. 1562-1568.
148. Plotnick, G.D., M.C. Corretti, and R.A. Vogel, *Effect of antioxidant vitamins on the transient impairment of endothelium-dependent brachial artery vasoactivity following a single high-fat meal*. Jama-Journal of the American Medical Association, 1997. **278**(20): p. 1682-1686.
149. Shechter, M., et al., *Long-term association of brachial artery flow-mediated vasodilation and cardiovascular events in middle-aged subjects with no apparent heart disease*. International Journal of Cardiology, 2009. **134**(1): p. 52-58.
150. Hirsch, L., et al., *The impact of early compared to late morning hours on brachial endothelial function and long-term cardiovascular events in healthy subjects with no apparent coronary heart disease*. International Journal of Cardiology, 2011. **151**(3): p. 342-347.
151. Yeboah, J., et al., *Brachial flow-mediated dilation predicts incident cardiovascular events in older adults - The Cardiovascular Health Study*. Circulation, 2007. **115**(18): p. 2390-2397.
152. Yeboah, J., et al., *Predictive Value of Brachial Flow-Mediated Dilation for Incident Cardiovascular Events in a Population-Based Study The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis*. Circulation, 2009. **120**(6): p. 502-509.
153. Graham, I., et al., *European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: Full text*. European Journal of Cardiovascular Prevention & Rehabilitation, 2007. **14**: p. S1-S113.

154. Greenland, P., et al., *2010 ACCF/AHA guideline for assessment of cardiovascular risk in asymptomatic adults: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines*. *Circulation*, 2010. **122**(25): p. E584-E636.
155. Lavi, S., et al., *Segmental coronary endothelial dysfunction in patients with minimal atherosclerosis is associated with necrotic core plaques*. *Heart*, 2009. **95**(18): p. 1525-1530.
156. Stone, G.W., et al., *A Prospective Natural-History Study of Coronary Atherosclerosis*. *New England Journal of Medicine*, 2011. **364**(3): p. 226-235.
157. Hasdai, D., et al., *Coronary endothelial dysfunction in humans is associated with myocardial perfusion defects*. *Circulation*, 1997. **96**(10): p. 3390-3395.
158. Lerman, A., et al., *Microcirculatory dysfunction in ST-elevation myocardial infarction: cause, consequence, or both?* *European Heart Journal*, 2007. **28**(7): p. 788-797.
159. Clavijo, L.C., et al., *Metabolic syndrome in patients with acute myocardial infarction is associated with increased infarct size and in-hospital complications*. *Cardiovascular Revascularization Medicine*, 2006. **7**(1): p. 7-11.
160. Ganz, P. and P.Y. Hsue, *Individualized Approach to the Management of Coronary Heart Disease Identifying the Nonresponders Before It Is Too Late*. *Journal of the American College of Cardiology*, 2009. **53**(4): p. 331-333.
161. Crane, F.L., *Biochemical functions of coenzyme Q10*. *J Am Coll Nutr*, 2001. **20**(6): p. 591-8.
162. Crane, F.L., et al., *Isolation of a quinone from beef heart mitochondria*. *Biochim Biophys Acta*, 1957. **25**(1): p. 220-1.
163. Morton, R.A., *Ubiquinone*. *Nature*, 1958. **182**(4652): p. 1764-7.
164. Chance, B. and G.R. Williams, *The respiratory chain and oxidative phosphorylation*. *Adv Enzymol Relat Subj Biochem*, 1956. **17**: p. 65-134.
165. Littarru, G.P. and L. Tiano, *Bioenergetic and antioxidant properties of coenzyme Q10: recent developments*. *Mol Biotechnol*, 2007. **37**(1): p. 31-7.
166. Bentinger, M., M. Tekle, and G. Dallner, *Coenzyme Q--biosynthesis and functions*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010. **396**(1): p. 74-9.

167. Quinzii, C.M., et al., *Respiratory chain dysfunction and oxidative stress correlate with severity of primary CoQ10 deficiency*. FASEB J, 2008. **22**(6): p. 1874-85.
168. Montini, G., C. Malaventura, and L. Salviati, *Early coenzyme Q10 supplementation in primary coenzyme Q10 deficiency*. N Engl J Med, 2008. **358**(26): p. 2849-50.
169. Kamei, M., et al., *The distribution and content of ubiquinone in foods*. Int J Vitam Nutr Res, 1986. **56**(1): p. 57-63.
170. Kubo, H., et al., *Food content of ubiquinol-10 and ubiquinone-10 in the Japanese diet*. Journal of Food Composition and Analysis, 2008. **21**(3): p. 199-210.
171. Okamoto, T., et al., *Serum levels of coenzyme Q10 and lipids in patients during total parenteral nutrition*. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo), 1986. **32**(1): p. 1-12.
172. Ghirlanda, G., et al., *Evidence of plasma CoQ10-lowering effect by HMG-CoA reductase inhibitors: a double-blind, placebo-controlled study*. J Clin Pharmacol, 1993. **33**(3): p. 226-9.
173. Staffa, J.A., J. Chang, and L. Green, *Cerivastatin and reports of fatal rhabdomyolysis*. N Engl J Med, 2002. **346**(7): p. 539-40.
174. Golomb, B.A. and M.A. Evans, *Statin adverse effects : a review of the literature and evidence for a mitochondrial mechanism*. Am J Cardiovasc Drugs, 2008. **8**(6): p. 373-418.
175. Folkers, K., et al., *Lovastatin decreases coenzyme Q levels in humans*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(22): p. 8931-4.
176. Lamperti, C., et al., *Muscle coenzyme Q10 level in statin-related myopathy*. Arch Neurol, 2005. **62**(11): p. 1709-12.
177. Bhagavan, H.N. and R.K. Chopra, *Coenzyme Q10: absorption, tissue uptake, metabolism and pharmacokinetics*. Free Radic Res, 2006. **40**(5): p. 445-53.
178. Mohr, D., V.W. Bowry, and R. Stocker, *Dietary supplementation with coenzyme Q10 results in increased levels of ubiquinol-10 within circulating lipoproteins and increased resistance of human low-density lipoprotein to the initiation of lipid peroxidation*. Biochim Biophys Acta, 1992. **1126**(3): p. 247-54.
179. Johansen, K., et al., *Coenzyme Q10, alpha-tocopherol and free cholesterol in HDL and LDL fractions*. Ann Med, 1991. **23**(6): p. 649-56.

180. Molyneux, S.L., et al., *Coenzyme Q10: an independent predictor of mortality in chronic heart failure*. J Am Coll Cardiol, 2008. **52**(18): p. 1435-41.
181. Landi, L., et al., *Effect of oxygen free radicals on ubiquinone in aqueous solution and phospholipid vesicles*. Biochim Biophys Acta, 1987. **902**(2): p. 200-6.
182. Mellors, A. and A.L. Tappel, *The inhibition of mitochondrial peroxidation by ubiquinone and ubiquinol*. J Biol Chem, 1966. **241**(19): p. 4353-6.
183. Kagan, V., E. Serbinova, and L. Packer, *Antioxidant effects of ubiquinones in microsomes and mitochondria are mediated by tocopherol recycling*. Biochem Biophys Res Commun, 1990. **169**(3): p. 851-7.
184. Ernster, L. and P. Forsmark-Andree, *Ubiquinol: an endogenous antioxidant in aerobic organisms*. Clin Investig, 1993. **71**(8 Suppl): p. S60-5.
185. Mordente, A., et al., *Antioxidant effect of coenzyme Q on hydrogen peroxide-activated myoglobin*. Clin Investig, 1993. **71**(8 Suppl): p. S92-6.
186. Tomasetti, M., et al., *Coenzyme Q10 enrichment decreases oxidative DNA damage in human lymphocytes*. Free Radic Biol Med, 1999. **27**(9-10): p. 1027-32.
187. Tomasetti, M., et al., *In vivo supplementation with coenzyme Q10 enhances the recovery of human lymphocytes from oxidative DNA damage*. FASEB J, 2001. **15**(8): p. 1425-7.
188. Esterbauer, H., et al., *The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL*. Free Radic Biol Med, 1992. **13**(4): p. 341-90.
189. Alleva, R., et al., *The roles of coenzyme Q10 and vitamin E on the peroxidation of human low density lipoprotein subfractions*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(20): p. 9388-91.
190. Witting, P.K., et al., *Anti-atherogenic effect of coenzyme Q10 in apolipoprotein E gene knockout mice*. Free Radic Biol Med, 2000. **29**(3-4): p. 295-305.
191. Singh, R.B., et al., *Effect of coenzyme Q10 on experimental atherosclerosis and chemical composition and quality of atheroma in rabbits*. Atherosclerosis, 2000. **148**(2): p. 275-82.
192. Bhagavan, H.N. and R.K. Chopra, *Plasma coenzyme Q10 response to oral ingestion of coenzyme Q10 formulations*. Mitochondrion, 2007. **7 Suppl**: p. S78-88.

193. Yalcin, A., et al., *Coenzyme Q10 concentrations in coronary artery disease*. Clin Biochem, 2004. **37**(8): p. 706-9.
194. Reahal, S. and J. Wrigglesworth, *Tissue concentrations of coenzyme Q10 in the rat following its oral and intraperitoneal administration*. Drug Metab Dispos, 1992. **20**(3): p. 423-7.
195. Ross, D., et al., *NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1): chemoprotection, bioactivation, gene regulation and genetic polymorphisms*. Chem Biol Interact, 2000. **129**(1-2): p. 77-97.
196. Hosoe, K., et al., *Study on safety and bioavailability of ubiquinol (Kaneka QH) after single and 4-week multiple oral administration to healthy volunteers*. Regul Toxicol Pharmacol, 2007. **47**(1): p. 19-28.
197. Morisco, C., B. Trimarco, and M. Condorelli, *Effect of coenzyme Q10 therapy in patients with congestive heart failure: a long-term multicenter randomized study*. Clin Investig, 1993. **71**(8 Suppl): p. S134-6.
198. Hodgson, J.M., et al., *Coenzyme Q10 improves blood pressure and glycaemic control: a controlled trial in subjects with type 2 diabetes*. Eur J Clin Nutr, 2002. **56**(11): p. 1137-42.
199. Langsjoen, P.H., S. Vadhanavikit, and K. Folkers, *Response of patients in classes III and IV of cardiomyopathy to therapy in a blind and crossover trial with coenzyme Q10*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**(12): p. 4240-4.
200. Singh, U., S. Devaraj, and I. Jialal, *Coenzyme Q10 supplementation and heart failure*. Nutr Rev, 2007. **65**(6 Pt 1): p. 286-93.
201. Munzel, T., et al., *Pathophysiological role of oxidative stress in systolic and diastolic heart failure and its therapeutic implications*. Eur Heart J, 2015. **36**(38): p. 2555-64.
202. Mortensen, S.A., et al., *The effect of coenzyme Q10 on morbidity and mortality in chronic heart failure: results from Q-SYMBIO: a randomized double-blind trial*. JACC Heart Fail, 2014. **2**(6): p. 641-9.
203. Li, H., S. Horke, and U. Forstermann, *Vascular oxidative stress, nitric oxide and atherosclerosis*. Atherosclerosis, 2014. **237**(1): p. 208-19.
204. Nozik-Grayck, E., H.B. Suliman, and C.A. Piantadosi, *Extracellular superoxide dismutase*. Int J Biochem Cell Biol, 2005. **37**(12): p. 2466-71.

205. Watts, G.F., et al., *Coenzyme Q(10) improves endothelial dysfunction of the brachial artery in Type II diabetes mellitus*. Diabetologia, 2002. **45**(3): p. 420-6.
206. Tiano, L., et al., *Effect of coenzyme Q10 administration on endothelial function and extracellular superoxide dismutase in patients with ischaemic heart disease: a double-blind, randomized controlled study*. Eur Heart J, 2007. **28**(18): p. 2249-55.
207. Belardinelli, R., et al., *Coenzyme Q10 and exercise training in chronic heart failure*. Eur Heart J, 2006. **27**(22): p. 2675-81.
208. Olivieri, F., et al., *Anti-inflammatory effect of ubiquinol-10 on young and senescent endothelial cells via miR-146a modulation*. Free Radic Biol Med, 2013. **63**: p. 410-20.
209. Silvestri, S., et al., *Coenzyme Q10 and alpha-lipoic acid: antioxidant and pro-oxidant effects in plasma and peripheral blood lymphocytes of supplemented subjects*. J Clin Biochem Nutr, 2015. **57**(1): p. 21-6.
210. Griess, P., *Bemerkungen zu der Abhandlung der HH. Weselsky und Benedikt „Ueber einige Azoverbindungen“*. Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft, 1879. **12**(1): p. 426-428.
211. Sun, J., et al., *Measurement of Nitric Oxide Production in Biological Systems by Using Griess Reaction Assay*. Sensors, 2003. **3**(8): p. 276.
212. Weissman, B.A. and S.S. Gross, *Measurement of NO and NO synthase*. Curr Protoc Neurosci, 2001. **Chapter 7**: p. Unit7 13.
213. Moshage, H., et al., *Nitrite and nitrate determinations in plasma: a critical evaluation*. Clin Chem, 1995. **41**(6 Pt 1): p. 892-6.
214. Nanetti, L., et al., *Nitric oxide and peroxynitrite platelet levels in women with small-for-gestational-age fetuses*. BJOG, 2008. **115**(1): p. 14-21.
215. Gao, L., et al., *Effects of coenzyme Q10 on vascular endothelial function in humans: a meta-analysis of randomized controlled trials*. Atherosclerosis, 2012. **221**(2): p. 311-6.
216. Langsjoen, P.H. and A.M. Langsjoen, *Overview of the use of CoQ10 in cardiovascular disease*. Biofactors, 1999. **9**(2-4): p. 273-84.
217. Suksomboon, N., N. Poolsup, and N. Juanak, *Effects of coenzyme Q10 supplementation on metabolic profile in diabetes: a systematic review and meta-analysis*. J Clin Pharm Ther, 2015. **40**(4): p. 413-8.

218. Cooke, C.L. and S.T. Davidge, *Peroxynitrite increases iNOS through NF-kappaB and decreases prostacyclin synthase in endothelial cells*. Am J Physiol Cell Physiol, 2002. **282**(2): p. C395-402.
219. Raitakari, O.T., et al., *Coenzyme Q improves LDL resistance to ex vivo oxidation but does not enhance endothelial function in hypercholesterolemic young adults*. Free Radic Biol Med, 2000. **28**(7): p. 1100-5.
220. Dai, Y.L., et al., *Reversal of mitochondrial dysfunction by coenzyme Q10 supplement improves endothelial function in patients with ischaemic left ventricular systolic dysfunction: a randomized controlled trial*. Atherosclerosis, 2011. **216**(2): p. 395-401.
221. Harris, R.A., et al., *The flow-mediated dilation response to acute exercise in overweight active and inactive men*. Obesity (Silver Spring), 2008. **16**(3): p. 578-84.
222. Bailey, T.G., et al., *Cardiorespiratory fitness modulates the acute flow-mediated dilation response following high-intensity but not moderate-intensity exercise in elderly men*. J Appl Physiol (1985), 2017. **122**(5): p. 1238-1248.
223. Shaikh, A.Y., et al., *Relations of Arterial Stiffness and Brachial Flow-Mediated Dilation With New-Onset Atrial Fibrillation: The Framingham Heart Study*. Hypertension, 2016. **68**(3): p. 590-6.
224. Thijssen, D.H.J., et al., *Assessment of flow-mediated dilation in humans: a methodological and physiological guideline*. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, 2011. **300**(1): p. H2-H12.
225. Black, M.A., et al., *Importance of measuring the time course of flow-mediated dilatation in humans*. Hypertension, 2008. **51**(2): p. 203-10.
226. Betik, A.C., V.B. Luckham, and R.L. Hughson, *Flow-mediated dilation in human brachial artery after different circulatory occlusion conditions*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004. **286**(1): p. H442-8.
227. Califano, J.P. and C.A. Reinhart-King, *Exogenous and endogenous force regulation of endothelial cell behavior*. J Biomech, 2010. **43**(1): p. 79-86.
228. Atkinson, G., et al., *Is the ratio of flow-mediated dilation and shear rate a statistically sound approach to normalization in cross-sectional studies on endothelial function?* J Appl Physiol (1985), 2009. **107**(6): p. 1893-9.

FIGURE E TABELLE

Figura 1

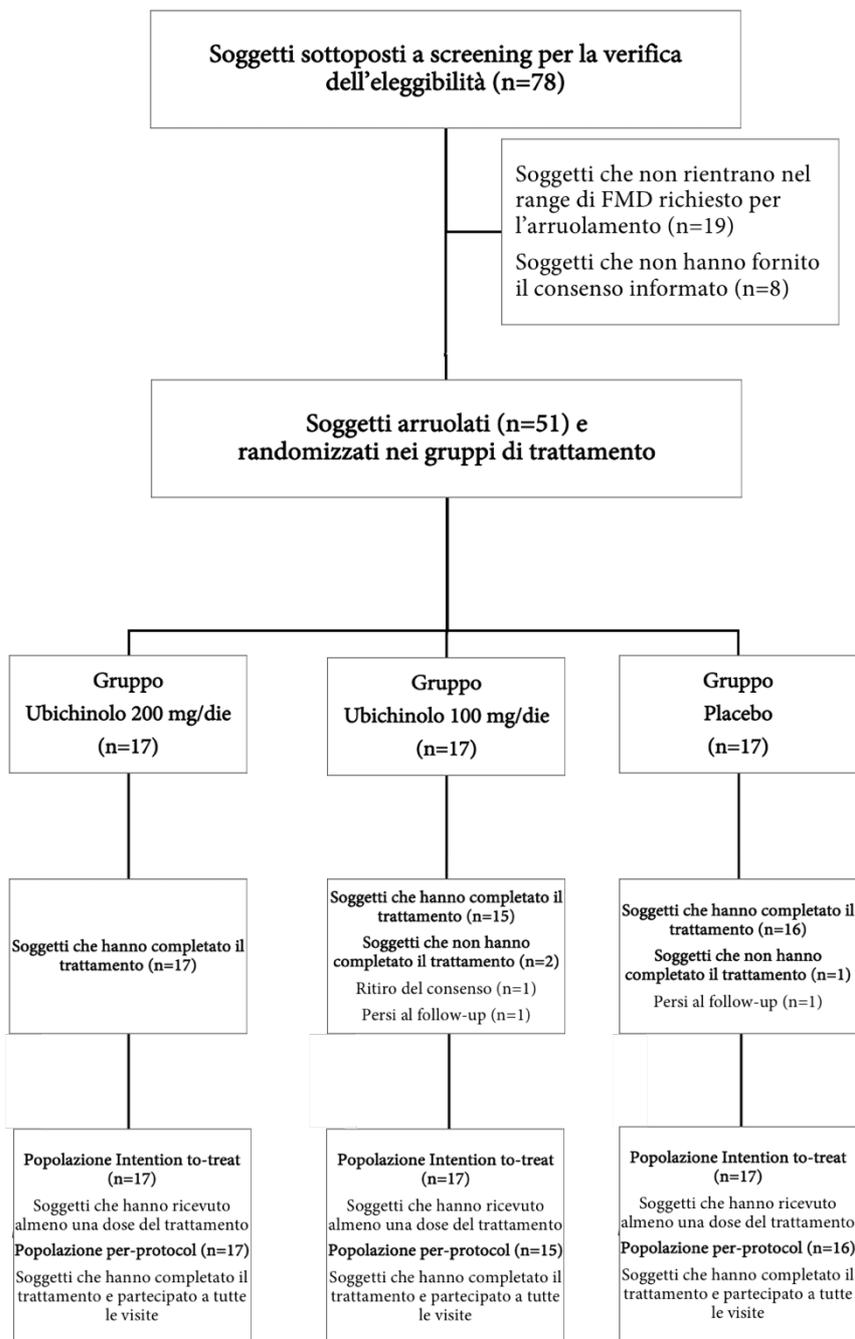


Figura 1

Composizione della popolazione in studio e dei gruppi di trattamento, in seguito a randomizzazione, in accordo con i criteri di inclusione ed esclusione.

Figura 2

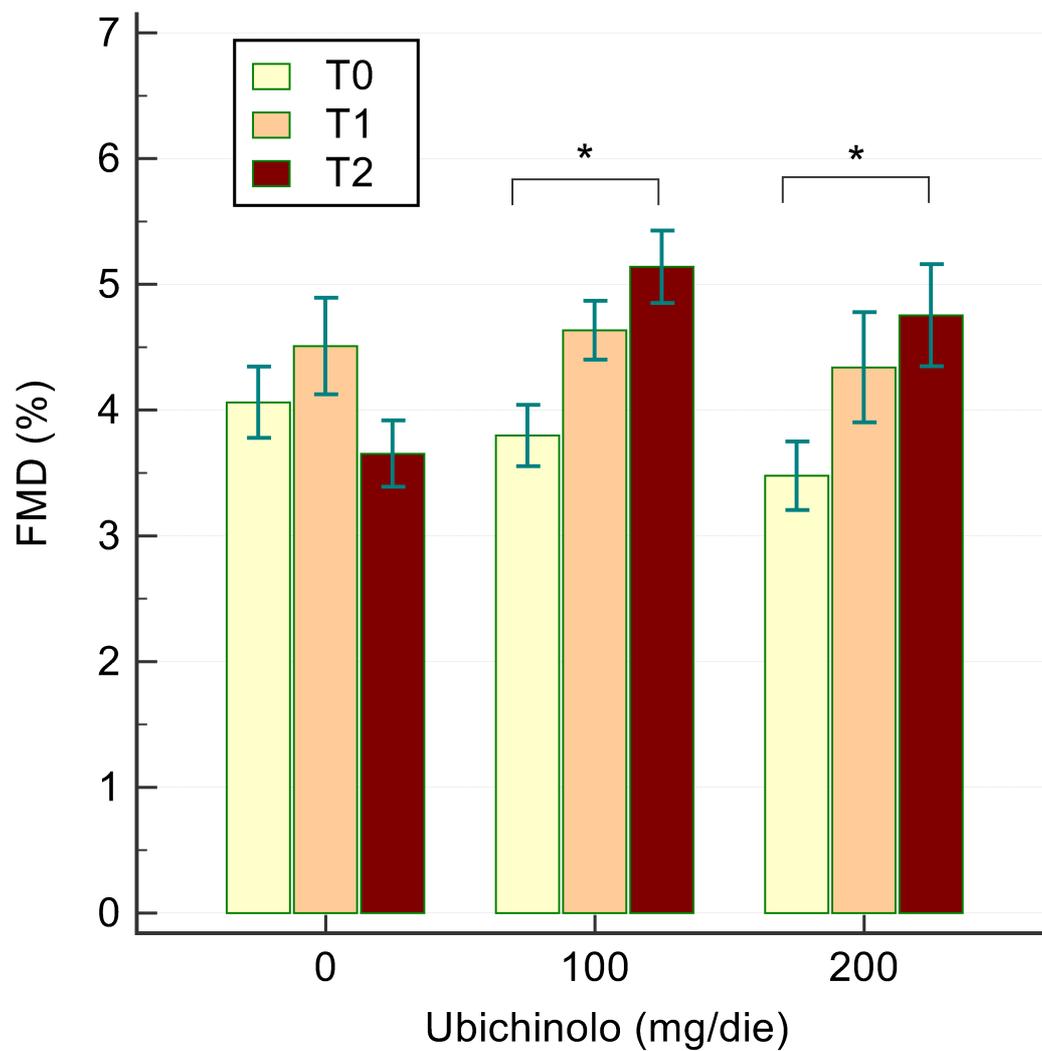


Figura 2

Valutazione della flow-mediated dilation (FMD) nei soggetti in studio al reclutamento (T0), dopo 4 settimane (T1) e dopo 8 settimane (T2). I dati sono riportati come media \pm SEM.

*, $p < 0.001$, confronto con la rilevazione effettuata al reclutamento.

Figura 3

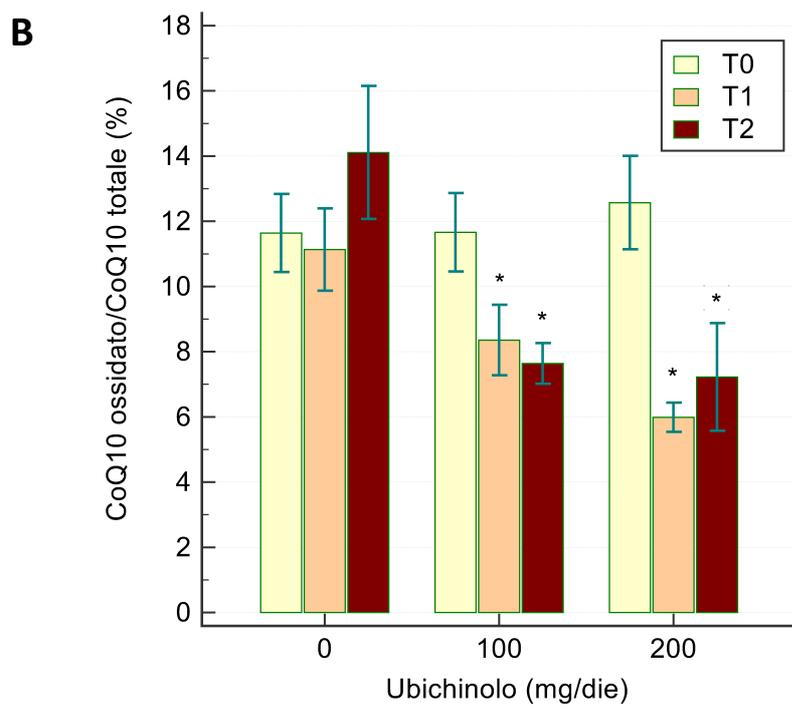
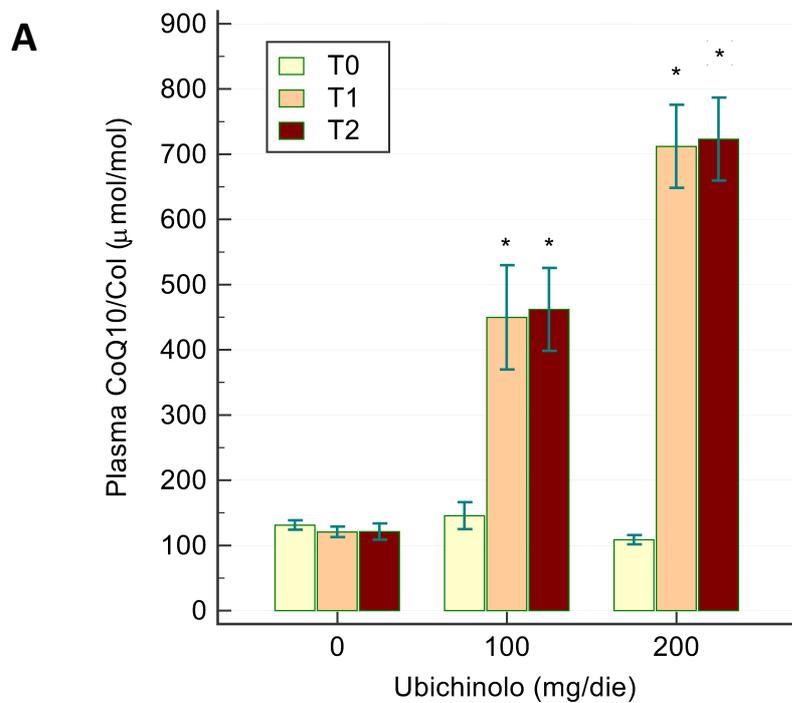


Figura 3

Valutazione dei livelli plasmatici di Coenzima Q10 totale (A) e dello stato ossidativo del CoQ10, espresso come CoQ10 ossidato/CoQ10 totale (B) nei soggetti in studio al reclutamento (T0), dopo 4 settimane (T1) e dopo 8 settimane (T2). I dati sono riportati come media \pm SEM.

*, $p < 0.001$, confronto con le rilevazioni effettuate al reclutamento.

Figura 4

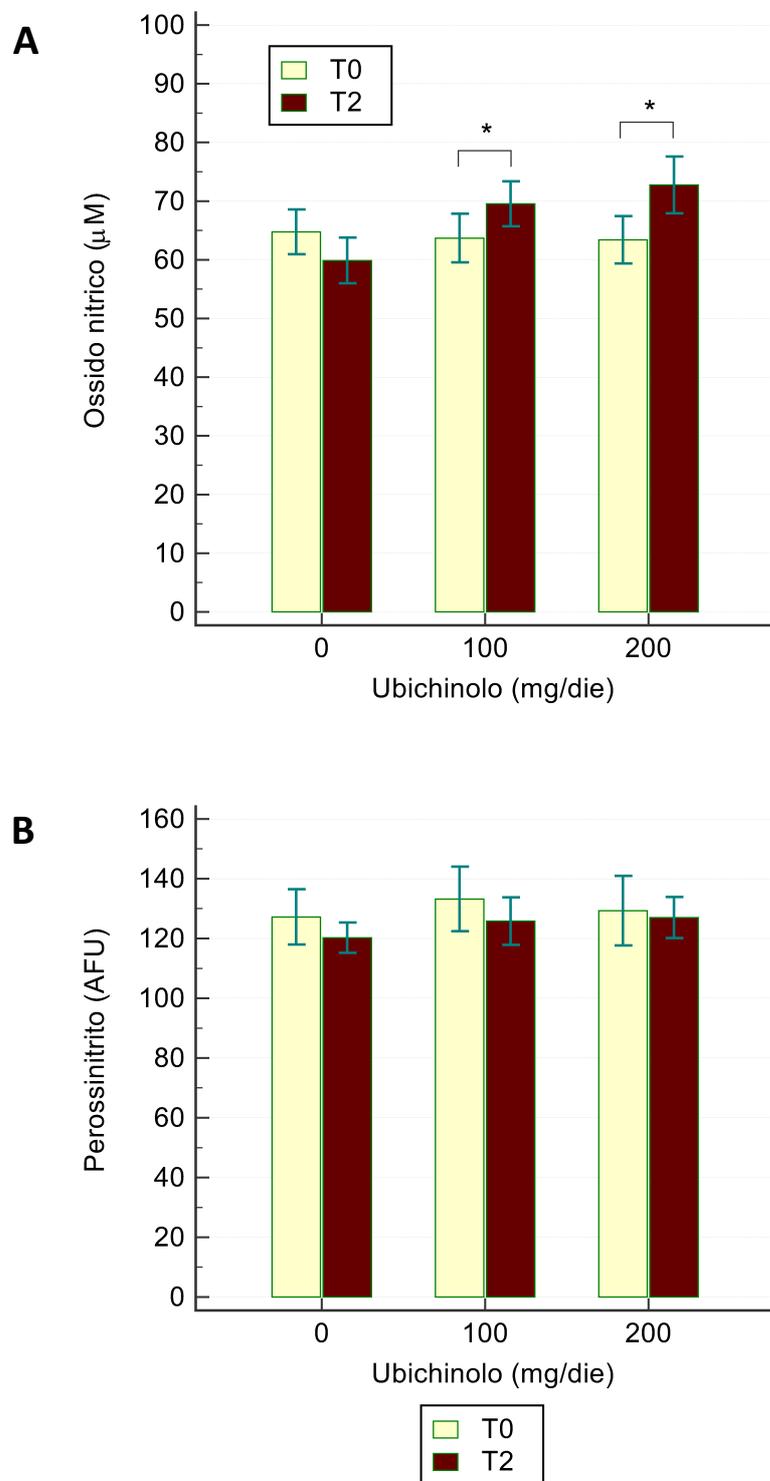


Figura 4

Valutazione dei livelli plasmatici di ossido nitrico (NO; A) e di perossinitrito (B) nei soggetti in studio al reclutamento (T0) e dopo 8 settimane (T2). I dati sono riportati come media \pm SEM. AFU, unità arbitrarie di fluorescenza.

*, $p < 0.01$, confronto con le rilevazioni effettuate al reclutamento.

Figura 5

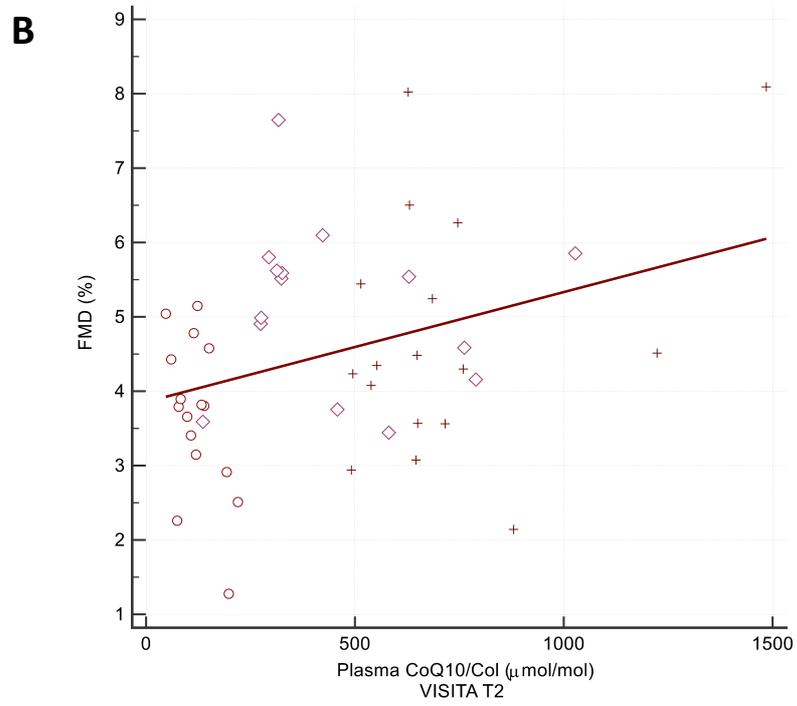
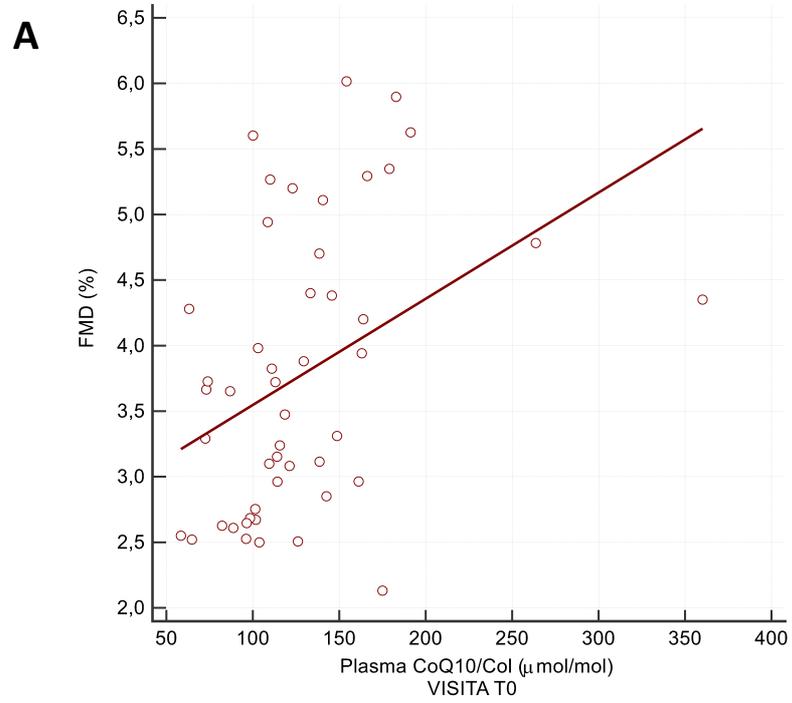


Figura 5

Correlazione lineare secondo Pearson tra i valori di FMD e i livelli plasmatici di Coenzima Q10 al reclutamento (A; T0; $r=0.39$, $F=8.279$, $p=0.0061$) e dopo 8 settimane (B; T2, $r=0.33$, $F=5.769$, $p=0.02$). I cerchi indicano il gruppo placebo, i quadrati indicano il gruppo ubiquinolo 100 mg/die, le croci indicano il gruppo ubiquinolo 200 mg/die.

Figura 6

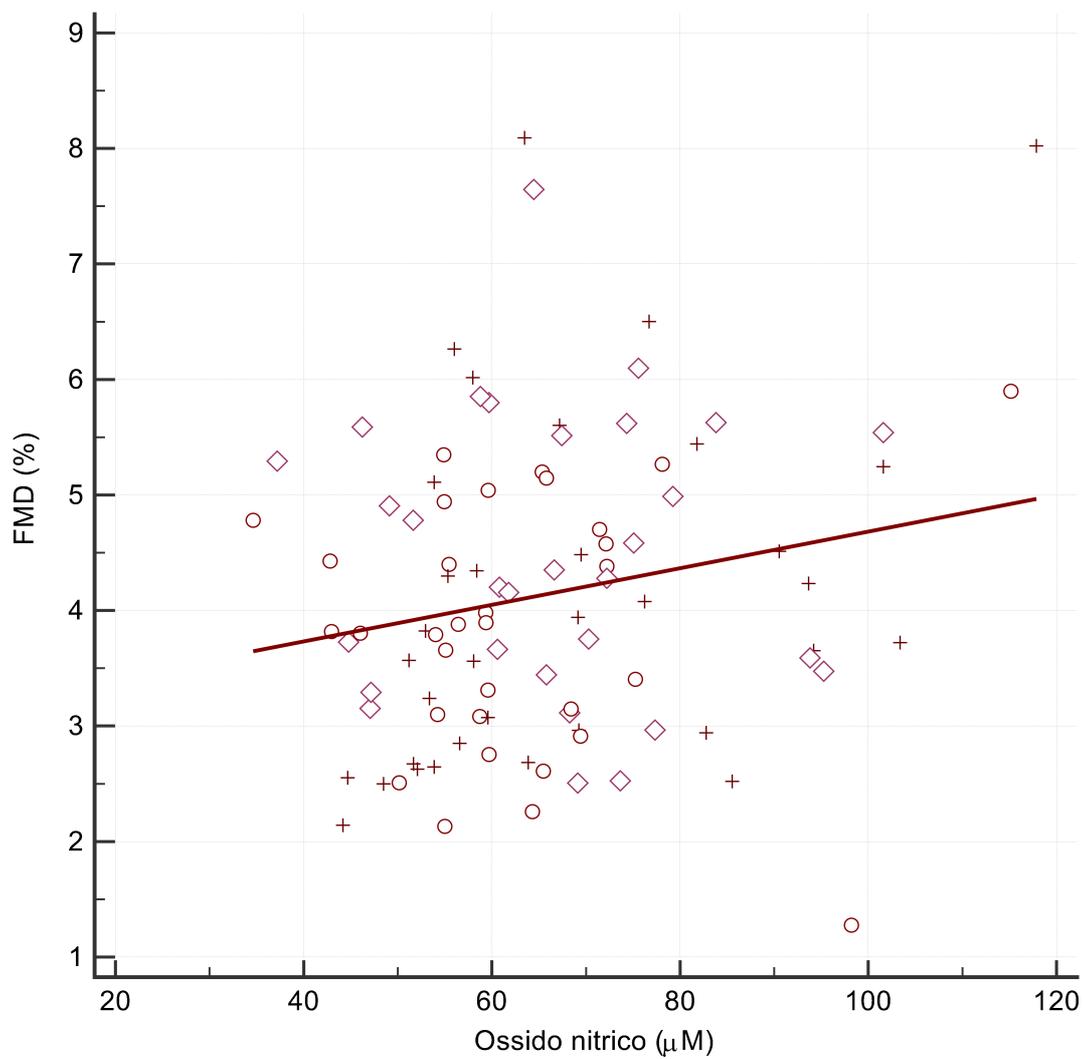


Figura 6

Correlazione lineare secondo Pearson tra i livelli plasmatici di ossido nitrico (NO) e i valori di FMD al reclutamento (T0) e dopo 8 settimane (T2). $r=0.20$, $F=3.931$, $p=0.049$. I cerchi indicano il gruppo placebo, i quadrati indicano il gruppo ubichinolo 100 mg/die, le croci indicano il gruppo ubichinolo 200 mg/die.

Figura 7

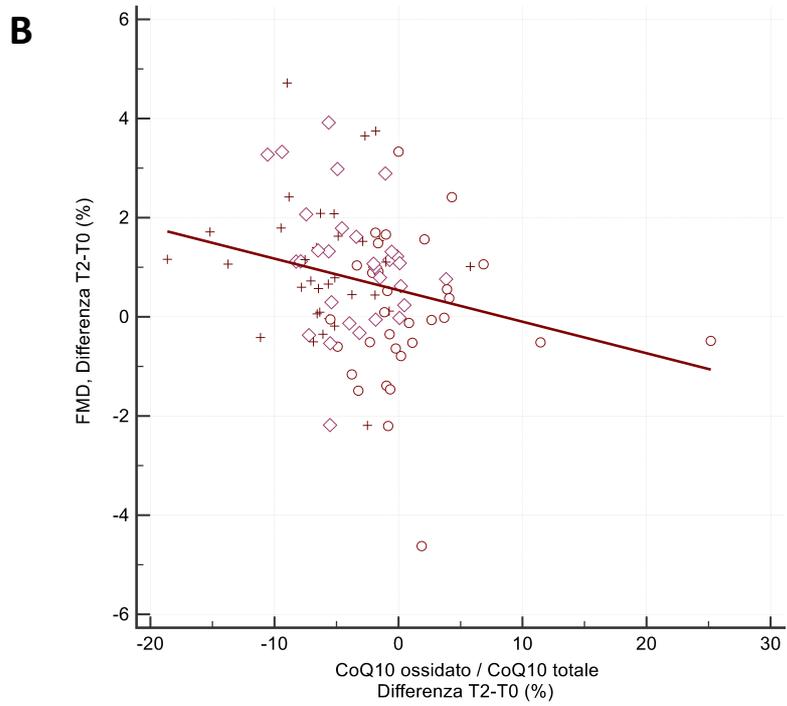
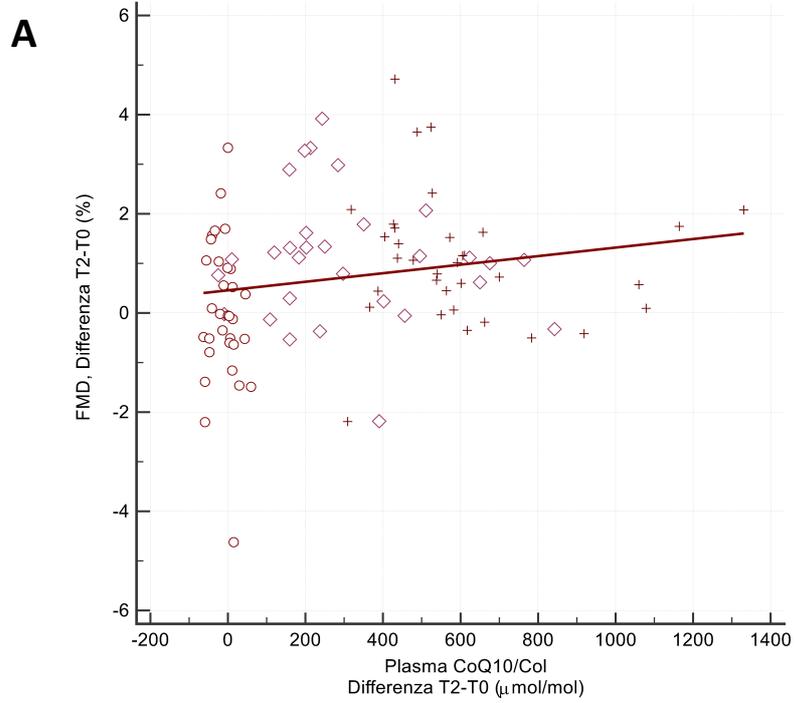


Figura 7

Correlazione lineare secondo Pearson tra i valori di FMD e i livelli plasmatici di Coenzima Q10 totale (A; $r=0.33$, $F=5.668$, $p=0.022$) e ossidato (B; $r=0.35$, $F=6.565$, $p=0.014$). I cerchi indicano il gruppo placebo, i quadrati indicano il gruppo ubichinolo 100 mg/die, le croci indicano il gruppo ubichinolo 200 mg/die.

Figura 8

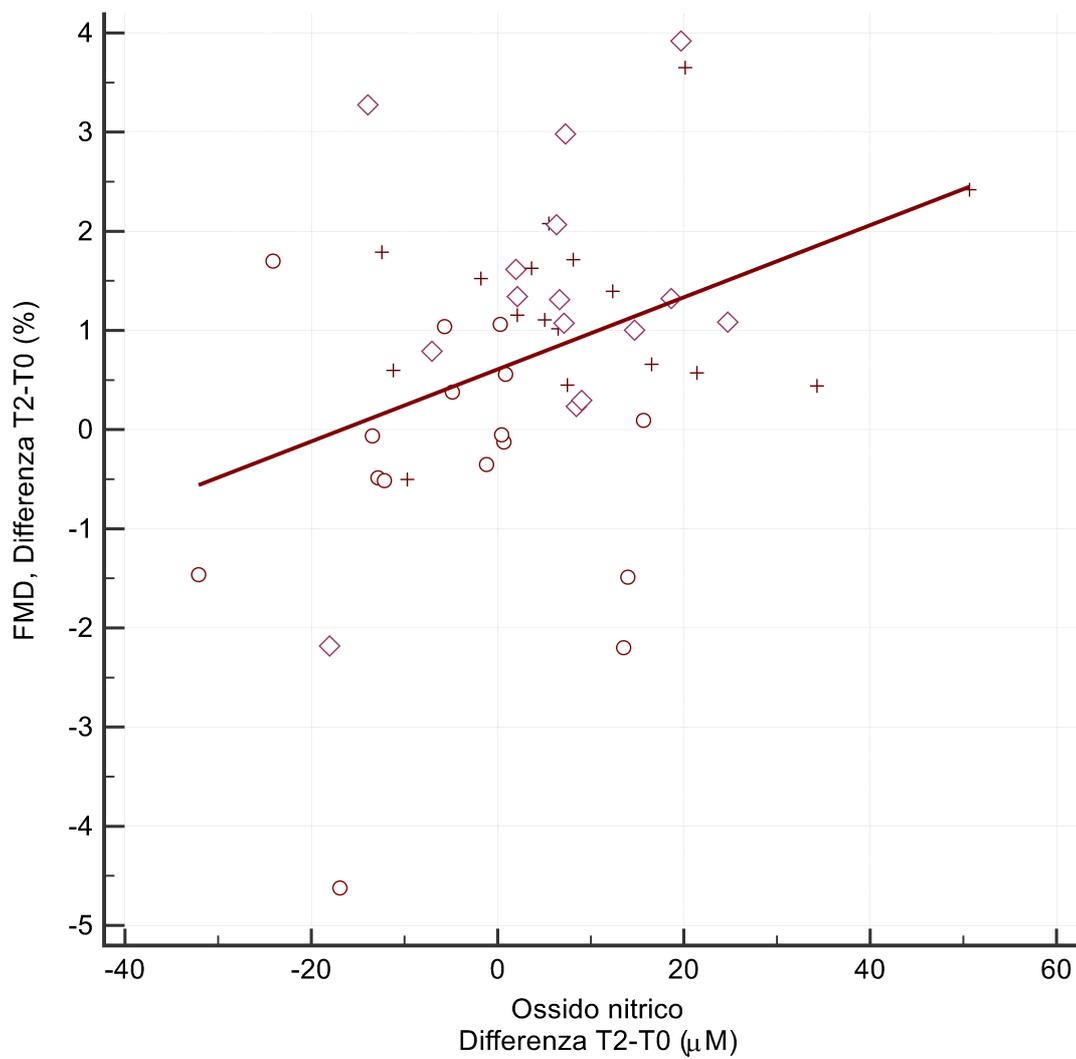


Figura 8

Correlazione lineare secondo Pearson tra le variazioni dei livelli plasmatici di ossido nitrico (NO) e dei valori di FMD al termine del trattamento. $r=0.36$, $F=6.802$, $p=0.012$. I cerchi indicano il gruppo placebo, i quadrati indicano il gruppo ubichinolo 100 mg/die, le croci indicano il gruppo ubichinolo 200 mg/die.

Figura 9

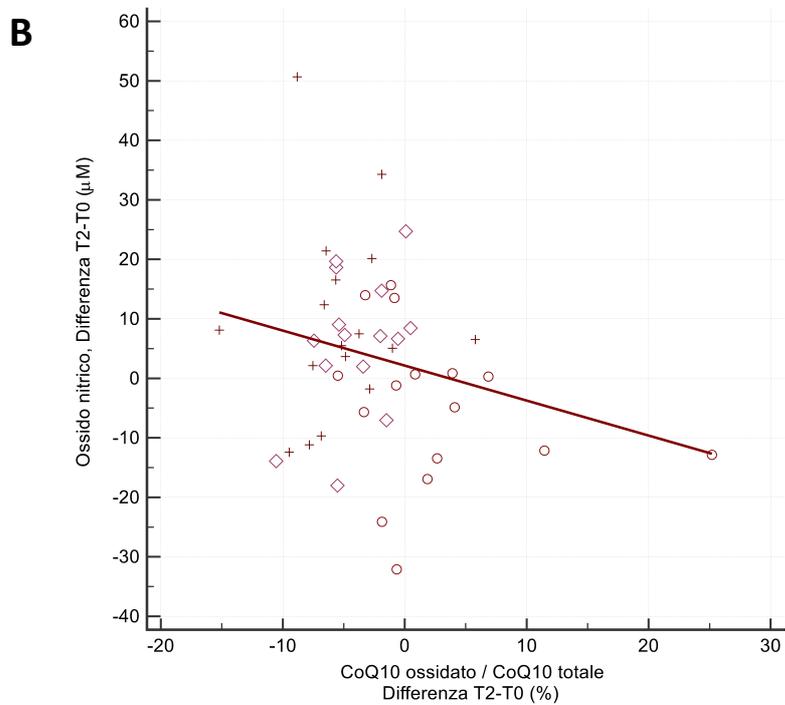
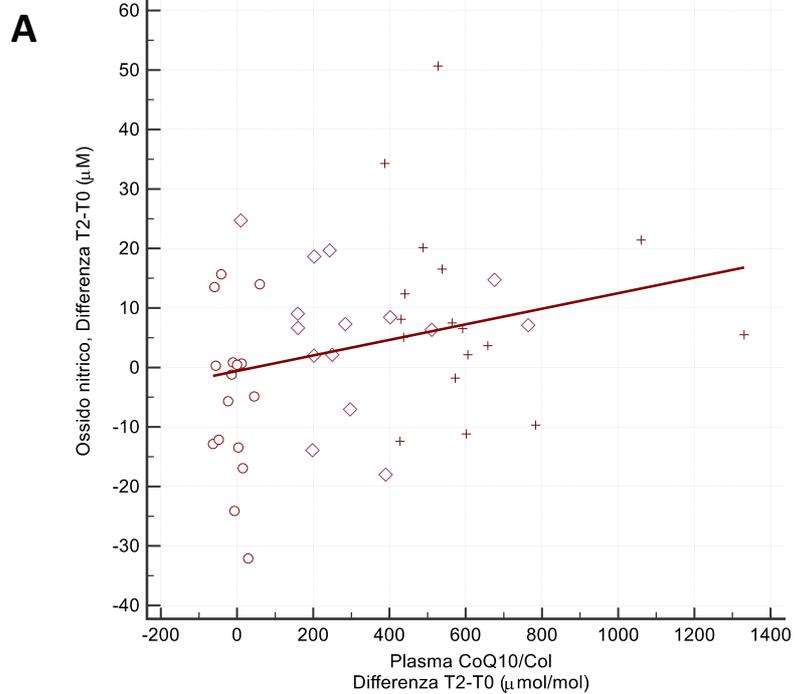


Figura 9

Correlazione lineare secondo Pearson tra le differenze nella concentrazione plasmatica di ossido nitrico (NO) al termine del trattamento e livelli di CoQ10 totale (A; $r=0.28$, $F=3.921$, $p=0.048$) e ossidato (B; $r=0.24$, $F=2.920$, $p=0.09$). I cerchi indicano il gruppo placebo, i quadrati indicano il gruppo ubiquinolo 100 mg/die, le croci indicano il gruppo ubiquinolo 200 mg/die.

Figura 10

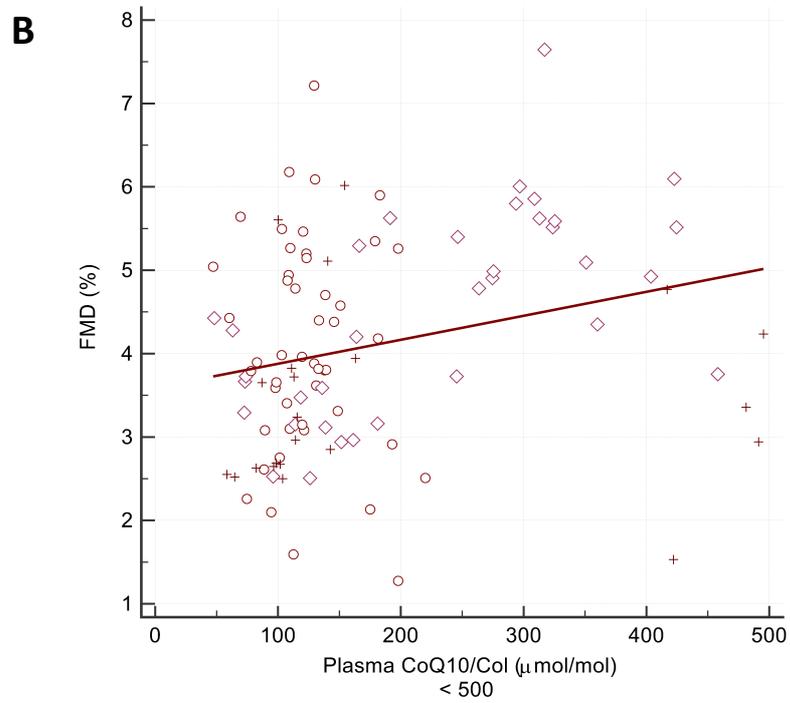
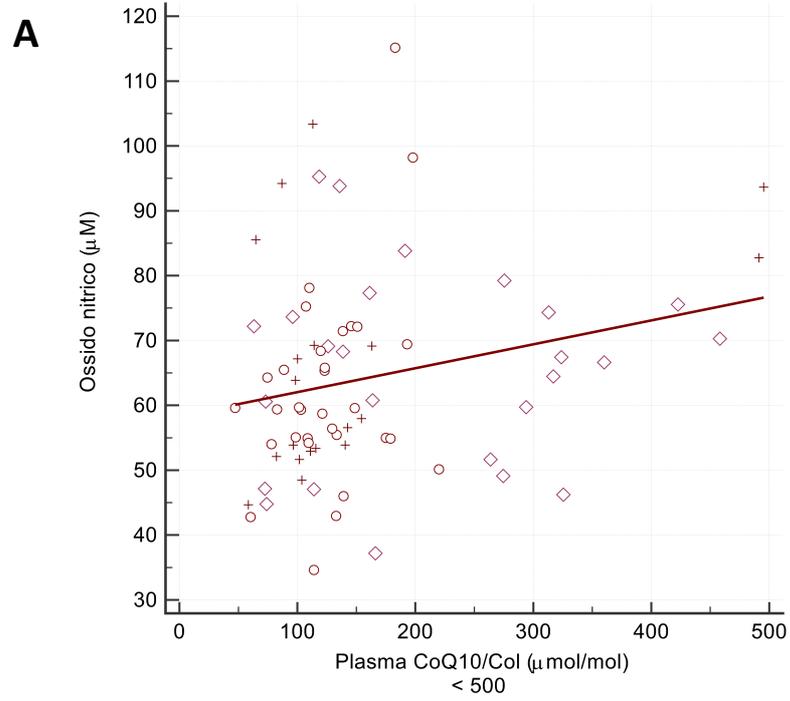


Figura 10

Correlazione lineare secondo Pearson tra livelli plasmatici di CoQ10 totale, valori di FMD (A; $r=0.39$, $F=4.581$, $p=0.042$) e concentrazioni di ossido nitrico (NO) al termine del trattamento (B; $r=0.32$, $F=6.206$, $p=0.016$) nei soggetti con concentrazione plasmatica di CoQ10 totale inferiore a $500 \mu\text{mol/mol}$. I cerchi indicano il gruppo placebo, i quadrati indicano il gruppo ubichinolo 100 mg/die, le croci indicano il gruppo ubichinolo 200 mg/die.

Tabella 1

Caratteristiche cliniche dei soggetti al reclutamento. I valori sono espressi come media \pm DS o come mediana (range interquartile). BMI, indice di massa corporea.

Variabile	Ubichinolo 200 mg/die (N=17)	Ubichinolo 100 mg/die (N=17)	Placebo (N=17)
Età, anni	58.2 \pm 5.1	59.3 \pm 6.4	59.6 \pm 3.8
Maschi / Femmine	7 / 10	6 / 11	9 / 8
Peso, kg	70.5 \pm 10.5	73.7 \pm 11.3	73.9 \pm 8.6
BMI, kg/m ²	23.5 \pm 4.2	24.6 \pm 4.4	26.4 \pm 5.6
Frequenza cardiaca, battiti/min	64 \pm 8	69 \pm 7	67 \pm 10
Pressione arteriosa sistolica, mmHg	132 \pm 15	129 \pm 13	135 \pm 12
Pressione arteriosa diastolica, mmHg	83 \pm 7	86 \pm 9	89 \pm 10
Colesterolo totale, mg/dl	221.4 \pm 23.5	214.3 \pm 18.9	223.7 \pm 26.3
Colesterolo LDL, mg/dl	153.9 \pm 19.1	147.7 \pm 17.9	152.9 \pm 24.3
Colesterolo HDL, mg/dl	48.9 \pm 10.3	42.5 \pm 8.9	47.1 \pm 9.8
Trigliceridi, mg/dl	97 (74 – 145)	85 (57 – 101)	101 (76 – 131)
Glicemia, mg/dl	96.4 \pm 10.0	94.5 \pm 12.0	95.7 \pm 7.5
Creatinina, mg/dl	0.8 \pm 0.2	0.9 \pm 0.2	0.8 \pm 0.2
Proteina C-reattiva, mg/dl	0.12 (0.03 – 0.22)	0.21 (0.04 – 0.34)	0.14 (0.04 – 0.34)

Tabella 2

Riassunto delle misurazioni della flow-mediated dilation (FMD) nei soggetti in studio al reclutamento (T0), dopo 4 settimane (T1) e dopo 8 settimane (T2). I dati sono espressi come media \pm DS. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, test ANOVA ad una via per il confronto tra gruppi.

Visita	FMD (%)		
	Ubichinolo 200 mg/die (N=17)	Ubichinolo 100 mg/die (N=15)	Placebo (N=16)
Reclutamento (T0)	3.48 \pm 1.12	3.80 \pm 0.95	4.06 \pm 1.13
4 settimane (T1)	4.34 \pm 1.81	4.63 \pm 0.90	4.51 \pm 1.54
Variazione T1-T0	0.86 \pm 1.62	0.84 \pm 1.16	0.45 \pm 1.37
8 settimane (T2) **	4.75 \pm 1.68	5.14 \pm 1.12	3.65 \pm 1.06
Variazione T2-T0 ***	1.28 \pm 0.94	1.34 \pm 1.44	-0.41 \pm 1.51
Variazione T2-T1 *	0.41 \pm 1.48	0.51 \pm 0.96	-0,86 \pm 1.52

Tabella 3

Riassunto delle misurazioni dei livelli plasmatici di CoQ10 totale e del rapporto CoQ10 ossidato/CoQ10 totale nei soggetti in studio al reclutamento (T0), dopo 4 settimane (T1) e dopo 8 settimane (T2). I dati sono espressi come media \pm DS. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, test ANOVA ad una via per il confronto tra gruppi.

Visita	Ubichinolo 200 mg/die (N=17)	Ubichinolo 100 mg/die (N=15)	Placebo (N=16)
	<i>CoQ10 / Colesterolo totale ($\mu\text{mol/mol}$)</i>		
Reclutamento (T0)	109 \pm 29	145 \pm 80	131 \pm 29
4 settimane (T1) ***	712 \pm 263	450 \pm 310	121 \pm 32
Variazione T1-T0 ***	603 \pm 247	304 \pm 257	-10 \pm 28
8 settimane (T2) ***	723 \pm 263	462 \pm 246	121 \pm 50
Variazione T2-T0 ***	614 \pm 245	316 \pm 203	-10 \pm 37
Variazione T2-T1	11 \pm 151	12 \pm 181	1 \pm 36
	<i>CoQ10 ossidato / CoQ10 totale (%)</i>		
Reclutamento (T0)	12.57 \pm 5.91	11.66 \pm 4.66	11.64 \pm 4.79
4 settimane (T1) **	5.99 \pm 1.85	8.36 \pm 4.19	11.13 \pm 5.05
Variazione T1-T0 ***	-6.58 \pm 4.55	-3.31 \pm 3.81	-0.51 \pm 2.45
8 settimane (T2) **	7.23 \pm 6.81	7.64 \pm 2.42	14.11 \pm 8.16
Variazione T2-T0 ***	-5.35 \pm 4.42	-4.02 \pm 3.11	2.48 \pm 7.38
Variazione T2-T1	1.24 \pm 6.05	-0.72 \pm 2.83	2.98 \pm 7.34

Tabella 4

Riassunto delle misurazioni dei livelli plasmatici di ossido nitrico (NO) nei soggetti in studio al reclutamento (T0) e al termine del trattamento (8 settimane, T2). I dati sono espressi come media \pm DS. * $p < 0.05$, test ANOVA ad una via per il confronto tra gruppi.

Visita	NO (μM)		
	Ubichinolo 200 mg/die (N=17)	Ubichinolo 100 mg/die (N=15)	Placebo (N=16)
Reclutamento (T0)	63.41 \pm 16.63	63.70 \pm 16.01	64.75 \pm 15.26
8 settimane (T2)	72.75 \pm 19.98	69.54 \pm 14.83	59.88 \pm 15.57
Variazione T2-T0 *	9.34 \pm 16.13	5.85 \pm 11.86	-4.87 \pm 13.40

RINGRAZIAMENTI

Al termine del mio percorso di dottorato desidero ringraziare tutte quelle persone che hanno reso possibile con il loro contributo la realizzazione di questo lavoro di tesi.

Ringrazio innanzitutto la Prof.ssa Laura Mazzanti, per avermi simbolicamente, ma anche letteralmente, “adottato”, permettendomi di mettere a disposizione del suo gruppo il mio lavoro, aiutandomi ogni giorno a crescere professionalmente e non solo. A lei va anche un ringraziamento per essersi sempre prodigata, con un’apertura mentale esemplare, a far sì che potessi fare esperienze costruttive e utili alla mia crescita come dottore di ricerca. Un pensiero va anche alla Dott.ssa Arianna Vignini e a tutte le collaboratrici, per essere sempre state presenti, anche nel momento del bisogno, durante gli anni del dottorato.

Ringrazio il Prof. Luca Tiano e i suoi collaboratori, in particolare il Dott. Patrick Orlando, per i loro validissimi spunti scientifici, per il loro rigore metodologico e per avermi offerto una preziosa occasione per sperimentare a livello clinico le numerose potenzialità di una molecola fondamentale per biologia del nostro organismo quale è il Coenzima Q10.

Ringrazio il Dott. Roberto Antonicelli e tutto il personale della U.O. di Cardiologia dell’INRCA per avermi concesso la possibilità di condurre una interessantissima ricerca in ambito clinico e per l’ospitalità dimostrata per lo svolgimento della parte sperimentale più consistente di questa tesi. Ringrazio la Dott.ssa Roberta Galeazzi e il personale del laboratorio

analisi dell'INRCA per aver messo a disposizione di questo progetto, con immensa disponibilità, la loro competenza e la loro pazienza.

Ringrazio tutti i colleghi, dottorandi e non, con cui ho condiviso questo percorso, per gli scambi di opinioni, per i pranzi in compagnia, per avermi aiutato a non perdere la calma durante i momenti più duri e, soprattutto, per aver sopportato le mie innumerevoli fisime.

Per ultimo, ma non meno importante, il ringraziamento alla mia famiglia, per essere stata sempre presente con il proprio affetto e con un impareggiabile sostegno morale anche durante gli anni del dottorato.