



Università degli Studi di Cagliari

## **DOTTORATO DI RICERCA**

Scienze Cardiovascolari

Ciclo XXVII

**Coronary Blood Metabolomics Fingerprint Differentiates Healthy Subjects from  
Patients with Stenosing or Microvascular Ischemic Disease**

Settore scientifico disciplinare di afferenza

MED/11

Presentata da:

Dott. Giulio Binaghi

Coordinatore Dottorato:

Prof. Francesco Marrosu

Tutor:

Prof. Giuseppe Mercurio

Esame finale anno accademico 2014 – 2015

# Indice

## Introduzione

<i>Abstract</i>	3
<i>Introduzione</i>	4
<i>La cardiopatia ischemica cronica</i>	4
<i>L'aterosclerosi</i>	9
<i>Funzione endoteliale</i>	13
<i>Disfunzione endoteliale coronarica</i>	17
<i>La metabolomica</i>	18

## Materiali e Metodo

<i>Popolazione studiata</i>	22
<i>Prelievi coronarici</i>	23
<i>Analisi metabolomica</i>	23
<i>Analisi statistica</i>	24

## Risultati

<i>Coronarografia</i>	25
<i>Analisi metabolomica</i>	25

## Discussione

36

## Prospettive

39

## Limiti dello studio

40

## Bibliografia

41

## **Abstract**

**Background.** Endothelium is a key variable in the pathogenesis of atherosclerosis and its complications, particularly coronary artery disease (CAD). Current evidence suggests that endothelial status may be regarded as an integrated index of individual atherogenic and atheroprotective factors. Therefore, interplay between circulating factors and properties of the local endothelium may be critical for the development of atherosclerosis. Metabolomics (MBS) is the study of the metabolic profile of small molecules and provides a functional view of the studied organism.

**Objectives:** to verify whether MBS was capable to detect the presence of differences in coronary microenvironment associated to different manifestations of CAD

**Methods.** A <sup>1</sup>H-NMR based MBS analysis was performed on coronary blood samples of 23 patients with indication to coronary angiography; those with evidence of myocardial ischemia formed the case group, further divided into stenotic disease (SD group; N = 13) and absence of stenosis (microvascular disease-Micro Group; N = 5 ), while those with no evidence of ischemic heart disease (dilated cardiomyopathy, valvular diseases) constituted the control group (N=5).

**Results.** An OPLS-DA model was applied to the whole dataset. Samples are clearly separated into the three groups, indicating 3 different metabolic fingerprints. In comparison with Controls, Micro patients showed a higher content of 2-hydroxybutirate, alanine, leucine, isoleucine, N-acetygroups, and a lower content of creatine/phosphocreatine, creatinine and glucose, whereas SD patients were characterized by higher levels of 3-hydroxybutirate, acetate and a lower content of 2-hydroxybutirate. Finally, Micro patients compared to SD Group showed a higher content of 2-hydroxybutirate, alanine, leucine, N-acetygroups, and a lower content of 3-hydroxybutirate and acetate.

**Conclusions.** Our findings seem to suggest that specific coronary microenvironments are associated with different development and pathological expression of atherosclerotic disease, as resulted by the interact of pre-determined characteristics of endothelial cells (i.g. genetic, epigenetic) with cardiovascular risk factors.

## **Introduzione**

Le malattie cardiovascolari (MCV) sono oggi la prima causa di mortalità nei paesi industrializzati, mentre lo diventeranno, entro il 2020, anche nei paesi in via di sviluppo<sup>1</sup>. Tra le MCV, la coronaropatia (CAD) rappresenta la condizione più comune, la cui frequenza è destinata ad accelerare nel prossimo decennio in conseguenza dell'invecchiamento della popolazione e dell'aumento in tutto il mondo di obesità, diabete mellito di tipo 2 e sindrome metabolica. A questi eventi si assocerà un'aumentata incidenza dei fattori di rischio cardiovascolari (CV) tra le giovani generazioni<sup>2</sup>.

Nel 2011, le MCV hanno prodotto negli USA il 30,8% dei decessi, rappresentando, quindi, la causa di morte in circa 1 caso su 3. In particolare, la CAD è responsabile, in quel paese, di un evento coronarico ogni 34' e di una morte ogni sette.

La CAD comporta conseguenze sociali ed economiche deleterie, perché colpisce pazienti in età lavorativa, nella fase di maggiore produttività. Il costo totale, diretto e indiretto, delle MCV e degli ictus negli USA (2010) è stimato in 204,4 miliardi di dollari, comprensivi di spese sanitarie (dal costo del personale ai servizi ospedalieri, prescrizioni mediche e assistenza domiciliare) e perdita produttiva<sup>3</sup>.

In relazione al processo fisiopatologico, la CAD contempla 2 distinte evoluzioni: da un canto, il progresso costante e irreversibile dell'aterosclerosi, che conduce, nell'arco di decenni, ad un progressivo restringimento del lume vasale; dall'altro, un meccanismo dinamico, potenzialmente reversibile, che può improvvisamente precipitare in un'occlusione vasale parziale o totale (vasospasmo, trombosi, o entrambi). La componente aterosclerotica predomina nelle lesioni responsabili dell'angina stabile cronica; la trombosi coronarica rappresenta una causa primaria delle sindromi coronariche acute (SCA)<sup>4,5</sup>.

### ***La cardiopatia ischemica cronica***

Il principale evento clinico è l'angina stabile, caratterizzata da dolore toracico, generalmente di tipo costrittivo o gravativo, irradiato a mandibola, spalla, dorso ed arti superiori, tipicamente provocato da uno stress fisico e/o emotivo, attenuato dal riposo o dalla nitroglicerina. William Heberden per primo ha introdotto il termine di "angina pectoris" nel 1772<sup>6</sup> per definire una sindrome in cui era presente "*un senso di soffocamento e di ansietà*" toracico, in particolar modo associato all'esercizio, sebbene la sua eziopatogenesi non fosse conosciuta fino ad alcuni anni fa<sup>7</sup>.

La prevalenza di angina negli USA è stata del 4,6% nel 2010, colpendo il 58% dei pazienti affetti da CAD (dati AHA)<sup>8</sup>.

Il substrato anatomico-patologico della CAD cronica è rappresentato da una stenosi a livello dei vasi coronarici epicardici, quindi da una ingrossata placca aterosclerotica che progressivamente restringe il lume vasale, sino ad una percentuale emodinamicamente significativa. Il cuore è un organo aerobico che ricava l'energia necessaria per il suo lavoro quasi esclusivamente dall'ossidazione di substrati energetici e si rifornisce di questi e di O<sub>2</sub> grazie al flusso coronarico. L'ischemia miocardica si produce dalla discrepanza tra un adeguato apporto ematico e la richiesta di miocardica di O<sub>2</sub> (MVO<sub>2</sub>) e metaboliti.

Una misura diretta del MVO<sub>2</sub> richiede la determinazione del flusso coronarico e della differenza artero-venosa del contenuto di O<sub>2</sub>. Nella pratica clinica, il MVO<sub>2</sub> può essere stimato attraverso il doppio prodotto (frequenza cardiaca X pressione arteriosa sistolica). Esso è strettamente correlato all'area sottesa alla curva pressione-volume del ventricolo sinistro (lavoro meccanico esterno) e all'energia telesistolica delle pareti miocardiche<sup>9</sup>. L'esercizio fisico è lo stimolo fisiologico più importante per l'aumento della domanda di O<sub>2</sub> del miocardio.<sup>10</sup> Nella maggior parte delle presentazioni cliniche entrambi i meccanismi fisiopatologici, ridotto apporto e aumentata richiesta, concorrono nel creare la condizione di sofferenza ischemica del miocardio responsabile del sintomo "angina pectoris" e dell'ischemia silente.<sup>11</sup>

Tra i determinanti del consumo miocardico di O<sub>2</sub>, i maggiori sono la frequenza cardiaca, la contrattilità miocardica e la tensione parietale (Tabella 1).

**Tabella 1.** Determinanti del consumo miocardico di O<sub>2</sub> (MVO<sub>2</sub>).

Massa ventricolare sinistra
Frequenza cardiaca
Stato contrattile
Sviluppo di tensione
Attivazione
Depolarizzazione
Effetto metabolico diretto delle catecolamine

Da un punto di vista fisiopatologico, è possibile distinguere due tipi di ischemia miocardica: da apporto e da richiesta<sup>12</sup>. L'ischemia miocardica da apporto, anche denominata a *basso*

*flusso*, è secondaria a riduzione o assenza di flusso coronarico dovuta a stenosi fissa (placca stabile) e/o a stenosi dinamica.

La ridotta perfusione miocardica che si realizza nell'ischemia a basso flusso determina tanto un carente apporto di O<sub>2</sub> al miocardio, quanto una rimozione insufficiente dei metaboliti prodotti dalle cellule miocardiche. La disponibilità miocardica di O<sub>2</sub> è determinata dalla sua saturazione arteriosa, dall'estrazione miocardica di O<sub>2</sub> e dal flusso coronarico. In condizioni fisiologiche di riposo, sia la saturazione arteriosa di O<sub>2</sub>, che la sua estrazione da parte del muscolo cardiaco, sono relativamente stabili. In particolare, l'estrazione miocardica di O<sub>2</sub> è molto vicina ai valori massimali già a riposo, per cui un'augmentata richiesta di O<sub>2</sub> può essere soddisfatta quasi esclusivamente da un incremento del flusso coronarico. La presenza di una lesione stenotica fissa a livello delle coronarie epicardiche determina una riduzione dell'apporto ematico in relazione al grado di ostruzione. La presenza di una stenosi non è in grado di produrre ischemia grazie al naturale meccanismo di compenso rappresentato dalla capacità di dilatazione dei vasi del microcircolo coronarico<sup>13</sup>. Per garantire, infatti, una perfusione miocardica adeguata al carico di lavoro muscolare entrano in gioco diversi meccanismi di regolazione del flusso coronarico a livello del microcircolo, dove risiede circa il 70-80% delle resistenze coronariche totali a riposo ed agiscono i principali meccanismi di regolazione del flusso arterioso, in relazione alle variazioni del consumo di O<sub>2</sub> o della pressione di perfusione.

Il microcircolo coronarico è una sede attiva di controllo del flusso ematico attraverso numerosi fattori metabolici e miogeni. Le arteriole possono modificare la loro resistenza istantaneamente, in modo da mantenere costante la pressione pre-capillare (autoregolazione coronarica). La risposta miogena delle coronarie alle variazioni della pressione intracoronarica consente, infatti, di ottenere quei mutamenti che sono necessari a mantenere il flusso costante al variare delle situazioni, attraverso l'azione di fattori interni ed esterni alla vascolatura coronarica<sup>14</sup>.

Va sottolineato che, durante ischemia miocardica, le influenze metaboliche locali determinano vasodilatazione massimale dei vasi coronarici di resistenza. La vasodilatazione microvascolare è legata anche ad un aumento della forza trasversale del sangue circolante che si verifica durante stress e che è in grado di far liberare ossido nitrico (NO) dall'endotelio.

Le stenosi dinamiche possono essere la conseguenza di 3 diverse condizioni fisiopatologiche<sup>15</sup>: aumento del tono vascolare a livello di una placca coronarica eccentrica; vasospasmo per ipereattività delle cellule muscolari lisce coronariche; trombosi intravascolare. Nella maggior parte dei casi la riduzione acuta dell'apporto miocardico di O<sub>2</sub> è dovuta a rottura di una placca aterosclerotica con infiammazione, trombosi, vasocostrizione e micro-embolizzazione. Un apporto ridotto di O<sub>2</sub> può dipendere anche dalla presenza di spasmo arterioso coronarico (in presenza o meno di arterie coronariche angiograficamente

indenni), a causa di una condizione di ipereattività a stimoli costrittori di varia natura delle cellule muscolari lisce coronariche. In una percentuale variabile (dal 10 al 30%) di pazienti con coronarie epicardiche indenni, un ridotto apporto di O<sub>2</sub> può essere dovuto ad una discrepanza tra aumento della massa muscolare e rete vascolare microcircolatoria, come avviene, ad esempio, nell'ipertrofia ventricolare sinistra (ischemia miocardica da discrepanza).

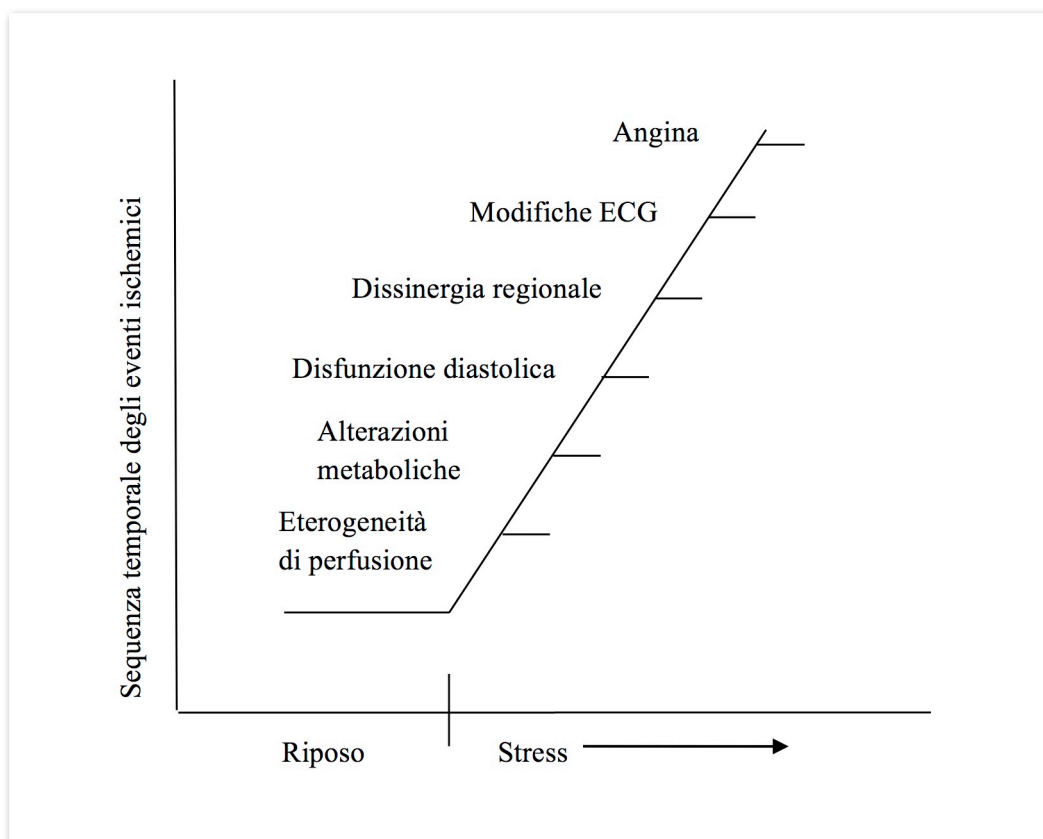
Il concetto di stenosi coronarica è assolutamente diverso dal concetto di malattia ischemica miocardica, come si evince da una serie di considerazioni cliniche e fisiopatologiche.

Diversi studi autoptici hanno mostrato la presenza di lesioni stenosanti dei vasi epicardici in soggetti deceduti per cause non cardiache. Inoltre, in molti casi è evidente la non coincidenza della stenosi coronarica con la malattia ischemica miocardica dovuta sia al fatto che lo studio angiografico delle coronarie esplora la componente "fissa" della stenosi (mentre molte lesioni possono andare incontro a modificazioni vasomotorie), sia alla presenza di vasospasmo indipendente dalla presenza di stenosi del vaso coronarico epicardico, ma anche all'esistenza di eventuali circoli collaterali. A tutto ciò si aggiunge la scarsa prevedibilità, in termini emodinamici, del ruolo fondamentale operato dal microcircolo coronarico.

La presenza di placche aterosclerotiche stenosanti a livello dei vasi coronarici epicardici determina una resistenza al flusso ematico, con la sua conseguente riduzione. I determinanti di questa riduzione sono principalmente riferibili alla geometria della placca: lunghezza, entità (stenosi fissa o dinamica), rigidità, presenza di trombi piastrinici sovrapposti. In particolare, questa resistenza al flusso della stenosi cambia al variare dell'area della sezione trasversa del lume in maniera esponenziale e della lunghezza della stenosi in modo lineare (formula di Poiseuille). La presenza di placche severe e complicate determina una rapida trasformazione del flusso da laminare a turbolento ed una caduta critica della pressione trans-stenotica. Poiché la riduzione della pressione attraverso la stenosi è proporzionale alla quarta potenza del raggio, anche piccole variazioni del diametro interno possono determinare cali importanti della pressione di perfusione a valle della lesione stenotica. L'aumento del flusso ematico attraverso una stenosi si traduce in aumento del gradiente pressorio trans-stenotico con ridotta pressione di perfusione a valle. Per ottenere, dunque, un flusso costante a valle della stenosi è necessaria una vasodilatazione dei vasi di resistenza post-stenotici che permetta un aumento del flusso proporzionato alle richieste metaboliche del miocardio. Qualunque sia la causa dello squilibrio tra apporto e richiesta miocardica, la carenza, anche transitoria, di O<sub>2</sub> e metaboliti è mal tollerata dal muscolo cardiaco e dà luogo alla cosiddetta cascata ischemica. In seguito all'ischemia locale nel miocardiocita si verificano una serie di anomalie metaboliche e biochimiche secondo una sequenza gerarchica e cronologica ben definita (Figura 1). Studi effettuati durante occlusione temporanea di rami coronarici, in corso di angioplastica coronarica, hanno dimostrato chiaramente che le alterazioni miocardiche

ischemiche seguono la suddetta progressione temporale: eterogeneità di perfusione e alterazione del metabolismo cardiaco, difetti della funzione meccanica e, solo più tardivamente, modifiche elettrocardiografiche; infine, dolore toracico<sup>16</sup>.

**Figura 1.** Cascata ischemica



La perfusione miocardica è caratterizzata da notevole eterogeneità spaziale e temporale, per cui il flusso miocardico coronarico può essere notevolmente differente tra le diverse aree di tessuto cardiaco o nello stesso tessuto miocardico, in momenti diversi. In particolare, vi è una fisiologica eterogenea distribuzione del flusso ematico coronarico transmurale endocardico/epicardico dovuta al modesto contributo della compressione esercitata dal ventricolo a livello del miocardio subepicardico rispetto allo strato subendocardico<sup>17</sup>. In caso di stenosi di un'arteria coronarica epicardica, si determina una ridistribuzione del flusso transmurale con riduzione del flusso subendocardico, che prelude alla comparsa di alterazioni



metaboliche prima, diastoliche poi e infine sistoliche, con riduzione dell'ispessimento regionale e vari stadi di asinergia segmentaria.

Alcuni "stressors" farmacologici, quali adenosina e dipiridamolo, attraverso il fenomeno del "furto coronarico" determinano anch'essi una deviazione del flusso ematico coronarico dal subendocardio al subepicardio. La dobutamina induce invece, a basse dosi, un effetto inotropo positivo mentre, ad alte dosi, aumentando il consumo miocardico di O<sub>2</sub>, può indurre ischemia. La comparsa di ischemia inducibile durante esercizio fisico o farmacologico ha importanti implicazioni diagnostiche, prognostiche e terapeutiche in pazienti con sospetta o nota patologia coronarica. La ragione di queste implicazioni è che l'ischemia inducibile riflette generalmente la diminuita disponibilità di flusso ematico al miocardio per un ridotto incremento dello stesso in risposta alla vasodilatazione coronarica, dovuta a una o più stenosi coronariche significative. L'analisi delle modificazioni elettrocardiografiche, delle alterazioni della cinesi segmentaria o dei difetti di perfusione miocardica sono metodi ben stabiliti per rilevare l'ischemia inducibile e valutare la riserva di flusso coronarico.

### ***L'aterosclerosi***

L'aterosclerosi è una malattia cronica fibroproliferativa ed immuno-infiammatoria multifocale che colpisce le arterie di grande e medio calibro, caratterizzata principalmente da un accumulo di lipidi<sup>18</sup>.

L'aterosclerosi è spesso definita come "indurimento delle arterie", componendo le parole derivate dal greco *athero* (ad indicare il materiale grasso e poltaceo) e *sclerosi* (durezza). È il processo per il quale un deposito di sostanze grasse, colesterolo, prodotti di scarto cellulare, calcio e altre sostanze, si accumula nel rivestimento interno di un'arteria. Questo accumulo è chiamato *placca*.

Il XX secolo è stato testimone di una notevole evoluzione dei concetti che riguardano la patogenesi dell'aterosclerosi. Questa malattia ha un'antica storia, essendosene trovate tracce già nelle arterie di mummie egiziane<sup>19</sup>. Fino a tempi relativamente recenti le arterie sono state per lo più considerate come condotti inerti, piuttosto che come struttura dinamica e metabolicamente attiva. Oltre 100 anni fa, Virchow, che considerava l'aterosclerosi una malattia proliferativa, aveva dimostrato il coinvolgimento di cellule nell'aterogenesi, in contrapposizione a Rokitansky, che considerava gli ateromi come il risultato della guarigione e del riassorbimento di trombi<sup>20</sup>.

Numerose e controverse sono le ipotesi formulate nel tentativo di identificare i meccanismi responsabili della comparsa e progressione della malattia aterosclerotica. Al momento, la teoria più accreditata rimane quella infiammatoria di Russell Ross<sup>21</sup>, "*the response to injury*", che ipotizza nell'infiammazione il meccanismo mediante il quale i fattori di rischio cardiovascolari evocano una risposta riparativa da parte della parete vascolare; reazione che

inizia con l'attivazione endoteliale, per poi progredire e stabilizzarsi con la formazione della placca aterosclerotica.

L'aterosclerosi coinvolge diversi processi strettamente interconnessi, includendo i disturbi del metabolismo lipidico, l'infiammazione, l'attivazione piastrinica, la trombosi, la disfunzione endoteliale, lo stress ossidativo, l'attivazione delle cellule muscolari lisce vascolari, l'alterato metabolismo della matrice, il rimodellamento e i fattori genetici<sup>22</sup>. I fattori di rischio giocano un ruolo importante nell'inizio e nell'accelerazione del processo dell'aterosclerosi.

Studi clinici e sperimentali hanno dimostrato che l'infiammazione riveste un ruolo centrale nell'aterosclerosi<sup>23</sup>. Essa, infatti, si sviluppa in maniera concomitante all'accumulo di LDL ossidate nella parete arteriosa.

Le cellule endoteliali sane resistono al prolungato contatto con i leucociti del circolo, inclusi i monociti. Le stesse cellule endoteliali, quando sottoposte ad una attivazione infiammatoria, esprimono numerose molecole di adesione che legano i leucociti<sup>24</sup>. Una volta adeso all'endotelio attivato, il monocita si fa largo, per diapedesi, tra le cellule endoteliali e penetra nella tonaca intima o nello strato più interno della parete arteriosa. Una volta residenti nell'intima, i monociti acquistano i caratteri di macrofagi tissutali. Nell'ateroma il macrofago esprime recettori scavenger che legano le particelle lipoproteiche modificate, per esempio dall'ossidazione o dalla glicosilazione. Questi processi danno luogo alla formazione delle cellule schiumose, caratteristiche delle lesioni arteriose, così chiamate per l'accumulo nel citoplasma di lipidi. La transmigrazione dei monociti e, più in generale, dei leucociti all'interno della parete arteriosa, è mediata dalle chemochine<sup>25</sup>.

Recenti evidenze dimostrano il ruolo chiave dei neutrofilii nei precoci momenti dell'aterogenesi. L'iperlipidemia incrementa il numero di neutrofilii circolanti, che sono reclutati all'interno delle lesioni aterosclerotiche attraverso specifici recettori delle chemochine<sup>26</sup>. L'attivazione dei macrofagi ad opera dei lipidi aterogenici<sup>27</sup>, un alterato bilancio lipidico intracellulare<sup>28</sup> e il DNA rilasciato dalle cellule apoptotiche possono innescare il rilascio di citochine e chemochine che attraggono i neutrofilii. Le LDL ossidate possono indurre la transmigrazione dei neutrofilii e il rilascio di specie reattive dell'O<sub>2</sub> e di proteine dei granuli, che innescano, direttamente e indirettamente attraverso l'up-regulation delle molecole di adesione sulle cellule endoteliali, il reclutamento dei monociti e la loro extravasazione. Inoltre, i neutrofilii apoptotici sostengono il reclutamento dei monociti attraverso vari segnali *“trovami e mangiami”*<sup>29</sup>.

L'importanza delle risposte immuni antigene-specifiche nell'aterogenesi è ampiamente riconosciuta<sup>30</sup>. La cellula dendritica può essere idealmente posizionata al crocevia tra immunità innata e adattativa<sup>31</sup>.

Mentre gli eventi precoci nella genesi dell'ateroma coinvolgono principalmente la disfunzione endoteliale, il reclutamento e l'accumulo di leucociti, l'evoluzione successiva dell'ateroma in lesioni più complesse, coinvolge le cellule muscolari lisce (SMC). Le SMC sono in possesso di una notevole plasticità fenotipica che permette loro un rapido adattamento agli stimoli ambientali, anche durante lo sviluppo e la progressione delle malattie vascolari come l'aterosclerosi<sup>32</sup>. Una volta attivate dal danno, dai fattori di crescita o dalle citochine, le SMC subiscono un cambiamento del fenotipo che porta a una cellula in grado di migrare all'interno della tonaca intima e di secernere varie sostanze<sup>33</sup>. Attraverso i fattori di crescita e la stimolazione da parte di citochine, le SMC proliferano e secernono proteine della matrice ed enzimi. Sebbene le lesioni aterosclerotiche complesse contengano anche macrofagi carichi di lipidi e linfociti, le SMC rappresentano la componente cellulare dominante nelle lesioni de novo e nelle restenosi intrastent. Trials clinici randomizzati e sperimentali hanno mostrato che gli inibitori dell'infiammazione e della proliferazione di SMC, così come sirolimus e paclitaxel, possono significativamente ritardare/annullare la restenosi intrastent quando rilasciati nella sede dell'intervento<sup>34,35</sup>.

Le lesioni aterosclerotiche sono composte da elementi cellulari e matrice extracellulare. La matrice costituisce più del 50% del volume della lesione. Le SMC sono largamente responsabili della produzione delle proteine della matrice, per la gran parte costituite da collagene interstiziali e proteoglicani<sup>36</sup>. Il collagene fornisce il supporto strutturale e il ponteggio alla parete del vaso. Nell'aterosclerosi, sia la produzione che la degradazione del collagene sono incrementate<sup>37</sup>. Mentre le SMC producono collagene, le SMC attivate e i macrofagi secernono metalloproteinasi (MMP) che degradano collagene ed elastina<sup>38</sup>. Nell'aterosclerosi, il bilancio netto del metabolismo del collagene favorisce la deposizione: ne risulta una significativa fibrosi. Meno comunemente, le placche hanno meno collagene ed elastina con una sottile e indebolita parete arteriosa che dà esito a una formazione aneurismatica.

Durante lo sviluppo dell'aterosclerosi, l'intero vaso può incrementare o ridurre le sue dimensioni. Questo processo è denominato rimodellamento geometrico ed è un processo critico nel determinare la pervietà del lume. Glagov et al<sup>39</sup> hanno descritto il rimodellamento come uno spostamento verso l'esterno della parete arteriosa che compensa l'ingrandimento dell'ateroma. Una volta che la placca occupa più del 40% dell'area del vaso, l'arteria non va più incontro a un rimodellamento positivo e il lume si riduce di calibro via via che la placca si accresce. In aggiunta a questo, il vaso subisce un rimodellamento negativo, che contribuisce a ridurre il lume. Questo è comune nella restenosi e rappresenta la maggior parte delle riduzioni del lume tardive dopo una Plain Old Balloon Angioplasty (POBA)<sup>40</sup>. Queste lesioni sono solitamente associate a una maggior deposizione di collagene rispetto a quelle di vasi

dilatati; i meccanismi alla base del rimodellamento vascolare rimangono ancora ampiamente sconosciuti. Le evidenze attuali supportano l'importanza di fattori emodinamici così come di anomalie nel metabolismo della matrice<sup>41</sup>.

L'accumulo di cellule apoptotiche, detriti e cristalli di colesterolo formano il core necrotico. Il processo di infiammazione può così condurre alla degradazione della placca e, conseguentemente, alla trombosi.

La placca vulnerabile è caratterizzata da un ampio core lipidico, un sottile cappuccio fibroso e cellule infiammatorie nella porzione più sottile della superficie del cappuccio<sup>42</sup>. Numerosi studi hanno evidenziato come le metalloproteinasi ed altre sostanze espresse dai macrofagi siano responsabili della degradazione del cappuccio, conducendo ad una placca instabile suscettibile di rottura<sup>43</sup>. La trombosi coronarica spesso si verifica nei siti di rottura o di erosione di placca<sup>44</sup>.

*L'eterogeneità spaziale* delle placche aterosclerotiche risulta di difficile spiegazione in termini meccanicistici. Uguali concentrazioni di fattori di rischio presenti nel sangue, come le lipoproteine, sono a contatto con l'endotelio di tutto l'apparato vascolare. Tuttavia, come rivelato da studi morfologici sull'accumulo di lipidi e sull'espressione di molecole di adesione, l'ateroma si forma tipicamente in modo focale. La localizzazione dei siti delle lesioni aterosclerotiche, in modo preferenziale a livello della regione prossimale delle arterie dopo i punti di diramazione o biforcazione, dove il flusso si divide, suggerisce una base idrodinamica nello sviluppo della lesione precoce. È noto da anni che l'aterosclerosi si sviluppa e progredisce preferenzialmente in zone a basso *shear stress endoteliale* (ESS), situato nelle superfici interne del curve vascolari, nelle biforcazioni e a valle delle ostruzione focale, ma solo recentemente sono stati sviluppati metodologie che permettono il calcolo in vivo dell'ESS locale: essa è strettamente correlata ad una fedele ricostruzione in immagine 3D della geometria del lume dell'arteria e da un'accurata misurazione del flusso intracoronarico<sup>45</sup>.

La cellula endoteliale avverte lo *shear stress* laminare del flusso normale e le alterazioni del flusso nei siti preferenziali. Studi in vitro suggeriscono che lo shear stress laminare può aumentare l'espressione di geni che possono proteggere contro l'aterosclerosi. Tuttavia, rimangono numerosi punti da chiarire (ruolo degli enzimi che degradano la matrice e dei loro inibitori nell'aterosclerosi e nel rimodellamento geometrico delle lesioni) e sono necessarie ulteriori ricerche per la comprensione delle differenze regionali nella formazione di placca e nelle diverse manifestazioni cliniche. A tale fine, dati interessanti e, nel lungo periodo, possibilmente definitivi potrebbero giungere dallo studio della variabilità genetica interindividuale e tra le varie popolazioni (genomica e proteomica), nonché della loro espressione modulata dall'interazione con l'ambiente (metabolomica).

### ***Funzione endoteliale***

Inizialmente considerato come una barriera inerte tra sangue e parete del vaso, l'endotelio vascolare è ora riconosciuto come un importante centro di controllo dell'omeostasi vascolare. Le attuali evidenze suggeriscono che lo stato dell'endotelio non è determinato solamente dal carico di fattori di rischio individuali, ma, piuttosto, scaturisce dall'integrazione di tutti i fattori aterogenici e ateroprotettivi presenti in un individuo, includendo la predisposizione genetica e variabili note, ma anche ancora non conosciute. Recenti intuizioni sui meccanismi di base coinvolti nell'aterogenesi indicano che alterazioni della fisiologia endoteliale, indicate come disfunzione endoteliale, rappresentano un primer fondamentale nello sviluppo di aterosclerosi e sono corresponsabili anche della progressione della placca e dell'insorgenza di malattia aterosclerotica conclamata<sup>46,47</sup>. Pertanto, la comprensione del ruolo centrale dell'endotelio permette di chiarire la fisiopatologia della lesione, di avere una possibile occasione clinica per individuare la malattia in fase precoce, stratificare il rischio cardiovascolare e valutare la risposta ai trattamenti.

La disfunzione endoteliale è un disordine sistemico che riflette un fenotipo vascolare incline all'aterogenesi e, pertanto, può essere utilizzato come marker di rischio aterosclerotico. In accordo con questa ipotesi, la disfunzione endoteliale è un predittore indipendente di eventi CV, fornendo preziose informazioni prognostiche addizionali rispetto a quelle derivate dalla valutazione dei convenzionali fattori di rischio. Durante le ultime due decadi è divenuto evidente che l'endotelio vascolare è un attivo organo paracrino, endocrino e autocrino, indispensabile per la regolazione del tono vascolare e il mantenimento dell'omeostasi vascolare.

**Tabella 2.** Effetti dell'NO

---

Vasodilatazione

Azioni ossidanti

Azioni antinfiammatorie

Inibizione di adesione e migrazione dei leucociti

Inibizione della proliferazione e migrazione delle cellule muscolari lisce

Inibizione dell'adesione e dell'aggregazione piastrinica

Effetti anticoagulanti

Effetti profibrinolitici

---

La regolazione endoteliale di questi processi deriva principalmente dalla produzione di mediatori autocrini e paracrini, includendo l'NO, le prostaglandine, i fattori di iperpolarizzazione dell'endotelio, l'endotelina e l'angiotensina II. Queste sostanze provvedono a fornire un bilancio tra vasodilatazione e vasocostrizione, trombosi e anticoagulazione, nonché a modulare l'infiammazione. Tra i mediatori, il meglio caratterizzato è l'NO<sup>48</sup> (Tabella 2). Prodotto costitutivamente dall'NO sintetasi endoteliale (eNOS) o dall'NOS III, l'NO è il più potente vasodilatatore<sup>49</sup>. L'importanza centrale di questa molecola può essere dimostrata dall'ampia varietà di stimoli che ne modificano la produzione o la degradazione<sup>50</sup>. Potenti vasocostrittori, come l'angiotensina II e l'endotelina antagonizzano le azioni dell'NO, fornendo ulteriori meccanismi di bilancio e di controllo alla modulazione endoteliale della funzione vascolare<sup>51</sup>. La produzione costitutiva di NO da NOS III contribuisce in maniera importante a molte funzioni endoteliali e tra le sue molteplici proprietà, quelle vasodilatatorie sono le più suscettibili di indagine<sup>52</sup>. In soggetti sani, l'attivazione dell'eNOS causa vasodilatazione dei condotti vascolari muscolari e riduzione delle resistenze arteriolari. Per contro, nei soggetti con aterosclerosi, la stessa stimolazione produce vasocostrizione paradossa nelle arterie coronarie, indicando una ridotta disponibilità di NO<sup>53,54</sup>.

È interessante notare come sia possibile dimostrare la presenza di disfunzione endoteliale in pazienti con fattori di rischio per aterosclerosi in assenza di aterosclerosi stessa<sup>55,56</sup>. Queste osservazioni portano a credere che la disfunzione endoteliale sia parte integrante nello sviluppo e progressione della malattia. Una ridotta biodisponibilità di NO e un incremento della produzione di sostanze vasocostrittrici potrebbe creare un substrato favorevole per la trombosi e lo sviluppo di aterosclerosi<sup>57</sup>.

Un altro aspetto della disfunzione endoteliale è l'incremento dell'infiammazione<sup>58</sup>. Le cellule endoteliali partecipano al reclutamento, adesione e diapedesi dei leucociti all'interno della parete vascolare attraverso la produzione di chemochine, citochine e di fattori di trascrizione intracellulare<sup>59,60</sup>. Questi processi, risultano cruciali per la formazione delle lesioni aterosclerotiche nascenti<sup>61</sup>. L'NO antagonizza ognuno di questi processi<sup>62,63</sup>. Pertanto, la sua riduzione determina la progressione della lesione attraverso un'incrementata proliferazione e migrazione delle cellule muscolari lisce, un'augmentata attivazione piastrinica con possibilità di trombosi ed una possibile stimolazione di neoangiogenesi intravascolare e di alterazioni dei lipidi in senso aterogeno<sup>64,65</sup>. La disfunzione endoteliale può ridurre la perfusione vascolare, produrre fattori che riducono la stabilità di placca e aumentare la risposta trombotica alla rottura di placca<sup>66,67,68</sup>. La presenza di disfunzione endoteliale predice la presenza di malattia

aterosclerotica significativa<sup>69</sup> e fornisce informazioni prognostiche circa la probabilità di eventi in pazienti con malattia coronarica<sup>70</sup>.

Un metodo invasivo di valutazione della funzione endoteliale coronarica è la rilevazione del flusso Doppler coronarico misurato in corso di angiografia coronarica, ma solo se associata ad infusione intracoronarica di vasodilatatori, come l'acetilcolina, può essere considerata il gold standard per tale valutazione<sup>71</sup>. Durante le ultime due decadi sono state proposte tecniche meno invasive o non invasive per lo studio della funzione endoteliale, tra le quali la strain gauge pletismografica dell'avambraccio in concomitanza con l'infusione intrarteriosa di vasodilatatori endotelio-dipendenti, come la metacolina o l'acetilcolina, e l'ultrasonografia vascolare esterna ad alta risoluzione che misura la dilatazione flusso-mediata endotelio-dipendente (FMD) dell'arteria brachiale durante la fase di iperemia reattiva. Queste tecniche si basano sull'assunto che la disfunzione endoteliale non sia confinata alle arterie coronariche, ma, piuttosto, rappresenti un disordine sistemico che colpisce anche il letto vascolare periferico<sup>72</sup>. Due studi hanno dimostrato una correlazione tra FMD dell'arteria brachiale e la dilatazione coronarica epicardica in risposta, rispettivamente, all'infusione intracoronarica di acetilcolina o ATP, evidenziando la natura sistemica della disfunzione endoteliale<sup>73,74</sup>. Tuttavia, nonostante il suo impiego diffuso come strumento di ricerca e il recente sviluppo di linee guida per standardizzare il suo uso, i protocolli per la valutazione della FMD dell'arteria brachiale sono ancora diversi tra i vari laboratori e, in parte, operatore-dipendente<sup>75,76</sup>.

Sebbene l'associazione tra i fattori di rischio CV e la patologia aterosclerotica sia ben documentata, i meccanismi attraverso i quali questi fattori inducono la formazione della lesione e conducono agli eventi non è interamente definita. L'osservazione che una parte degli individui non sviluppa manifestazioni aterosclerotiche nonostante la presenza di numerosi fattori di rischio CV suggerisce l'esistenza di una "soglia" che, solo quando superata, determina lo switch da fattore di rischio ad effetto fisiopatologico sfavorevole. Data la sua strategica locazione e le proprietà biologiche, lo strato cellulare endoteliale, che rappresenta una barriera meccanica e biologica tra sangue e parete vascolare, probabilmente funge da "anello mancante" tra alcuni noti fattori di rischio e la loro estrinsecazione vascolare.

La maggior parte, se non tutti, i fattori di rischio correlati all'aterosclerosi e alla mortalità/morbilità CV conducono con il tempo allo sviluppo di disfunzione endoteliale<sup>77</sup>. La maggior parte di questi fattori di rischio, inclusa l'iperlipidemia, l'ipertensione, il diabete e il fumo sono associati ad una iperproduzione di ROS con incrementato stress ossidativo<sup>78</sup>. L'eccessiva produzione di ROS rappresenta un importante processo patologico nell'aterosclerosi ed è incrementata da ciascuno dei costituenti della lesione aterogena<sup>79</sup>. Importanti fonti di ROS sono le cellule muscolari lisce vasali, le cellule endoteliali, i

fibroblasti e i leucociti infiltranti<sup>80</sup>. La produzione di ROS colpisce i geni di trascrizione, determina danni a livello del DNA e incrementa la produzione di fattori di trascrizione pro-infiammatori<sup>81</sup>. Reagendo con l'NO, i ROS possono ridurre la disponibilità vascolare e promuovere il danno cellulare<sup>82</sup>.

L'incrementato stress ossidativo è considerato, dunque, un importante meccanismo coinvolto nella patogenesi della disfunzione endoteliale e può essere considerato la via comune attraverso la quale i fattori di rischio esplicano la propria azione patogena sull'endotelio<sup>83,84</sup>.

Lo stress ossidativo si manifesta quando le sostanze cellulari pro-ossidanti superano le difese anti-ossidanti. A livello intracellulare, il glutathione riveste un ruolo centrale come anti-ossidante e contribuisce ad eliminare i perossidi e gli altri ossidanti, mantenendo in equilibrio lo stato redox di numerose biomolecole. A livello extracellulare, il ruolo maggiore è svolto dalla cisteina e dalla sua forma disolfata, tant'è che, nella sua forma ossidata, può essere utilizzata per la valutazione dello stress ossidativo. Quindi, più bassi livelli di glutathione riflettono un relativo deficit di substrato antiossidante e più alti livelli di cisteina un'iperproduzione relativa di composti ossidanti, entrambe manifestazioni di stress ossidativo. Precedenti studi hanno mostrato che anormali livelli di amminotioili plasmatici come glutathione e cisteina sono associati con alterata funzione endoteliale<sup>85,86,87</sup>. Un recente studio<sup>88</sup> ha dimostrato che, in pazienti con CAD, l'incrementato stress ossidativo sistemico (minori livelli plasmatici di glutathione e un più alto rapporto cisteina/glutathione) è associato a disfunzione microvascolare coronarica e ad un maggiore contenuto di core necrotico di placca, in maniera indipendente dal carico di placca, dai tradizionali fattori di rischio CV e dall'infiammazione (valutata in termini di PCR ad elevata sensibilità). La presenza di noti fattori di rischio CV, comunque, non è l'unico determinante della disfunzione endoteliale, come dimostrato dall'osservazione che pazienti con normale funzione endoteliale e pazienti con vari stadi di disfunzione endoteliale non necessariamente differiscono nel loro profilo di fattori di rischio<sup>89,90</sup>.

In sintesi, esiste una suscettibilità endoteliale ai vari fattori di rischio CV variabile nel singolo paziente. Ciò sottolinea l'importanza, al di là dei fattori locali (forze emodinamiche e shear stress), di altri fattori, tuttora sconosciuti, inclusa la predisposizione genetica, necessari per la promozione della disfunzione endoteliale<sup>91</sup>. C'è una crescente evidenza che l'endotelio vascolare, che è direttamente esposto a diverse forze meccaniche generate dalla pulsatilità del sangue, tramuti i diversi stimoli biomeccanici che modulano la funzione endoteliale in segnali di regolazione di fattori trascrizionali direttamente correlati con l'espressione genica<sup>92</sup>.

Lo stato della funzione endoteliale rappresenta un indice integrato del rapporto tra carico di fattori di rischio e somma di tutti i fattori vasculo-protettivi in ciascun individuo<sup>93</sup>. La presenza di disfunzione endoteliale può essere considerata come una sindrome clinica che è *per se* associata a una predetta e incrementata probabilità di eventi CV avversi<sup>94,95</sup>.



### ***Disfunzione endoteliale coronarica***

La disfunzione endoteliale coronarica, caratterizzata da alterata disponibilità di NO, può essere associata ad ischemia miocardica<sup>96</sup>. Diversi studi inoltre indicano un'associazione tra presenza di disfunzione endoteliale microvascolare coronarica e angina pectoris in pazienti con coronarie angiograficamente normali<sup>97,98,99</sup>. Zeiher et al.<sup>100</sup> hanno dimostrato, in pazienti senza CAD emodinamicamente significativa, un legame tra inadeguata vasodilatazione coronarica endotelio-dipendente e difetti di perfusione miocardica indotti dall'esercizio. Ancora, l'ischemia miocardica può risultare da una disfunzione endoteliale sia delle arterie epicardiche che del microcircolo coronarico. Sono numerosi gli studi<sup>101,102,103</sup> che indicano una chiara associazione tra presenza di alterazione endoteliale sistemica e coronarica ed incrementato rischio di eventi CV futuri, a sottolineare ulteriormente la natura sistemica della disfunzione endoteliale e il suo impatto su morbilità e mortalità CV futura.

Come è stato anticipato, uno dei principali mediatori vasoattivi endotelio-derivati è l'NO, implicato in un'ampia varietà di meccanismi regolatori del sistema CV. Oltre a indurre vasodilatazione, esso inibisce l'adesione e l'aggregazione piastrinica, contribuendo alle proprietà antitrombotiche della parete vascolare intatta<sup>104</sup>. L'NO inibisce l'adesione dei monociti e dei leucociti all'endotelio<sup>105</sup> e la proliferazione delle cellule muscolari lisce<sup>106,107</sup>, riduce la produzione vascolare di radicali superossido<sup>108</sup> e agisce come inibitore dell'ossidazione delle LDL<sup>109</sup>.

Numerosi markers di laboratorio sono stati identificati e utilizzati come indicatori di disfunzione endoteliale, quali: E-selectina, ICAM-1, VCAM-1, interleuchina-1, fattore di necrosi tumorale- $\alpha$ , interferone- $\gamma$ , monociti chemoattractant proteina-1, fattore di von Willebrand, attivatore tissutale del plasminogeno, inibitore dell'attivatore del plasminogeno-1. Essi permettono una visione in più aspetti della fisiologia endoteliale e rappresentano un complemento nella valutazione della funzione endoteliale. Tuttavia, solo alcuni possono avere un potenziale uso clinico, a causa della loro aspecificità.

Recentemente la dimetilarginina asimmetrica (ADMA) è emersa come un mediatore e marcatore potenzialmente promettente per la disfunzione endoteliale. L'ADMA è endogena, sintetizzata mediante la metilazione di residui di arginina, e inibisce competitivamente eNOS, con conseguente diminuzione della produzione di NO<sup>110</sup>.

### ***La Metabolomica***

Un miglioramento nella comprensione della fisiopatologia dell'aterosclerosi e delle sindromi coronariche acute è necessario per migliorarne la prevenzione ed il trattamento.

Esiste un notevole incremento delle evidenze presenti in letteratura riguardo all'analisi metabolomica, intesa come strumento in grado di migliorare la conoscenza dei meccanismi fisiopatologici alla base di numerose malattie e di permettere l'individuazione di nuovi strumenti diagnostici, come biomarkers, o di innovative strategie terapeutiche. Sebbene tali procedimenti vengano utilizzati con buoni risultati in numerosi campi della patologia umana (cancerogenesi e diagnosi precoce, diabete mellito, neurologia), l'applicazione di queste metodiche nell'ambito cardiologico è ancora agli inizi.

La metabolomica è una disciplina basata sull'uso di metodi matematici e statistici per la soluzione di problemi multivariati relativi a dati riguardanti l'espressione di tutti i metaboliti dei sistemi vitali. I dati sono prodotti mediante tecniche di indagine chimico-fisiche come la spettroscopia a risonanza magnetica, la cromatografia e la spettrometria di massa applicate a campioni di biofluidi o di tessuti solidi opportunamente selezionati. Il termine "metaboloma" è stato coniato per primo da Oliver e collaboratori<sup>111</sup> e Tweeddale e colleghi<sup>112</sup>, mentre Nicholson e collaboratori avevano introdotto il concetto di "metabonomica" nello stesso periodo<sup>113</sup>. Il metaboloma rappresenta l'insieme di tutti i metaboliti, prodotti finali dei processi cellulari, presenti in una cellula, tessuto, organo o organismo.

La metabolomica è lo studio sistematico del profilo biochimico di tali metaboliti. In tutti i casi in cui si considerino sistemi biologici, le variabili sono numerose e sovente anche correlate tra loro. In questo caso l'utilizzo dei metodi chemiometrici può aiutare a fornire una visione globale – olistica - del problema, evidenziando le relazioni tra le variabili e la loro importanza relativa, e può inoltre mettere in evidenza differenze e similarità tra i campioni (nel nostro caso tra i soggetti affetti da una determinata patologia) in base alla loro distribuzione nello spazio multi-dimensionale descritto dall'insieme delle variabili metabolomiche. Considerare i singoli processi biologici come processi isolati esprime una visione riduzionistica delle funzioni vitali, un'astrazione che permette a volte di semplificare notevolmente il problema in studio, ma che porta inevitabilmente a modelli di limitato valore. I processi biologici sono rappresentabili attraverso reti che connettono organi e funzionalità dei sistemi viventi con meccanismi molto complicati. Mentre la genomica e la proteomica suggeriscono un possibile modo di funzionamento di un sistema biologico, la metabolomica ne dà una rappresentazione attuale e più prossima al reale.

I geni *per se* non predicono il fenotipo, che è il risultato dell'assetto genico, delle influenze ambientali e delle condizioni fisiopatologiche che possono sovrapporsi nel corso del ciclo vitale di un organismo; pertanto, la genomica, la trascrittomica e la proteomica si limitano ad indicare le cause potenziali di una risposta fenotipica, ma non sono in grado di prevedere cosa

accadrà al livello successivo. Per questi motivi, dobbiamo considerare la metabolomica (o metabonomica) come la più giovane, ma anche la più promettente tra le discipline “-omiche”.

Le tecnologie “-omiche” sono un gruppo di metodologie analitiche applicate allo studio di geni, dei trascritti, delle proteine e dei metaboliti che nell’insieme costituiscono una cellula, un tessuto o un organismo. L’RNA messaggero, espressione del gene e le analisi proteomiche non ci dicono tutta la storia di quello che potrebbe accadere in una cellula. Il profilo metabolico, a sua volta, può essere visto come il prodotto finale dell’espressione genica e dell’attività proteica, definendo così il fenotipo biochimico di un sistema biologico nel suo insieme. In un’ipotetica “piramide della vita” tutte le informazioni di base dei sistemi viventi sono contenute nel codice genetico e lo studio dell’espressione genica permette di rilevare le alterazioni del codice da mettere in relazione con le patologie. Nel livello superiore lo studio della proteomica aggiunge un importante tassello nella caratterizzazione degli effetti delle alterazioni del codice genetico sulle funzioni dei singoli sistemi biologici isolati. Al vertice di questa piramide troviamo l’espressione dei metaboliti che rappresenta una sorta di indicatore sul modo di evolvere del processo biologico in studio. Mentre l’espressione genica è un processo di natura interna dei sistemi in studio, le espressioni proteomiche e metaboliche riguardano anche fattori esterni considerati oggi con molta attenzione in medicina, quali l’alimentazione e l’influenza di fattori ambientali. Inoltre, le espressioni metaboliche e proteomiche dipendono anche dalle interazioni tra vari processi biologici, permettendo di studiare i processi di adattamento e le reazioni che i sistemi biologici mettono in atto in presenza di patologie.

In sintesi, la metabolomica riflette lo stato di equilibrio funzionale degli eventi biologici in un determinato sistema, come risultato di:

- assetto genico
- espressione genica tramite produzione di RNA
- attività delle proteine
- interazione con fattori ambientali (es. alimentazione, farmaci, trattamenti etc)

Tutti i processi biologici (sia “naturali” che indotti da ischemia, farmaci, ormoni) avvengono attraverso una sequenza di reazioni/interazioni biochimiche che generano un vasto e complesso insieme di metaboliti, molti dei quali, rilasciati nel sangue e nell’urina, saranno rilevabili con metodiche specifiche.

Le tecniche utilizzate in metabolomica possono riconoscere molecole di peso molecolare relativamente basso (<1000 Da), tra cui nucleotidi, oligopeptidi, aminoacidi, acidi grassi, lipidi, carboidrati, vitamine, acidi organici. Le analisi si effettuano sia su biofluidi (plasma, urine, liquido cerebrospinale, saliva, etc), che su tessuti solidi (cuore, fegato, rene, cervello, etc)<sup>113</sup>.

L'approccio metabolomico consiste in due fasi sequenziali:

✚ **Metodiche di analisi.** Forniscono un profilo completo dei metaboliti a basso peso molecolare presenti in un campione, generando uno spettro che è caratteristico di ciascuna metodica impiegata. Non esiste un'unica tecnica in grado di fornire tutte le informazioni sul metabolismo. Le principali, possibilmente utilizzate in serie, sono la spettrometria di massa (MS) e la spettroscopia di risonanza magnetica nucleare (NMR)<sup>114-117</sup>.

La spettrometria di massa, generalmente combinata con la separazione cromatografica, permette l'individuazione delle molecole di un campione biologico in base al rapporto massa/carica e la loro rappresentazione in uno spettro. La tecnica di gas massa (MS-GC) è altamente specifica e sensibile. Generalmente, essa è combinata con tecniche di separazione come la gas-cromatografia (GC) o la cromatografia liquida (LC).

La NMR protonica (<sup>1</sup>H-NMR) permette la caratterizzazione, all'interno di un campione biologico, dei protoni contenuti nei vari metaboliti e la loro rappresentazione in uno spettro. Uno dei principali vantaggi della tecnica di spettroscopia <sup>1</sup>H-NMR è di essere altamente riproducibile, non selettiva, rapida e non distruttiva. D'altro canto, questa tecnica è caratterizzata da una sensibilità piuttosto bassa, dalle potenziali difficoltà nel quantificare i metaboliti co-risonanti e dagli alti costi delle apparecchiature necessarie.

✚ **Processazione ed interpretazione dei dati.** L'analisi dei campioni biologici con tecnologie "-omiche" produce generalmente una serie di dati estremamente complessi, in base a un procedimento basato su:

- acquisizione e analisi del segnale;
- normalizzazione dei dati;
- analisi statistiche;
- costruzione di un modello predittivo.

Al momento, in metabolomica le analisi vengono effettuate con due principali approcci:

- **non mirato** (indice metabolico). Ricerca di biomarkers all'interno di una serie di dati, acquisiti senza una conoscenza a priori dell'esistenza di metaboliti biologicamente interessanti;
- **mirato**. Identificazione e quantificazione di una serie di metaboliti, che viene scelta tramite il confronto dello spettro del campione biologico di interesse con uno spettro di riferimento (ottenuto con l'utilizzo di metaboliti puri).

Per creare un sistema di dati valido e sperimentalmente robusto e per convertire questi dati in conoscenze biologiche, la metabolomica deve poter contare su un team multidisciplinare di fisici, chimici, biologici e medici.

Alcuni precedenti studi hanno valutato la capacità della metabolomica di predire la presenza e, in alcuni casi, la gravità della malattia aterosclerotica coronarica, ottenendo risultati contrastanti. Lo studio di Brindle e collaboratori<sup>118</sup> aveva lo scopo di verificare se l'analisi metabolomica effettuata su spettri di siero umano, ottenuto eseguendo dei prelievi di sangue venoso periferico, potesse correttamente diagnosticare non solo la presenza, ma anche la gravità della malattia coronarica angiograficamente definita. In questo studio si dimostrava che l'analisi multivariata degli spettri <sup>1</sup>H-NMR di siero era capace di predire la coronaropatia grave (coronaropatia trivascolare) con un'accuratezza e specificità > 90%. Uno studio successivo di Kirschenlohr, Griffin e collaboratori<sup>119</sup> ha sostanzialmente smentito tali risultati, usando campioni di plasma. È stato criticamente dimostrato che i risultati ottenuti erano principalmente ascrivibili alle variazioni presenti nella regione spettrale dei lipidi, notevolmente influenzata da variabili come il genere e, soprattutto, il trattamento farmacologico con statine, a sua volta determinato dalla severità della malattia coronarica. Altri fattori confondenti sono risultati lo stato ormonale, l'età, la dieta, la sedentarietà e le dislipidemie. Sabatine et al<sup>120</sup> hanno effettuato uno studio su pazienti sottoposti a scintigrafia miocardica da sforzo (SPECT), eseguendo prelievi di sangue periferico prima, immediatamente dopo e a distanza di 4 h dall'esercizio fisico. I campioni di plasma venivano frazionati dalla cromatografia liquida e poi sottoposti ad analisi di spettrometria di massa. Alcuni metaboliti, in particolare 6 intermedi della via metabolica dell'acido citrico, correlavano con la presenza di ischemia miocardica. Inoltre i cambiamenti di questi 6 metaboliti, incluso l'acido citrico, differenziavano i casi dai controlli con un alto grado di accuratezza (p <0.0001). Uno score di rischio metabolico ischemico, creato assegnando 1 punto alla presenza di ognuno di questi metaboliti, ha dimostrato di correlare significativamente con la probabilità di ischemia.

Nel loro complesso, tali risultati suggeriscono che la metabolomica può essere utilizzata per identificare alterazioni metaboliche clinicamente rilevanti nei pazienti affetti da CAD, contribuendo ad un miglioramento della comprensione della fisiopatologia delle sue diverse forme e alla identificazione di nuovi possibili tools diagnostici e target terapeutici.

## Materiali e Metodo

### Popolazione studiata

Sono stati arruolati 23 pazienti con indicazione all'esecuzione di esame coronarografico; quelli con evidenza strumentale di ischemia miocardica hanno costituito il gruppo dei casi, ulteriormente suddiviso in malattia stenosante (Gruppo *CAD*; N=13) e malattia del microcircolo (Gruppo *Micro*; N=5); quelli senza evidenza di cardiopatia ischemica (cardiomiopatie dilatativo-ipocinetiche, valvulopatie) hanno costituito il gruppo dei controlli (N=5). Tutti i pazienti sono stati informati sulle modalità di esecuzione dello studio e hanno rilasciato il loro consenso in forma scritta. I criteri di inclusione ed esclusione sono indicati nella tabella 3. Il protocollo di studio era stato preventivamente approvato dal Comitato Etico Indipendente dell'AOU di Cagliari\*.

**Tabella 3.** Criteri di inclusione ed esclusione della popolazione studiata

Criteri di inclusione	Criteri di esclusione
<b>Casi</b>	
<ul style="list-style-type: none"><li>• età 18-80 aa</li><li>• test provocativo (Watt test o ecostress) positivo</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>○ recente PTCA (1 mese per BMS, 1 anno per DES)</li><li>○ patologie metaboliche e/o cachetizzanti</li><li>○ malattie autoimmuni</li><li>○ epatopatie</li></ul>
<b>Controlli</b>	
<ul style="list-style-type: none"><li>• età 18-80 aa</li><li>• indicazione all'esecuzione di esame coronarografico</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>○ Cardiopatia ischemica (attuale o pregressa)</li><li>○ patologie metaboliche e/o cachetizzanti</li><li>○ malattie autoimmuni</li><li>○ epatopatie</li></ul>

Nella tabella 4 sono riassunte le caratteristiche cliniche dei pazienti arruolati nello studio. Tutti sono stati ricoverati e hanno effettuato un ECG a 12 derivazioni, prelievi ematici per valutazione di glicemia, funzionalità epatica e renale, assetto lipidico, VES e PCR, ecocardiografia mono e bidimensionale con color Doppler. I pazienti sono stati sottoposti a studio coronarografico, nel corso del quale è stato effettuato, prima di qualunque procedura sul vaso, un prelievo di sangue coronarico in provetta eparinata. Appena possibile, il campione è stato centrifugato a 4000 rpm per 15' ed aliquotato (800µl) in cuvette, conservate a -80°C fino al momento dell'analisi metabolomica.

**Tabella 4.** Dati antropometrici e caratteristiche cliniche della popolazione studiata

	<b>Gruppo CAD</b>	<b>Gruppo Micro</b>	<b>Controlli N=5</b>
	<b>N=13</b>	<b>N=5</b>	
Età (anni)	65,5 ± 8,08	65,8 ± 7,95	60,8 ± 9,00
Altezza (mt)	1,63 ± 0,07	1,54 ± 0,09	1,68 ± 0,1
Peso (Kg)	70 ± 8,9	62,4 ± 5,4	90,1 ± 29,9
BMI (Kg/m <sup>2</sup> )	26,4 ± 3,83	26,21 ± 2,96	31,2 ± 5,7
Creatinina sierica (mg/dl)	1,38 ± 0,92	0,93 ± 0,11	1,08 ± 0,3
<b>Fattori di rischio CV</b>			
Diabete	4	1	1
Ipertensione arteriosa	6	2	2
Ipercolesterolemia	3	3	1
Fumo	2	1	1
Familiarità	0	0	0
AOC AI	1	1	0
ATS carotidea	1	0	0
CAD nota	4	0	0

***Prelievi coronarici***

Tutti i pazienti sono stati sottoposti a studio angiografico coronarico con le modalità previste dalle attuali linee guida. L'eparina è stata somministrata in bolo e.v. alla dose iniziale di 100 U/kg di peso corporeo. Il mezzo di contrasto utilizzato è stato lo Iomeprolo.

***Analisi metabolomica***

I campioni ematici sono stati ottenuti, raccolti e conservati come prima descritto sino al momento dell'analisi.

Al momento dell'analisi <sup>1</sup>H-NMR, i campioni sono stati scongelati e centrifugati a 12000 rpm per 10 minuti a 4°C; il surnatante è stato processato mediante estrazione in cloroformio/metanolo (2.4 mL di cloroformio/metanolo 1:1 in 350 µl di H<sub>2</sub>O per 800 µl di plasma). Dopo centrifugazione a 4500 rpm per 30 minuti, sono state separate le componenti lipofila e idrofila; 1 mL di quest'ultima è stato essiccato usando un concentratore Eppendorf (Hamburg, Germany) e conservato a -80°C. Prima dell'analisi, i campioni sono

stati ridissolti in 700  $\mu\text{L}$  di  $\text{D}_2\text{O}$  (99,8%, Cambridge Isotope Laboratories Inc, Andover, USA) ed una aliquota di 630  $\mu\text{L}$  è stata trasferita in tubi O.D NMR da 5 mm; successivamente sono stati aggiunti 70  $\mu\text{L}$  di TSP (98 atom % D, Sigma-Aldrich, Milan) come soluzione standard.

L'analisi NMR è stata effettuata mediante spettrometro Varian UNITY INOVA 500 operante ad una frequenza di 499.839 MHz ed equipaggiato con un probe 5 mm a doppia risonanza (Agilent Technologies, CA, USA).

Gli spettri sono stati acquisiti a 300K con una ampiezza spettrale di 6000 Hz, un impulso a  $90^\circ$ , un tempo di acquisizione di 2 s, un relaxation delay di 2 s, e 256 scansioni. Una sequenza presaturazione è stata utilizzata per sopprimere il segnale residuo dell' $\text{H}_2\text{O}$ . Inoltre, sono stati acquisiti gli spettri NMR bidimensionali utilizzando la tecnica  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY; l'esperimento è stato eseguito con un'ampiezza spettrale di 6000 Hz in entrambe le dimensioni, 2048 punti di dati, e 512 incrementi, con 32 transienti per incremento. L'esperimento con tecnica COSY è stato effettuato utilizzando una Gradient Selected Coherence Transfer Pathway (gCOSY).

### ***Analisi statistica***

Gli spettri  $^1\text{H}$ -NMR sono stati importati in ACDlab Academic Edition (Advanced Chemistry Development, 12.01, 2010) e pre-processati con line broadening di 0,3 Hz, zero filling a 64K e trasformata di Fourier. Sono state quindi effettuate su ogni spettro la faseatura manuale e la correzione della linea di base. Il chemical shift è stato definito ponendo il picco di risonanza singolo del TSP a 0.00 ppm. Gli spettri sono stati quindi importati in MATLAB (R2013b; Mathworks, Inc., Natick, MA), e quindi allineati usando Interval Correlation Optimized Shifting (icoshift) per correggere gli eventuali piccoli disallineamenti di picco di alcuni metaboliti. La regione spettrale fra 4.74 e 4.94 ppm è stata esclusa dall'analisi per rimuovere il segnale residuo dell' $\text{H}_2\text{O}$ . Infine, il data-set degli spettri è stato normalizzato all'area totale, al fine di ridurre gli effetti della diversa concentrazione delle variabili tra i campioni, ed importato nel programma SIMCA-P + (versione 13.0, Umetrics, Svezia) per l'analisi statistica multivariata. Si è effettuato quindi lo scaling secondo Pareto ed il data-set è stato sottoposto ai test Hotelling's T2 e DModX per verificare la presenza di eventuali outliers. L'Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis (OPLS-DA) è stata utilizzata per costruire i modelli e identificare le variabili in grado di discriminare i vari gruppi. La qualità del modello è stata valutata sulla corrispondente Partial Least Squares Discriminant Analysis (PLS-DA) con una 7-fold cross-validation e con un permutation test (400 ripetizioni). L'overfitting e la capacità predittiva dei modelli sono stati valutati mediante i valori di  $R^2$  e  $Q^2$ . Il T-test parametrico (con valori di p corretti con il metodo Bonferroni) è stato applicato sulla concentrazione relativa dei segnali NMR determinati con Chenomx NMR Suite 7.1



(Chenomx Inc., Edmonton, Alberta, Canada) al fine di valutare la significatività delle differenze di metaboliti tra i diversi gruppi. Sensibilità e specificità sono state valutate mediante le relative curve Receiver Operating-Characteristic (ROC) e l'area sotto la curva (AUC) è stata calcolata utilizzando il pacchetto software gratuito ROCCT: ROC Curve Explorer and Tester, con cut-off > 0.8 (test con buona discriminazione tra controlli e pazienti).

## Risultati

**Coronarografia.** I pazienti del Gruppo di Controllo, in accordo con i parametri di selezione, non hanno presentato stenosi coronariche o alterazioni nella velocità del flusso TIMI.

Per quanto riguarda i casi, i pazienti del Gruppo *Micro* non hanno presentato lesioni stenosanti all'angiografia, ma evidenza di basso flusso TIMI e, in un caso, di spasmo coronarico; i risultati relativi al Gruppo *CAD* sono riportati nella tabella 5.

**Tabella 5.** Caratteristiche angiografiche dei pazienti del Gruppo CAD

Monovascolari	Bivascolari	Trivascolari
2	6	5

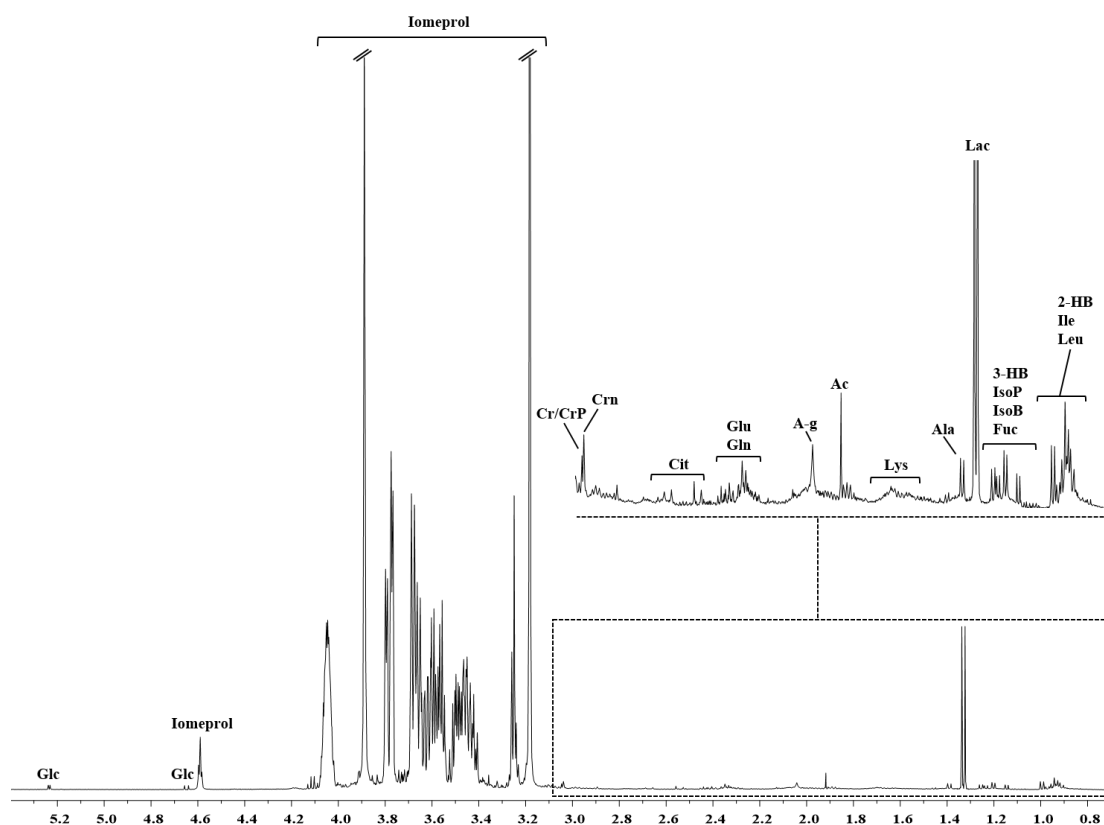
**Analisi Metabolomica.** Il profilo metabolico della frazione idrofila del plasma è mostrato in Figura 2. L'identificazione dei metaboliti è stata effettuata con l'ausilio della letteratura e di database, come Human Metabolome Database (HMDB, <http://www.hmdb.ca>) e la libreria 500 MHz di Chenomx NMR Suite 7.1. L'attribuzione dei maggiori picchi di campioni di plasma sono mostrati in Figura 2, mentre il chemical shift di tutti i metaboliti è riassunto nella Tabella 6

**Tabella 6.** Chemical Shift dei metaboliti identificati nella frazione idrosolubile campioni di plasma analizzati.

Metaboliti	Gruppo	<sup>1</sup> H ppm <sup>a</sup>	<sup>1</sup> H Multiplicity <sup>b</sup>
<b>2-OH-butirrato</b>	CH <sub>3</sub>	0.90	t
	CH <sub>2</sub>	1.68	m
	CH	4.02	dd
<b>3-OH-butirrato</b>	CH <sub>3</sub>	1.20	d
	CH <sub>2</sub>	2.35	dd
	CH	4.12	m
<b>Acetato</b>	CH <sub>3</sub>	1.91	s
<b>Alanina</b>	CH <sub>3</sub>	1.37	d
<b>Citrato</b>	γCH <sub>2</sub>	2.55	d
	γ'CH <sub>2</sub>	2.68	d
<b>Creatina/PCreatina</b>	N-CH <sub>3</sub>	3.04	s
<b>Creatinina</b>	N-CH <sub>3</sub>	3.03	s
<b>Fucoso</b>	♣CH <sub>3</sub>	1.22	d
	♠CH <sub>3</sub>	1.25	d
<b>α-Glucoso</b>	C <sub>1</sub> H	5.23	d
<b>β-Glucoso</b>	C <sub>1</sub> H	4.64	d
<b>Glutamato</b>	♠CH <sub>2</sub>	2.12	m
	γCH <sub>2</sub>	2.34	m
<b>Glutamina</b>	βCH <sub>2</sub>	2.14	m
	γCH <sub>2</sub>	2.43	m
<b>Isobutirrato</b>	CH <sub>3</sub>	1.20	d

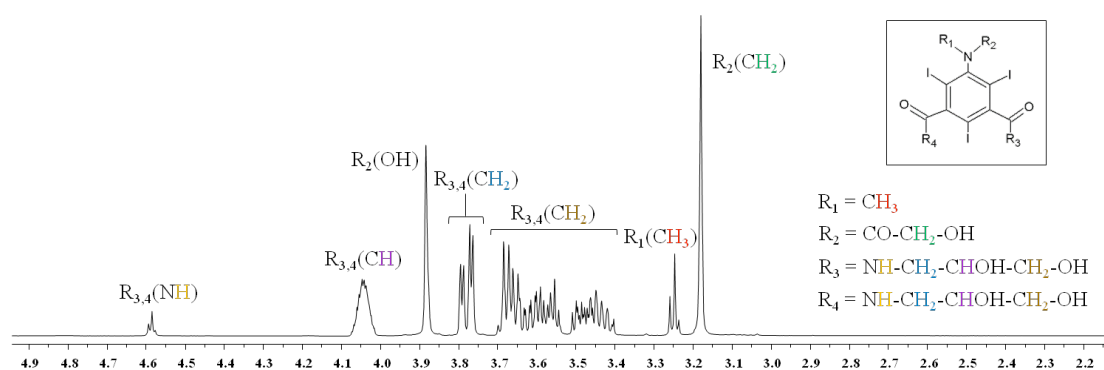
Metaboliti	Gruppo	<sup>1</sup> H ppm <sup>a</sup>	<sup>1</sup> H Multiplicity <sup>b</sup>
<b>Isopropanolo</b>	CH <sub>3</sub>	1.12	d
<b>Isoleucina</b>	αCH	1.98	m
	γCH	1.46	m
	γ'CH	1.25	m
	γ'CH <sub>3</sub>	0.99	d
	δCH <sub>3</sub>	0.93	t
<b>Lattato</b>	αCH <sub>3</sub>	1.32	d
	βCH	4.10	q
	εCH <sub>2</sub>	3.02	t
<b>Leucina</b>	αCH <sub>2</sub>	1.72	m
	βCH	1.76	m
	δCH <sub>3</sub>	0.94	d
<b>Lisina</b>	αCH <sub>2</sub>	1.90	m
	βCH <sub>2</sub>	1.46	m
	δCH <sub>2</sub>	1.72	m
<b>N-Aceti-gruppi</b>	CH <sub>3</sub>	2.06	s

**Figura 2.** Assegnazione delle risonanze di uno spettro  $^1\text{H-NMR}$  picchi: 2-idrossibutirrato (2-HB), 3-idrossibutirrato (3-HB), acetato (Ac), alanina (Ala), citrato (Cit), creatina/fosfocreatina (Cr/CRP), creatinina (CRN), fucosio (Fuc), glucosio (Glc), il glutammato (Glu), glutammina (Gln), isobutirrato (ISOB), isoleucina (Ile), isopropanolo (Isop), lattato (Lac), leucina (Leu), lisina (Lys), gruppi di N-acetil (A-G).

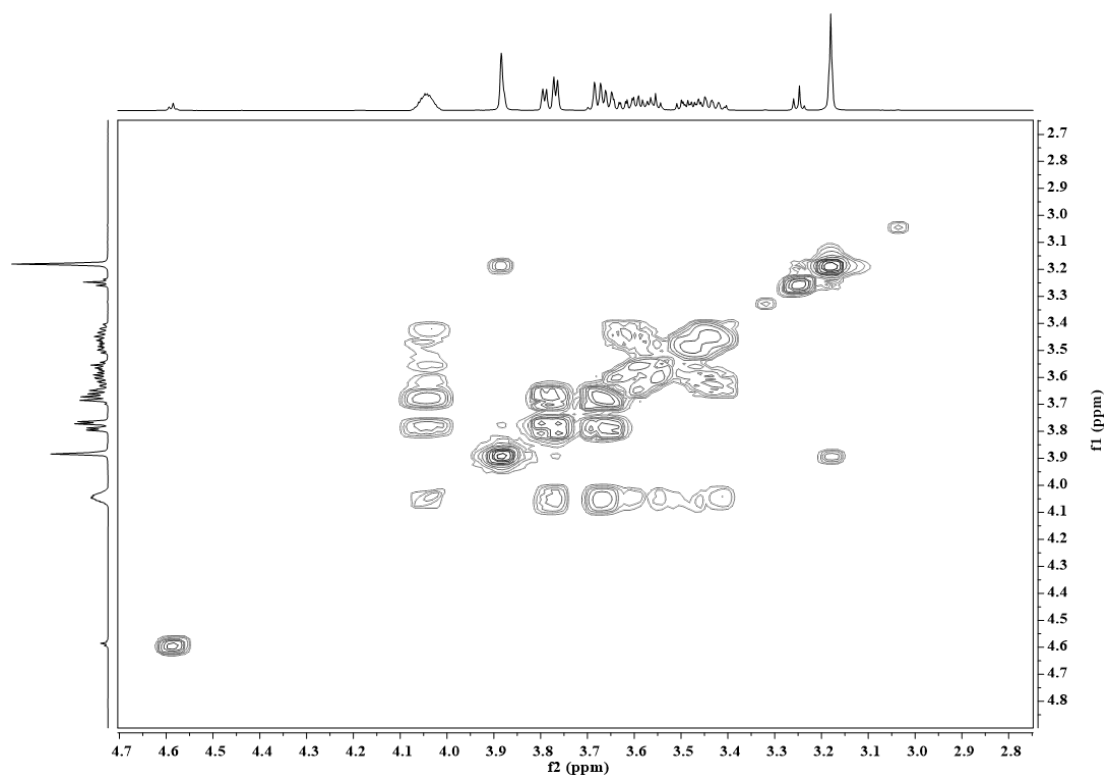


Oltre ai segnali dei metaboliti, come amminoacidi, zuccheri e acidi organici, lo spettro ha mostrato una serie di risonanze notevolmente intense nella zona compresa tra 3,1 e 4,2 ppm. Questi picchi non appartengono al profilo metabolico fisiologico del plasma, ma sono dovuti al mezzo di contrasto impiegato nel corso della coronarografia. L'analisi NMR mono e bidimensionale condotta su una soluzione del mezzo di contrasto (Figura 3 e 4) ha consentito di individuare le sue risonanze caratteristiche, che sono state quindi escluse dall'analisi.

**Figura 3.** Spettro  $^1\text{H-NMR}$  del mezzo di contrasto iodato Iomeprolo (nome commerciale: Iomeron 350; nome IUPAC: N, N'-bis- (2,3-diidrossipropil) -5 - [(idrossimetil) metilammino] -2,4,6-tri- iodo-1,3-benzene carbossamide)

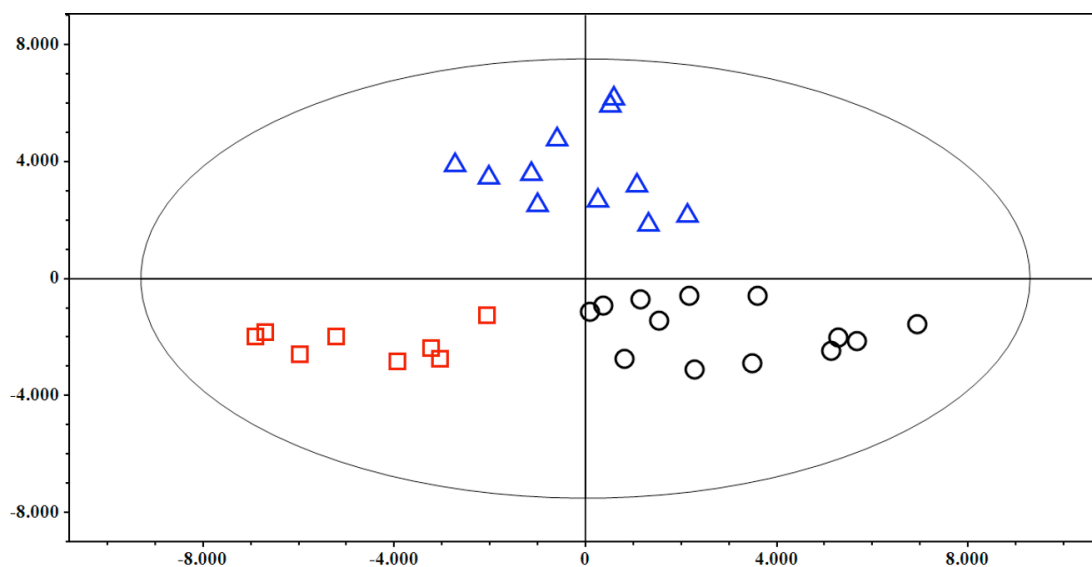


**Figura 4.** spettro NMR 2D-COSY del mezzo di contrasto Iomeprolo (nome commerciale: Iomeron 350; nome IUPAC: N, N'-bis- (2,3-diidrossipropil) -5 - [(idrossiacetil) metilammino] -2,4,6- tri-iodo-1,3-benzene carbossamide).



In una prima fase, una OPLS-DA è stata applicata all'intero data-set (Figura 5). I campioni risultano chiaramente separati in tre gruppi distinti, indicando che controlli, pazienti *Micro* e *CAD* avevano un profilo metabolico significativamente diverso, ottenendo buoni valori di R2Y e Q2 (Tabella 7).

**Figura 5.** Score plot del modello OPLS-DA: Controlli (triangolo blu), *Micro* (quadrato rosso) e *CAD* (cerchio nero).



Al fine di verificare la validità del modello OPLS-DA, abbiamo eseguito un permutation test sul corrispondente modello PLS-DA, utilizzando lo stesso numero di componenti. I risultati sono riportati in Tabella 7, e chiaramente indicano che il modello OPLS-DA era statisticamente valido. Tre modelli OPLS-DA separati sono stati ottenuti con gli stessi tre gruppi di campioni, vale a dire, i controlli, la *Micro* e *CAD*, ma confrontando solo due gruppi in ogni caso. I risultati di tale confronto a coppie sono mostrati in Figura 6 e permettono di valutare meglio i metaboliti responsabili della clusterizzazione nei diversi gruppi. I parametri per tutti i modelli OPLS-DA sono riassunti nella tabella 7.

**Tabella 7.** Valori di  $R^2$  e  $Q^2$  dei modelli OPLS-DA e del Permutation test

Groups	OPLS-DA models			Permutation*		
	Components <sup>a</sup>	$R_2Xcum^b$	$R_2Ycum^c$	$Q_2cum^d$	$R_2$ intercept	$Q_2$ intercept
Controls vs Micro vs CAD	2P+1O	0.305	0.800	0.511	0.460	-0.188
Controls vs Micro	1P+1O	0.317	0.947	0.697	0.513	-0.161
Controls vs CAD	1P+1O	0.247	0.871	0.512	0.507	-0.147
Micro vs CAD	1P+1O	0.301	0.895	0.673	0.425	-0.144

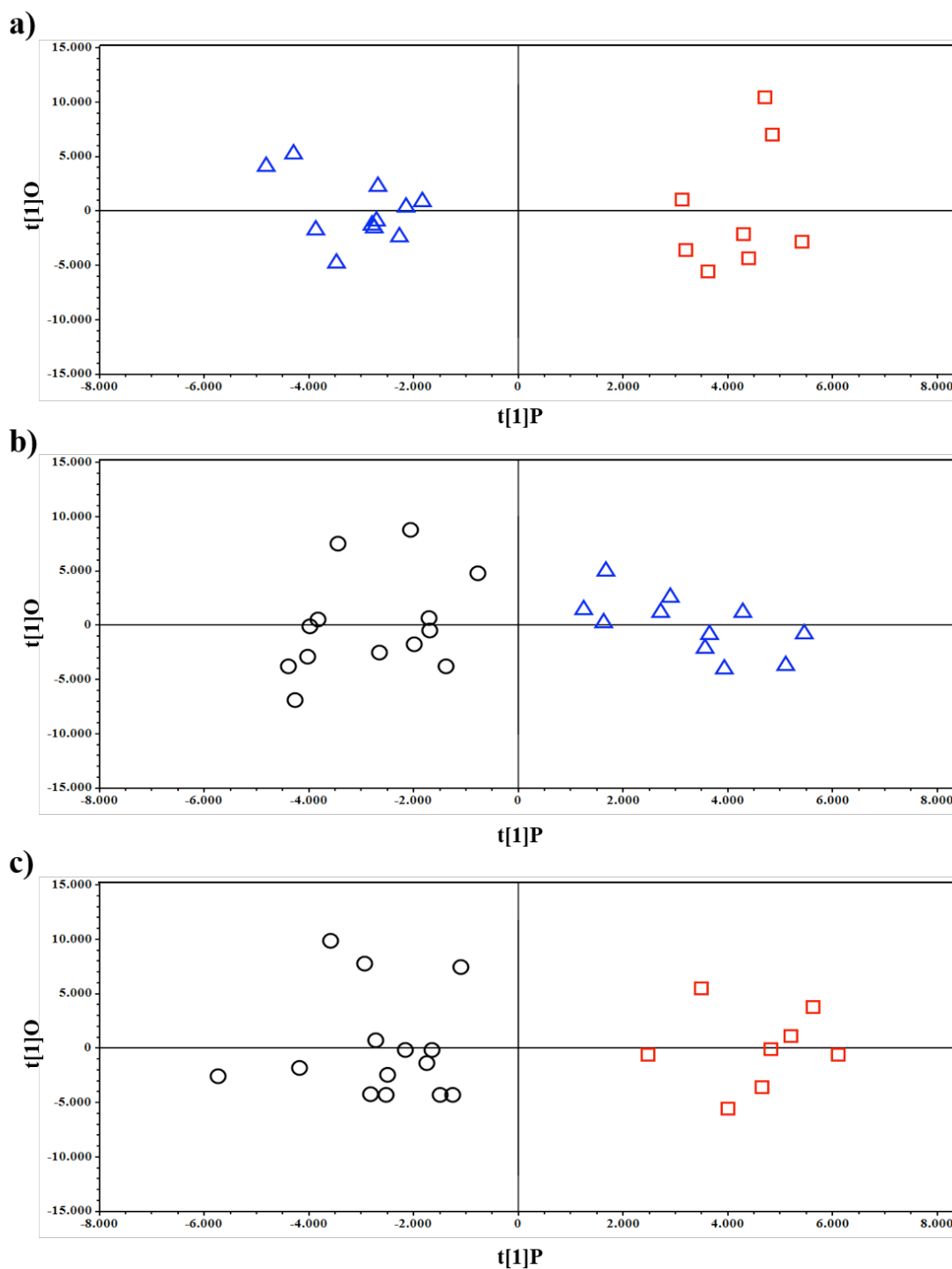
<sup>a</sup> The number of Predictive and Orthogonal components used to create the statistical models.

<sup>b,c</sup>  $R_2X$  and  $R_2Y$  indicated the cumulative explained fraction of the variation of the X block and Y block for the extracted components.

<sup>d</sup>  $Q_2cum$  values indicated cumulative predicted fraction of the variation of the Y block for the extracted components.

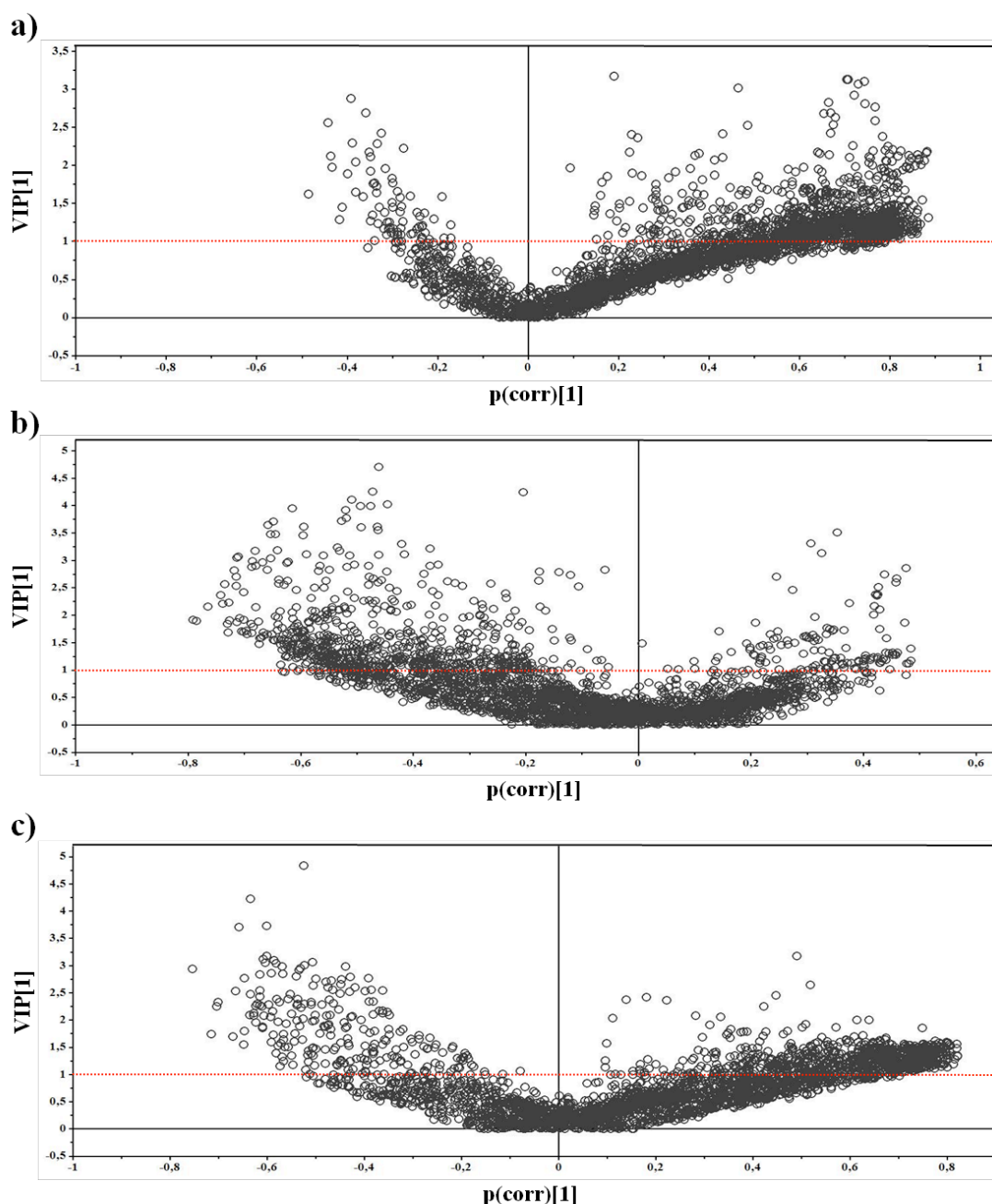
\*  $R_2$  and  $Q_2$  intercept values are indicative of a valid model. The Permutation test was evaluated on the corresponding partial least square discriminant analysis (PLS-DA) model.

**Figura 6.** Score plot dei modelli OPLS-DA derivati dal confronto a coppie degli spettri  $^1\text{H-NMR}$ : a) controlli (triangolo blu) vs *Micro* (quadrato rosso), b) controlli (triangolo blu) vs *CAD* (cerchio nero) e c) *Micro* (quadrato rosso) vs *CAD* (cerchio nero).





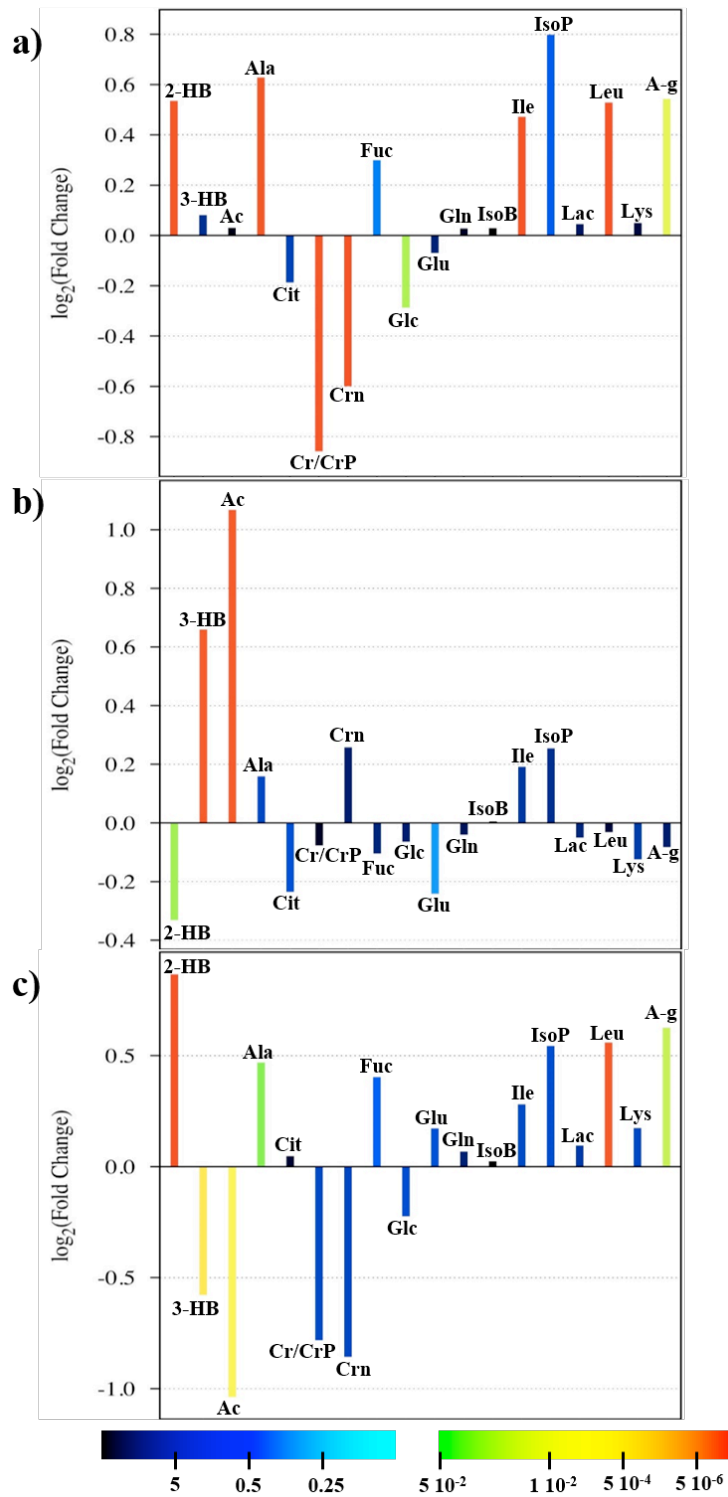
L'identificazione dei metaboliti principali responsabili per la separazione gruppi è stata infine ottenuta con la costruzione di un V-plot per ogni modello OPLS-DA. Il V-plot rivela il contributo di ciascuna variabile in rapporto alla componente predittiva, combinando i coefficienti di correlazione  $p$  (corr) con i valori VIP (Figura 7). Il valore VIP è stato utilizzato per valutare l'importanza relativa delle variabili. Le variabili, ossia i metaboliti, con un punteggio  $VIP > 1$  sono state prese in considerazione e la loro concentrazione relativa è stata determinata utilizzando Chemomx NMR Suite 7.1.



**Figura 7.** V-plot con  $p$  (corr) e VIP valori derivati dal confronto a coppie degli spettri  $^1\text{H}$ -NMR nei modelli OPLS-DA: a) Controlli vs *Micro*, b) Controlli vs *CAD* e c) *Micro* vs *sCAD*.

Il nuovo insieme di dati così ottenuto è stato, poi, normalizzato e sottoposto a test di Student ed i risultati sono stati corretti con il metodo di Bonferroni. La fold change è stata calcolata per ciascuna di queste variabili e la sua entità è stata codificata utilizzando colori diversi in base alla corrispondente p-value (Figura 8).

Diversi metaboliti sono risultati significativamente differenti tra i tre gruppi di campioni. Un maggiore contenuto di 2-idrossi-butirrato, alanina, leucina, isoleucina, gruppi N-acetilici, e un più basso contenuto di creatina/fosfocreatina, creatinina e glucosio hanno caratterizzato i pazienti *Micro* rispetto al gruppo di controllo (Figura 8 A). Un maggiore contenuto di 3-idrossi-butirrato, acetato e un minor contenuto di 2-idrossi-butirrato hanno invece distinto i pazienti *CAD* confrontati con i controlli (Figura 8 B). Infine, la Figura 8 C evidenzia il confronto complementare tra pazienti *Micro* e *CAD*, dove un maggior contenuto di 2-idrossi-butirrato, alanina, leucina, gruppi N-acetilici, e un contenuto inferiore di 3-idrossi-butirrato e acetato hanno caratterizzato i pazienti del primo gruppo. Le curve ROC sono state utilizzate per valutare la significatività combinata di questi metaboliti ottenendo una AUC > 0.9 per ogni coppia.



**Figura 8**, Plots relativi alle variazioni relative nella concentrazione dei metaboliti colorati sulla base del corrispondente p-value (corretto con il metodo Bonferroni).

Confronto a coppie di: a) *Micro* vs controlli, b) *CAD* vs controlli e *Micro* vs *CAD*. Metaboliti: 2-idrossibutirrato (2-HB), 3-idrossibutirrato (3-HB), acetato (Ac), alanina (Ala), citrato (Cit), creatina/fosfocreatina (Cr/CRP), creatinina (CRN), fucosio (Fuc), glucosio (Glc), glutammato (Glu), glutammina (Gln), isobutirrato (ISOB), isoleucina (Ile), isopropanolo (Isop), lattato (Lac), leucina (Leu), lisina (Lys), gruppi N-acetilici (Ag)

## Discussione

Questo studio ha avuto come obiettivo quello di valutare se, attraverso il sensibile metodo MBS, fossero identificabili differenze metaboliche significative tra arterie coronarie normali e patologiche, distinguendo, inoltre, la presenza di una aterosclerosi stenosante da una malattia coronarica micro-vascolare. A questo scopo, sono stati eseguite analisi  $^1\text{H-NMR}$  su campioni di sangue da ciascuna coronaria di tutti i casi e i controlli arruolati.

I nostri risultati mostrano che:

- i. sulla base di un modello OPLS-DA, i campioni si sono disposti in 3 gruppi distinti, giacché i *Micro*, i *CAD* e i controlli sono risultati caratterizzati da profili metabolici specifici e tra loro significativamente differenti;
- ii. i confronti tra coppie hanno permesso di valutare ed identificare quali metaboliti fossero responsabili della separazione tra i 3 gruppi. In dettaglio, i *Micro* avevano livelli più elevati di 2-idrossibutirrato, alanina, leucina, isoleucina, gruppi N-acetilici ed inferiori di creatina/fosfo-creatina, creatinina e glucosio; i *CAD* mostravano concentrazioni maggiori di 3-idrossibutirrato, acetato ed inferiori di 2-idrossibutirrato; infine, un contenuto maggiore di 2-idrossibutirrato, alanina, leucina, gruppi N-acetilici ed inferiore di 3-idrossibutirrato ed acetato veniva osservato nei *Micro*, quando confrontati con i *CAD*;
- iii. Le curve ROC, create per valutare la significatività della concentrazione relativa di questi metaboliti, hanno confermato l'individuazione di tre impronte biochimiche distinte: una appartenente alle coronarie "sane", le altre due identificanti la malattia stenosante e quella micro-vascolare, rispettivamente.

Diversi lavori indirizzati allo studio dei meccanismi fisiopatologici coinvolti nell'aterogenesi hanno dimostrato che le alterazioni della funzione endoteliale sono un elemento fondamentale nello sviluppo di questa patologia, avendo un ruolo importante nella progressione della placca e nelle complicazioni che ne derivano<sup>121,122,123</sup>.

Per quanto riguarda la possibilità di utilizzare l'analisi metabolomica al fine di rilevare la presenza di MCV e definirne la gravità, studi precedenti hanno ottenuto risultati divergenti, sostenendo<sup>124</sup>, oppure escludendo<sup>125</sup> la verosimiglianza e l'utilità di questo approccio. Tuttavia, questi lavori sono stati condotti mediante analisi di sangue periferico, nella prospettiva di inquadrare la metabolomica come metodica diagnostica alternativa alla coronarografia. Viceversa, nel nostro studio, l'analisi metabolomica è stata utilizzata come strumento di ricerca fisiopatologico, piuttosto che come una nuova metodologia diagnostica; ossia in associazione alla tecnica diagnostica "gold standard" (coronarografia) e non in alternativa ad essa.

Inoltre, negli studi che ci hanno preceduto<sup>124</sup> i risultati sono stati influenzati dalle concentrazioni lipidiche del siero, inferiori nei pazienti con aterosclerosi coronarica più grave, perché trattati con dosi più elevate di statine. Per evitare questi fattori confondenti, nel nostro lavoro i campioni sono stati sottoposti ad estrazione con cloroformio/metanolo, analizzando esclusivamente la loro fase idrofila.

Fin dalle prime osservazioni sulla influenza della disfunzione endoteliale a livello delle arterie epicardiche ateromasiche<sup>126</sup>, un numero crescente di studi si è focalizzato sulla possibilità di anticipare e rendere meno invasivo il riconoscimento di queste alterazioni<sup>122</sup>. Tuttavia, la prevalenza di “un interesse diagnostico” ha deviato l'attenzione dall'endotelio come substrato di aterogenesi e la comprensione dell'evoluzione della malattia dovuta ad un'eventuale maggiore compromissione del microcircolo, piuttosto che delle arterie epicardiche, è stata trascurata e ritardata.

Durante l'ultimo decennio, gli studi basati sulla metabolomica hanno facilitato il rapido sviluppo di approcci mirati in ambito CV, consentendo la individuazione di profili metabolici specifici che si accompagnano ad alcuni fattori di rischio e sottendono MCV, in special modo l'insufficienza cardiaca<sup>127</sup>.

Lo studio della risposta metabolica endoteliale è di cruciale importanza: i fattori di rischio riconosciuti per l'aterosclerosi, anche se tipicamente sistemica, richiedono necessariamente un'alterazione delle proprietà endoteliali per divenire, da potenziale minaccia, una lesione patologica<sup>121,122,123</sup>.

Con queste premesse, abbiamo progettato questo studio, possibilmente in grado di valutare il microambiente coronarico, nonché la sua relazione con il pattern ed il grado di compromissione anatomico-funzionale arteriosa. Abbiamo ottenuto sangue di provenienza centrale in soggetti con e senza CAD sottoposti ad angiografia coronarica.

I pazienti con angina stabile (stress test positivo) hanno formato i due gruppi oggetto di studio (*Micro* e *CAD*), mentre i soggetti con malattia non-ischemica (es valvulopatia e/o cardiomiopatia), ma aventi comunque indicazione ad eseguire lo studio coronarografico, sono stati arruolati come controlli.

Sulla base del nostro modello OPLS-DA, il sangue coronarico dei pazienti con malattia coronarica stenosante (*CAD*) è apparso differente, in modo molto specifico, da quello dei soggetti presentanti una patologia micro-vascolare (*Micro*). Inoltre, l'analisi metabolomica ha permesso di differenziare entrambi i due gruppi di studio, *Micro* e *CAD*, da quello di controllo includente pazienti non ischemici.

Differenze in ambito emodinamico, per quanto rilevanti nelle localizzazioni e manifestazioni cliniche della aterosclerosi, non possono spiegare completamente l'ampia variabilità nella predisposizione alla CAD<sup>128</sup> ed ancora meno i suoi diversi "pattern" di manifestazione. Esiste

una crescente evidenza che l'interazione tra fattori di rischio "macro" (diabete, ipertensione, dislipidemia, fumo) e le proprietà intrinseche (genetiche, epigenetiche) dell'endotelio locale, possa essere fondamentale per l'aterogenesi<sup>129</sup>, attraverso la creazione di un microambiente adatto alla traslazione fenotipica di una specifica "susceptibilità aterosclerotica".

La capacità di distinguere, sulla base di un'analisi metabolomica, i pazienti ischemici che presentano diverse espressioni o stadi evolutivi della stessa malattia, sembra sostenere l'esistenza di un *continuum* della disfunzione endoteliale: probabilmente, tale fenomeno, innescato dai classici fattori di rischio cardiovascolare, viene modulato, in maniera accrescitiva o riduttiva, dall'ambiente locale e su base individuale.

Un gruppo limitato di metaboliti, individuati dall'analisi metabolomica, ci ha permesso di identificare una impronta digitale biochimica delle arterie malate, nonché suggerito l'esistenza di diversi meccanismi coinvolti nello sviluppo della malattia aterosclerotica.

Il sangue coronarico del gruppo *CAD* è caratterizzato da elevati livelli di aceto-acetato e 3-idrossibutirrato, rispetto sia al gruppo *Micro*, che ai controlli, mentre il livello di 2-idrossibutirrato è risultato inferiore rispetto agli altri due gruppi. In studi precedenti, l'aceto-acetato ed il 3-idrossibutirrato, ma non il 2-idrossibutirrato sono stati associati al progredire dell'aterosclerosi nei pazienti diabetici<sup>130,131</sup>. In particolare, il lavoro di Kanikarla-Marie ha mostrato che questi due corpi chetonici up-regolano molteplici fattori coinvolti nell'aterogenesi, quali ICAM-1 e l'adesione dei monociti, ma anche la NADPH ossidasi, generando così a livello endoteliale un aumento dello stress ossidativo.

Da parte loro, i pazienti "*Micro*" mostravano livelli elevati di alanina, leucina/isoleucina, 2-idrossibutirrato e di gruppi N-acetilici, mentre la creatina e la creatinina risultavano essere inferiori di concentrazione rispetto al gruppo di controllo. La creatina ha dimostrato avere effetti anti-infiammatori a livello endoteliale, essendo in grado di inibire l'espressione di ICAM-1 e di E-selectina, riducendo in tal modo la marginazione (accumulo ed adesione) dei neutrofili. Inoltre, la creatina ridurrebbe la permeabilità dell'endotelio<sup>132</sup>; Sestili et al. hanno, peraltro, messo in evidenza il suo effetto citoprotettivo come "*spazzino*" di specie reattive dell'ossigeno e dell'azoto<sup>133</sup>.

In un recente studio, l'alanina è risultata indipendentemente associata ad eventi cardiaci<sup>134</sup>. Al contrario, una riduzione dei livelli di alanina sono stati riscontrati sia nei topi deficienti di apolipoproteina E (apolipoproteina E/)<sup>135</sup>, sia nel plasma dei pazienti con aterosclerosi carotidea stabile<sup>136</sup>. Questa doppia azione dell'alanina, ossia associata ad eventi cardiovascolari, ma al tempo stesso ridotta come concentrazione nei pazienti con aterosclerosi, è stata osservata anche nella nostra popolazione di studio. Infatti, i pazienti *Micro* hanno mostrato livelli elevati di alanina rispetto sia al gruppo *CAD* che a quello

controllo. Questa evidenza suggerisce un profilo di rischio in cui gli eventi ischemici non sono associati a placche aterosclerotiche.

Un atteggiamento simile potrebbe essere considerato anche per la leucina/isoleucina, dato che è stato appurato come possa essere in grado di diminuire i livelli sierici di SOD e GPx nei ratti ipercolesterolemici<sup>137</sup>, ma, al tempo stesso, di come risulti positivamente correlata con i valori di acetoacetato e 3-idrossibutirrato in pazienti affetti da aterosclerosi<sup>136</sup>.

Le cellule endoteliali vascolari sono l'interfaccia tra la circolazione sistemica ed i tessuti e mediano molti processi critici come infiammazione, coagulazione e vasoreattività. I nostri risultati suggeriscono che le caratteristiche predeterminate delle cellule endoteliali possono interagire con i fattori di rischio cardiovascolare, contribuendo ad una suscettibilità su base individuale all'aterosclerosi. Nel complesso, le evidenze attualmente disponibili, avvalorate anche dai nostri dati, sembrano suggerire che i profili metabolomici dipendano più dalla covarianza di metaboliti, che dal cambiamento della loro concentrazione assoluta.

Per disporre di una conoscenza completa di queste interazioni metaboliche sono certamente necessari studi più ampi, corroborati da un approccio integrato di clinici, genetisti, biofisici esperti di metabolomica. La speranza è che i dati provenienti da queste indagini permetteranno non solo di comprendere meglio la storia naturale della malattia, ma anche di identificare nuovi bersagli terapeutici e strumenti diagnostici, in grado di modulare la risposta endoteliale e modificare l'evoluzione della malattia coronarica.

### **Prospettive**

**Cura del paziente e procedure diagnostiche:** I presenti risultati alimentano l'auspicio di poter aumentare sensibilità e specificità degli score di rischio clinico esistenti, integrandoli con la valutazione di di metaboliti, in numero limitato e specifici. Una migliore stratificazione del rischio consentirebbe l'ottimizzazione della gestione individuale del paziente.

**Ipotesi Traslazionale:** La capacità di rilevare vie metaboliche implicate in un profilo biochimico "protettivo" potrebbe consentire, ad esempio, la realizzazione di stent coronarici non solo riassorbibili, (come gli attuali Bioresorbable Vascular Scaffold), ma anche in grado, durante la loro degradazione, di rilasciare fattori endotelio-modulanti, per migliorare il microambiente coronarico e prevenire/ritardare lo sviluppo della malattia aterosclerotica.

### **Limiti dello studio**

Il limite principale del presente studio è la bassa numerosità del campione, in particolare del gruppo dei controlli e di quello dei pazienti affetti da malattia del microcircolo. Con la prosecuzione dell'arruolamento sarà possibile aumentare la significatività dei dati, rendendo possibile una loro interpretazione a fini fisiopatologici.



## Bibliografia

1. Murray CJ, Lopez AD. Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2010: Global Burden of Disease Study. *Lancet* 1997; 349: 1498-504.
2. Bonow RO, Smaha LA, Smith SC Jr, et al: World Heart Day 2002: The international burden of cardiovascular disease –responding to the emerging global epidemiologic. *Circulation* 106: 1602-1605, 2002.
3. Lloyd-Jones D, et al. Executive summary: heart disease and stroke statistics--2014 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 2014; 121:948.
4. Davies MJ. The pathophysiology of acute coronary syndromes. *Heart* 2000; 83: 361-6.
5. Libby P. Current concepts of the pathogenesis of the acute coronary syndromes. *Circulation* 2001; 104: 365-72.
6. Heberden. Some account of a disorder of the breast. *Med Transact R Coll Phys Lond* 1772; 2:59.
7. Parry CH. *An inquiry into the symptoms and causes of syncope anginosa, commonly called angina pectoris. Edinburgh, London: Bryce, Murray and Callow; 1799.*
8. Lloyd-Jones DM, Hong Y, Labarthe D, Mozaffarian D, et al; on behalf of the American Heart Association Strategic Planning Task Force and Statistics Committee. Defining and Setting National Goals for Cardiovascular Health Promotion and Disease Reduction. The American Heart Association's Strategic Impact Goal Through 2020 and Beyond. *Circulation*. 2010; 121:586–613.
9. Kern MJ. Coronary blood flow and myocardial ischemia. In Braunwald's Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine, Seventh Edition 2007.
10. Duncker DJ, Bache RJ. Regulation of coronary blood flow during exercise. *Physiol Rev*. 2008 Jul;88(3):1009-86
11. Hoffmann E, Sclafani R. Circolo coronarico ed ischemia miocardica. *Ital Heart J* 2000; 1 (suppl 2): 7-12.
12. Detry JM. The pathophysiology of myocardial ischemia. *Eur Heart J* 1996; 17 (Suppl G): 48-52.
13. Gould KL, Lipcomb K. Effects of coronary stenosis on coronary flow reserve and resistance. *Am J Cardiol* 1974; 34:48-55.
14. Gould L. Coronary artery stenosis and reversing atherosclerosis, 2nd ed New York, Arnold and Oxford University Press, 1998.
15. Brown B, Bolson E, Dodge H. Dynamic mechanisms in human coronary stenoses. *Circulation* 1984; 70:917-22.
16. Picano E. Symptoms and signs of myocardial ischemia. In stress echocardiography, Fifth Edition, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg 2009; Nesto RW, Kowalchuch GJ. The ischemic cascade: temporal sequence of hemodynamic, electrocardiographic and symptomatic expressions of ischemia. *Am J Cardiol* 1987; 59:23C-30C.
17. Nesto RW, Kowalchuch GJ. The ischemic cascade: temporal sequence of hemodynamic, electrocardiographic and symptomatic expressions of ischemia. *Am J Cardiol* 1987; 59:23C-30C.
18. Hamm C, Heeschen C, Falk E, Fox KAA. Acute coronary syndromes: pathophysiology, diagnosis and risk stratification. In: Camm AJ, Luescher TF, Serruys PW, eds. The ESC Textbook of Cardiovascular Medicine. Oxford, UK: Blackwell Publishing, 2006: 333-66.

19. Skalski JH. Myocardial infarction and angina pectoris in the history of Polish medicine. *Pol Arch Med Wewn.* 2008;118(4):243–247.
20. Libby P, Aikawa M, Schonbeck U: Cholesterol and atherosclerosis. *Biochim Biophys Acta* 1529:299, 2000.
21. Ross R. Atherosclerosis - an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 340: 115-26.
22. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature.* 2002; 420:868–874.
23. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation.* 2002;105:1135–1143.
24. Hansson G. Immune mechanisms in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001; 21:1876–1890.
25. Zernecke, A. & Weber, C. Chemokines in the vascular inflammatory response of atherosclerosis. *Cardiovasc. Res.* 86, 192–201 (2010).
26. Drechsler, M., Megens, R.T., van Zandvoort, M., Weber, C. & Soehnlein, O. Hyperlipidemia-triggered neutrophilia promotes early atherosclerosis. *Circulation* 122, 1837–1845 (2010).
27. Seimon, T.A. et al. Atherogenic lipids and lipoproteins trigger CD36-TLR2–dependent apoptosis in macrophages undergoing endoplasmic reticulum stress. *Cell Metab.* 12, 467–482 (2010).
28. Yvan-Charvet, L. et al. Combined deficiency of ABCA1 and ABCG1 promotes foam cell accumulation and accelerates atherosclerosis in mice. *J. Clin. Invest.* 117, 3900–3908 (2007).
29. Soehnlein, O. & Lindbom, L. Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 10, 427–439 (2010).
30. Hansson, G.K. & Hermansson, A. The immune system in atherosclerosis. *Nat. Immunol.* 12, 204–212 (2011).
31. Weber, C., Zernecke, A. & Libby, P. The multifaceted contributions of leukocyte subsets to atherosclerosis: lessons from mouse models. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 802–815 (2008).
32. Delphine Gomez and Gary K. Owens Smooth cells phenotypic switching in atherosclerosis 2012 Jul 15; 95(2): 156–164.
33. Rivard A, Andres V. Vascular smooth muscle cell proliferation in the pathogenesis of atherosclerotic cardiovascular diseases. *Histol Histopathol.* 2000;15:557–571.
34. Morice MC, Serruys PW, Sousa JE, et al. A randomized comparison of a sirolimus-eluting stent with a standard stent for coronary revascularization. *N Engl J Med.* 2002; 346:1773–1780.
35. Grube E, Silber SM, Hauptmann KE. Taxus I: prospective, randomized, double-blind comparison of NIRx™ stent coated with paclitaxel in a polymer carrier in de-novo coronary lesions compared with uncoated controls. *Circulation.* 2001;104(suppl II):II-463.
36. Raines EW. The extracellular matrix can regulate vascular cell migration, proliferation, and survival: relationships to vascular disease. *Int J Exp Pathol.* 2000; 81:173–182.
37. Rekhter MD. Collagen synthesis in atherosclerosis: too much and not enough. *Cardiovasc Res.* 1999; 41:376–384.

38. Benjamin IJ. Matrix metalloproteinases: from biology to therapeutic strategies in cardiovascular disease. *J Investig Med.* 2001; 49:381–397.
39. Glagov S, Weisenberg E, Zarins CK, et al. Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med.* 1987; 316:1371–1375.
40. Lafont A, Topol EJ, eds. *Arterial Remodeling: A Critical Factor in Restenosis.* Boston, Mass: Kluwer Academic Publishers; 1997.
41. Pasterkamp G, de Kleijn DP, Borst C. Arterial remodeling in atherosclerosis, restenosis and after alteration of blood flow: potential mechanisms and clinical implications. *Cardiovasc Res.* 2000; 45:843–852.
42. Davies MJ, Richardson PD, Woolf N, et al. Risk of thrombosis in human atherosclerotic plaques: role of extracellular lipid, macrophage and smooth muscle cell content. *Br Heart J.* 1993; 69:377–381.
43. Galis ZS, Khatri JJ. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly. *Circ Res.* 2002; 90:251–262.
44. Davies MJ. Stability and instability: the two faces of coronary atherosclerosis: the Paul Dudley White Lecture 1995. *Circulation.* 1996; 94:2013–2020.
45. Park KH, Park WJ. Endothelial Dysfunction: Clinical Implications in Cardiovascular Disease and Therapeutic Approaches. *J Korean Med Sci* 2015 Sep;30(9):1213-25
46. Ross R. Atherosclerosis; an inflammatory disease. *N Engl J Med.* 1999; 340:115–126.
47. Kinlay S, Ganz P. Role of endothelial dysfunction in coronary artery disease and implications for therapy. *Am J Cardiol.* 1997; 80:11-I–16-I.
48. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med.* 1993; 329:2002–2012.
49. Rees DD, Palmer RM, Moncada S. Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86:3375–3378.
50. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med.* 1993; 329:2002–2012.
51. Luft FC. Proinflammatory effects of angiotensin II and endothelin: targets for progression of cardiovascular and renal diseases. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2002; 11:59–66.
52. Corretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ, 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 [published correction appears in *J Am Coll Cardiol.* 2002;39:1082]. *J Am Coll Cardiol.* 2002; 39:257–265.
53. Lieberman EH, Gerhard MD, Uehata A, et al. Flow-induced vasodilation of the human brachial artery is impaired in patients < 40 years of age with coronary artery disease. *Am J Cardiol.* 1996; 78:1210–1214.
54. Ludmer PL, Selwyn AP, Shook TL, et al. Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med.* 1986; 315:1046–1051.
55. Creager MA, Cooke JP, Mendelsohn ME, et al. Impaired vasodilation of forearm resistance vessels in hypercholesterolemic humans. *J Clin Invest.* 1990; 86:228–234.

56. Celermajer DS, Sorensen KE, Georgakopoulos D, et al. Cigarette smoking is associated with dose-related and potentially reversible impairment of endothelium-dependent dilation in healthy young adults. *Circulation*. 1993;88(5 pt 1):2149–2155.
57. Loscalzo J. Nitric oxide insufficiency, platelet activation, and arterial thrombosis. *Circ Res*. 2001; 88:756–762.
58. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*. 2002; 420:868–874.
59. Hawiger J. Innate immunity and inflammation: a transcriptional paradigm. *Immunol Res*. 2001; 23:99–109.
60. Rosenfeld ME. Cellular mechanisms in the development of atherosclerosis. *Diabetes Res Clin Pract*. 1996;30(suppl):1–11.
61. Libby P. Changing concepts of atherogenesis. *J Intern Med*. 2000; 247:349–358.
62. De Caterina R, Libby P, Peng HB, et al. Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation: nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. *J Clin Invest*. 1995; 96:60–68.
63. Khan BV, Harrison DG, Olbrych MT, et al. Nitric oxide regulates vascular cell adhesion molecule 1 gene expression and redox-sensitive transcriptional events in human vascular endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996; 93:9114–9119.
64. Loscalzo J. Nitric oxide insufficiency, platelet activation, and arterial thrombosis. *Circ Res*. 2001; 88:756–762.
65. Vallance P, Chan N. Endothelial function and nitric oxide: clinical relevance. *Heart*. 2001; 85:342–350.
66. Loscalzo J. Nitric oxide insufficiency, platelet activation, and arterial thrombosis. *Circ Res*. 2001; 88:756–762.
67. Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. The role of nitric oxide and cGMP in platelet adhesion to vascular endothelium. *Biochem Biophys Res Commun*. 1987; 148:1482–1489.
68. Diodati JG, Dakak N, Gilligan DM, et al. Effect of atherosclerosis on endothelium-dependent inhibition of platelet activation in humans. *Circulation*. 1998; 98:17–24.
69. Kuvin JT, Patel AR, Sliney KA, et al. Peripheral vascular endothelial function testing as a noninvasive indicator of coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*. 2001; 38:1843–1849.
70. Heitzer T, Schlinzig T, Krohn K, et al. Endothelial dysfunction, oxidative stress, and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery disease [published correction appears in *Circulation*. 2003; 108:500]. *Circulation*. 2001; 104:2673–2678.
71. Hasdai D, Lerman A. The assessment of endothelial function in the cardiac catheterization laboratory in patients with risk factors for atherosclerotic coronary artery disease. *Herz*. 1999; 24:544–547.
72. Anderson TJ, Gerhard MD, Meredith IT, Charbonneau F, Delagrangé D, Creager MA, Selwyn AP, Ganz P. Systemic nature of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Am J Cardiol*. 1995; 75:71B–74B.
73. Anderson TJ, Uehata A, Gerhard MD, Meredith IT, Knab S, Delagrangé D, Lieberman EH, Ganz P, Creager MA, Yeung AC, Selwyn AP. Close relation of endothelial function in the human coronary and peripheral circulations. *J Am Coll Cardiol*. 1995; 26:1235–1241.
74. Takase B, Uehata A, Akima T, Nagai T, Nishioka T, Hamabe A, Satomura K, Ohsuzu F, Kurita A. Endothelium-dependent flow-mediated vasodilation in coronary

- and brachial arteries in suspected coronary artery disease. *Am J Cardiol.* 1998; 82:1535–1539.
75. Anderson TJ. Assessment and treatment of endothelial dysfunction in humans. *J Am Coll Cardiol.* 1999; 34:631–638.
  76. Corretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ, Celermajer D, Charbonneau F, Creager MA, Deanfield J, Drexler H, Gerhard-Herman M, Herrington D, Vallance P, Vita J, Vogel R. Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery. *J Am Coll Cardiol.* 2002; 39:257–265.
  77. Camici PG, Crea F. Coronary microvascular dysfunction. *N Engl J Med* 2007; 356:830–40.
  78. Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res.* 2000; 87:840–844.
  79. Maytin M, Leopold J, Loscalzo J. Oxidant stress in the vasculature. *Curr Atheroscler Rep.* 1999; 1:156–164.
  80. Zalba G, Beaumont J, San Jose G, et al. Vascular oxidant stress: molecular mechanisms and pathophysiological implications. *J Physiol Biochem.* 2000; 56:57–64.
  81. Griendling KK, Harrison DG. Out, damned dot: studies of the NADPH oxidase in atherosclerosis. *J Clin Invest.* 2001; 108:1423–1424.
  82. Tomasian D, Keaney JF Jr, Vita JA. Antioxidants and the bioactivity of endothelium-derived nitric oxide. *Cardiovasc Res.* 2000; 47:426–435.
  83. Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res.* 2000; 87:840–844.
  84. Yura T, Fukunaga M, Khan R, Nassar GN, Badr KF, Montero A. Freeradical-generated F2-isoprostane stimulates cell proliferation and endothelin-1 expression on endothelial cells. *Kidney Int.* 1999; 56:471–478.
  85. Jones DP. Redefining oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* 2006; 8:1865–79.
  86. Ashfaq S, Abramson JL, Jones DP, Rhodes SD, Weintraub WS, Hooper WC, et al. Endothelial function and aminothiols biomarkers of oxidative stress in healthy adults. *Hypertension* 2008; 52:80.
  87. Ashfaq S, Abramson JL, Jones DP, Rhodes SD, Weintraub WS, Hooper WC, et al. The relationship between plasma levels of oxidized and reduced thiols and early atherosclerosis in healthy adults. *J Am Coll Cardiol* 2006; 47:1005–11.
  88. Dhawan SS, Eshtehardi P, McDaniel MC, Fike LV, Jones DP, Quyyumi AA, Samady H. The role of plasma aminothiols in the prediction of coronary microvascular dysfunction and plaque vulnerability. *Atherosclerosis*, 2011 Nov;219(1):266-72. Epub 2011 May 27.
  89. Al Suwaidi J, Hamasaki S, Higano ST, Nishimura RA, Holmes DR Jr, Lerman A. Long-term follow-up of patients with mild coronary artery disease and endothelial dysfunction. *Circulation.* 2000; 101:948–954.
  90. Gokce N, Keaney JF Jr, Hunter LM, Watkins MT, Menzoian JO, Vita JA. Risk stratification for postoperative cardiovascular events via noninvasive assessment of endothelial function: a prospective study. *Circulation.* 2002; 105:1567–1572.
  91. Gimbrone MA Jr, Topper JN, Nagel T, Anderson KR, Garcia-Cardeña G. Endothelial dysfunction, hemodynamic forces, and atherogenesis. *Ann N Y Acad Sci.* 2000; 902:230–239.

92. Gimbrone MA Jr et al Vascular endothelium, hemodynamics, and the pathobiology of atherosclerosis. *Gimbrone MA Jr et al Cardiovasc Pathol.* 2013 Jan-Feb;22(1):9-15
93. Vogel RA, Corretti MC. Estrogens, progestins, and heart disease: can endothelial function divine the benefit? *Circulation.* 1998; 97:1223–1226.
94. Zeiher AM, Drexler H, Wollschläger H, Just H. Endothelial dysfunction of the coronary microvasculature is associated with impaired coronary blood flow regulation in patients with early atherosclerosis. *Circulation.* 1991;84:1984–1992.
95. Zeiher AM, Drexler H, Wollschläger H, Just H. Modulation of coronary vasomotor tone in humans: progressive endothelial dysfunction with different early stages of coronary atherosclerosis. *Circulation.* 1991; 83:391–401.
96. Quyyumi AA, Dakak N, Andrews NP, Gilligan DM, Panza JA, Cannon RO III. Contribution of nitric oxide to metabolic coronary vasodilation in the human heart. *Circulation.* 1995; 92:320–326.
97. Motz W, Vogt M, Rabenau O, Scheler S, Luckhoff A, Strauer BE. Evidence of endothelial dysfunction in coronary resistance vessels in patients with angina pectoris and normal coronary angiograms. *Am J Cardiol.* 1991; 68:996–1003.
98. Quyyumi AA, Cannon RO III, Panza JA, Diodati JG, Epstein SE. Endothelial dysfunction in patients with chest pain and normal coronary arteries. *Circulation.* 1992; 86:1864–1871.
99. Egashira K, Inou T, Hirooka Y, Yamada A, Urabe Y, Takeshita A. Evidence of impaired endothelium-dependent coronary vasodilatation in patients with angina pectoris and normal coronary angiograms. *N Engl J Med.* 1993; 328:1659–1664.
100. Zeiher AM, Krause T, Schächinger V, Minners J, Moser E. Impaired endothelium-dependent vasodilation of coronary resistance vessels is associated with exercise-induced myocardial ischemia. *Circulation.* 1995; 91:2345–2352.
101. Gokce N, Keaney JF Jr, Hunter LM, Watkins MT, Menzoian JO, Vita JA. Risk stratification for postoperative cardiovascular events via noninvasive assessment of endothelial function: a prospective study. *Circulation.* 2002; 105:1567–1572.
102. Perticone F, Ceravolo R, Pujia A, Ventura G, Iacopino S, Scozzafava A, Ferraro A, Chello M, Mastroberardino P, Verdecchia P, Schillaci G. Prognostic significance of endothelial dysfunction in hypertensive patients. *Circulation.* 2001; 104:191–196.
103. Heitzer T, Schlinzig T, Krohn K, Meinertz T, Münzel T. Endothelial dysfunction, oxidative stress, and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *Circulation.* 2001; 104:2673–2678.
104. Wolf A, Zalpour C, Theilmeier G. Dietary L-arginine supplementation normalizes platelet aggregation in hypercholesterolemic in those patients with elevated ADMA levels, but not in humans. *J Am Coll Cardiol* 1997; 29:479–485.
105. Kubes P, Suzuki M, Granger DN. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:4651–4655.
106. Böger RH, Bode-Böger SM, Kienke S et al. Dietary L-arginine decreases myointimal cell proliferation and vascular monocyte accumulation in cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis* 1998; 136:67–77.
107. Garg UC, Hassid A. Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1989; 83:1774–1777.

108. Böger RH, Bode-Böger SM, Mügge A et al. Supplementation of hypercholesterolaemic rabbits with L-arginine reduces the vascular release of superoxide anions and restores NO production. *Atherosclerosis* 1995; 117:273–284.
109. Hogg N, Kalyanaraman B, Joseph J, Struck A, Parthasarathy S. Inhibition of low-density lipoprotein oxidation by nitric oxide. Potential role in atherogenesis. *FEBS Lett* 1993;334:170–174.
110. Kyoung-Ha Park and Woo Jung Park Endothelial Dysfunction: Clinical Implications in Cardiovascular Disease and Therapeutic Approaches *J Korean Med Sci*. 2015 Sep;30(9):1213-1225. English.
111. Oliver, S.G., Winson, M.K., Kell, D.B., & Baganz, F. Systematic functional analysis of the yeast genome. *Trends Biotechnol.* 16, 373-378 (1998).
112. Tweeddale, H., Notley-McRobb, L. & Ferenci, T. Effect of slow growth on metabolism of *Escherichia coli*, as revealed by global metabolite pool (“metabolome”) analysis. *J. Bacteriol.* 180. 5109-5116 (1998).
113. Coen M, Holmes E, Lindon JC, Nicholson JK (2008) NMR-based metabolic profiling and metabonomic approaches to problems in molecular toxicology. *Chem Res Toxicol* 21:9-27
114. Dunn WB, Broadhurst DI, Atherton HJ, Goodacre R, and Griffin JL. Systems level studies of mammalian metabolomes: the roles of mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Chem Soc Rev.* 2011, Jan;40(1):387-426
115. Ellis DI, Dunn WB, Griffin JL, Allwood JW, and Goodacre R. Metabolic fingerprinting as a diagnostic tool. *Pharmacogenomics.* 2007, Sep;8(9):1243-66
116. Kristal BS, Shurubor YI, Kaddurah-Daouk R, and Matson WR. High-performance liquid chromatography separations coupled with coulometric electrode array detectors: a unique approach to metabolomics. *Methods Mol Biol.* 2007; 358:159-74
117. Nicholson, J.K., Lindon, J.C & Holmes, E. “Metabonomics”: understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica* 29, 1181-1189 (1999).
118. Brindle JT, Antti H, Holmes E, Tranter G, Nicholson JK, Bethell HW, Clarke S, Schofield PM, McKilligin E, Mosedale DE, Grainger DJ. Nat Med. Rapid and noninvasive diagnosis of the presence and severity of coronary heart disease using <sup>1</sup>H-NMR-based metabonomics. 2002 Dec;8(12):1439-44. Epub 2002 Nov 25.
119. Kirschenlohr HL, Griffin JL, Clarke SC, Rhydwen R, Grace AA, Schofield PM, Brindle KM, Metcalfe JC. Proton NMR analysis of plasma is a weak predictor of coronary artery disease. *Nat Med.* 2006 Jun;12(6):705-10. Epub 2006 May 28.
120. Sabatine MS, Liu E, Morrow DA, Heller E, McCarroll R, Wiegand R, Berriz GF, Roth FP, Gerszten RE. Metabolomic identification of novel biomarkers of myocardial ischemia. *Circulation.* 2005 Dec 20;112(25):3868-75. Epub 2005 Dec 12.
121. Kinlay S, Ganz P. Role of endothelial dysfunction in coronary artery disease and implications for therapy. *Am J Cardiol* 80: (1997) 111-161
122. Bonetti PO, Lerman LO, Lerman A. Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23: (2003) 168-175
123. Gimbrone MA, Topper JN, Nagel T, Anderson KR, Garcia-Cardena G. Endothelial dysfunction, hemodynamic forces, and atherogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 902: (2000) 230-9; discussion 239-40

124. Brindle JT, Antti H, Holmes E, Tranter G, Nicholson JK, et al. Rapid and noninvasive diagnosis of the presence and severity of coronary heart disease using <sup>1</sup>H-NMR-based metabolomics. *Nat Med* 8: (2002) 1439-1444
125. Kirschenlohr HL, Griffin JL, Clarke SC, Rhydwen R, Grace AA, et al. Proton NMR analysis of plasma is a weak predictor of coronary artery disease. *Nat Med* 12: (2006) 705-710
126. Ludmer PL, Selwyn AP, Shook TL, Wayne RR, Mudge GH, et al. Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med* 315: (1986) 1046-1051
127. Deidda M, Piras C, Bassareo PP, Cadeddu Dessalvi C, Mercurio G. Metabolomics, a promising approach to translational research in cardiology. *IJC Metabolic & Endocrine* 9: (2015) 31-38
128. M. C. Deng\*, H. J. Eisen\*, M. R. Mehra, M. Billingham, C. C. Marboe, G. Berry, J. Kobashigawa, F. L. Johnson, R. C. Starling, S. Murali, D. F. Pauly, H. Baron, J. G. Wohlgenuth, R. N. Woodward, T. M. Klingler, D. Walther, P. G. Lal, S. Rosenberg, S. Hunt and for the CARGO Investigators. Noninvasive Discrimination of Rejection in Cardiac Allograft Recipients Using Gene Expression Profiling. *Am J Transplant*. 2006 Jan;6(1):150-60.
129. Aird WC. Mechanisms of endothelial cell heterogeneity in health and disease. *Circ Res* 98: (2006) 159-162
130. Li LX, Zhao CC, Ren Y, Tu YF, Lu JX, et al. Prevalence and clinical characteristics of carotid atherosclerosis in newly diagnosed patients with ketosis-onset diabetes: a cross-sectional study. *Cardiovasc Diabetol* 12: (2013) 18
131. Kanikarla-Marie P, Jain SK. Hyperketonemia (acetoacetate) upregulates NADPH oxidase 4 and elevates oxidative stress, ICAM-1, and monocyte adhesivity in endothelial cells. *Cell Physiol Biochem* 35: (2015) 364-373
132. Nomura A, Zhang M, Sakamoto T, Ishii Y, Morishima Y, et al. Anti-inflammatory activity of creatine supplementation in endothelial cells in vitro. *Br J Pharmacol* 139: (2003) 715-720
133. Sestili P, Martinelli C, Bravi G, Piccoli G, Curci R, et al. Creatine supplementation affords cytoprotection in oxidatively injured cultured mammalian cells via direct antioxidant activity. *Free Radic Biol Med* 40: (2006) 837-849
134. Rizza S, Copetti M, Rossi C, Cianfarani MA, Zucchelli M, et al. Metabolomics signature improves the prediction of cardiovascular events in elderly subjects. *Atherosclerosis* 232: (2014) 260-264
135. Mayr M, Chung YL, Mayr U, Yin X, Ly L, et al. Proteomic and metabolomic analyses of atherosclerotic vessels from apolipoprotein E-deficient mice reveal alterations in inflammation, oxidative stress, and energy metabolism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25: (2005) 2135-2142
136. Teul J, Rupérez FJ, Garcia A, Vaysse J, Balayssac S, et al. Improving metabolite knowledge in stable atherosclerosis patients by association and correlation of GC-MS and <sup>1</sup>H NMR fingerprints. *J Proteome Res* 8: (2009) 5580-5589
137. Cojocaru E, Filip N, Ungureanu C, Filip C, Danciu M. Effects of Valine and Leucine on Some Antioxidant Enzymes in Hypercholesterolemic Rats. *Health* 06: (2014) 2313-2321