

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II



DOTTORATO DI RICERCA IN

FISIOPATOLOGIA CLINICA E MEDICINA SPERIMENTALE

DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICHE TRASLAZIONALI

CICLO XXVI

Coordinatore Prof. GIANNI MARONE

TESI DI DOTTORATO

VALUTAZIONE DEL METABOLISMO DELL'OSSIDO NITRICO
NELLE ARTERIE MAMMARIE INTERNE UTILIZZATE PER LA
RIVASCOLARIZZAZIONE MIOCARDICA NELLE DONNE IN
POST-MENOPAUSA

Tutor

Candidato

Ch.mo Prof. CARLO VOSA

Dott. GIOVANNI BATTISTA PINNA

TRIENNIO ACCADEMICO 2011-2014

VALUTAZIONE DEL METABOLISMO DELL'OSSIDO NITRICO NELLE ARTERIE MAMMARIE INTERNE UTILIZZATE PER LA RIVASCOLARIZZAZIONE MIOCARDICA NELLE DONNE IN POST - MENOPAUSA.

Introduzione

Numerosi studi hanno dimostrato che le donne sottoposte a chirurgia coronarica (CABG) presentano una maggiore incidenza di occlusione dei grafts e di angina postoperatoria rispetto ai soggetti di sesso maschile, omogenei per età e comorbidità . I risultati basati sul sesso nella chirurgia di bypass coronarico (CABG) sono stati, infatti, al centro di numerose ricerche negli ultimi 2 decenni [1- 4] e il sesso femminile è stato identificato come un predittore indipendente ben definito di morbidità e mortalità dopo la chirurgia cardiaca, tale da essere incluso nella maggior parte dei punteggi di stratificazione del rischio [3, 5-7]. Tali risultati sono generalmente spiegati dall'età più avanzata delle pazienti di sesso femminile e dalle maggiori difficoltà tecniche derivanti da fattori anatomici sfavorevoli (dimensioni più piccole del corpo, arterie coronarie di minore diametro e malattia coronarica maggiormente diffusa). Non è chiaro, comunque, se anche le proprietà biologiche degli stessi grafts utilizzati per la chirurgia coronarica, che sono influenzate dall'età e dalla presenza della menopausa, possano influire sui risultati chirurgici [4]. E' stato

dimostrato, in una serie di studi recenti, che la pervietà a breve e a lungo termine dei grafts dipende principalmente dal metabolismo endoteliale, che è correlato essenzialmente alla produzione di ossido nitrico (NO) da parte dell'endotelio, con l'evidenza di una pervietà superiore dell'arteria mammaria interna (IMA) rispetto ad altri condotti utilizzati [8- 11] . L'invecchiamento determina una ridotta produzione di NO endoteliale e l'incremento della concentrazione dei perossidi endogeni e delle perossidasi, probabilmente esaltati dalla perdita dell'azione protettiva degli estrogeni [12-14]. L'NO controlla il tono vascolare a riposo, inibisce l'attivazione piastrinica, previene l'adesione leucocitaria all'endotelio, inibisce la migrazione e la proliferazione delle cellule muscolari lisce e previene le modificazioni ossidative del colesterolo LDL, che soprattutto nella sua forma ossidata è uno dei maggiori fattori responsabili dell'aterosclerosi. Inoltre, la secrezione di NO da parte dell'endotelio dei condotti utilizzati nella CABG, determina un uguale benefico effetto metabolico anche nel letto coronarico a valle. L'ossido nitrico endogeno è prodotto, in relazione alla quantità di RNA messaggero (mRNA) presente, dall'enzima ossido nitrico sintetasi (NOS) mediante la conversione della L-arginina in L-citrullina, in presenza di ossigeno e di NADPH-d. Sono stati identificati tre distinte forme di isomeri della NOS, prodotti da differenti geni, che presentano ampie caratteristiche di affinità, ma allo stesso tempo ognuno risulta caratterizzato da differenze strutturali che riflettono la loro specifica funzione. Gli isomeri della NOS sono:

n-NOS (anche denominata Tipo I), presente prevalente nel tessuto nervoso;

i-NOS (anche denominata Tipo II), Ca^{++} -indipendente, inducibile in un ampio spettro di cellule e tessuti dalle citochine o da altri agenti dell'inflammazione;

e-NOS (anche denominata Tipo III), calmodulina-dipendente e attivata dal Ca^{++} , presente nel tessuto endoteliale.

Nel sistema vascolare, la NOS derivante dall'endotelio (e-NOS) diffonde fuori dalle cellule endoteliali e arriva al sottostante strato di cellule muscolari lisce, determinando l'incremento della concentrazione del guanosin- monofosfato ciclico (cGMP), che attiva la protein-chinasi cGMP-dipendente, che determina il tono della parete vasale ed agisce sulla funzione endoteliale. Su tali presupposti, studi recenti hanno messo in risalto una possibile spiegazione sulla superiorità dell'arteria mammaria interna (AMI) in termine di pervietà, confrontata con altri condotti generalmente utilizzati (vena safena autologa e arteria radiale), attribuita ad una maggiore produzione di NO.

Il nostro studio è finalizzato alla dimostrazione che la presenza di e-NOS nella AMI di pazienti di sesso femminile (F) in menopausa può differire significativamente da quello di pazienti di sesso maschile (M). A questo scopo, la concentrazione di e-NOS-mRNA e della e-NOS è stata determinata in segmenti di AMI provenienti da un gruppo di pazienti di sesso femminile (F) in menopausa sottoposte a CABG confrontata con quella dei segmenti di AMI provenienti da un gruppo di pazienti di sesso maschile (M) di età e condizioni cliniche comparabili. La concentrazione di e-NOS-mRNA e della e-NOS nei segmenti di AMI provenienti da un terzo gruppo di pazienti più giovani ha rappresentato il gruppo di controllo (C).

Materiali e Metodi

Il protocollo di questo studio è stato approvato dal Comitato Etico della nostra Istituzione.

Il consenso informato è stato ottenuto da ogni paziente prima dell'arruolamento nello studio.

Popolazione di pazienti e Design dello studio.

Il disegno del nostro studio è non-randomizzato, controllato, in accordo alle linee guida riportate dallo STROBE (Strengthening the Reporting of Observational Study Epidemiology).

Lo studio ha previsto l'arruolamento di un totale di 60 pazienti sottoposti a CABG presso il nostro Istituto, dai quali sono stati prelevati segmenti di arteria mammaria interna (AMI). I pazienti sono stati considerati in base ai seguenti criteri d'inclusione: 20 pazienti di sesso femminile (F) in menopausa, 20 pazienti di sesso maschile (M), statisticamente omogenei per caratteristiche cliniche e demografiche, 20 pazienti di sesso maschile (C), di età inferiore ai 45 anni, che hanno costituito il gruppo di controllo. Gli uomini considerati sono stati selezionati all'interno di tutta la popolazione chirurgica che era in previsione di intervento di CABG. L'età variava tra i 52 e i 65 anni (media 62 ± 4) per le donne e per il gruppo maschile considerato, mentre variava tra i 35 e 44 anni (media 39 ± 3) per il gruppo di controllo. Nessuna donna stava assumendo farmaci ormonali, comprese le terapie di sostituzione. Le

definizioni per le pazienti in stato menopausale sono basate sul Sistema di Stadiazione per l'Invecchiamento Riproduttivo nelle Donne, linee guida approvate dal National Institutes of Health, dal North American Menopause Society e dall'American Society for Reproductive Medicine [15]. Tutte le donne in postmenopausa a cui si fa riferimento avevano 12 mesi o più di amenorrea.

Per evitare una qualsiasi interferenza sui risultati, a causa di un metabolismo dell'NO compromesso in maniera acuta o cronica, abbiamo utilizzato i seguenti criteri di esclusione: operazione cardiaca di emergenza; malattia vascolare periferica; diabete mellito; ipercolesterolemia; abitudine al fumo; consumo recente (10 giorni) di statine; aspirina o inibitori dell'enzima di conversione dell'angiotensina, che potrebbero influenzare la funzione endoteliale; elevata sensibilità della proteina C-reattiva (livelli superiori a 5 mg/mL come marcatore di risposta infiammatoria preoperatoria acuta o cronica); clearance della creatinina inferiore a 85 ml/min; malattia epatica attiva oppure presenza di aumentati valori degli enzimi epatici (alanina aminotransferasi, aspartato aminotransferasi). Al momento dell'operazione nessun paziente stava assumendo farmaci noti per influenzare il metabolismo dell'NO. Lo status socio-economico è stato valutato come un indicatore dello stile di vita e stimato secondo l'indice dei Quattro Fattori di Stato Sociale riportato da Hollingshead e arricchito da occupazione e livello di istruzione, come precedentemente riportato [16]. La scala di classificazione dell'angina Canadian Cardiovascular Society è stata utilizzata per la classificazione della gravità di angina. L'European System for Cardiac Operative Risk Evaluation (EuroSCORE) è stato utilizzato come modello

per il rischio operativo, e il punteggio SYNTAX (dalla sinergia tra Intervento coronarico percutaneo con Taxus e CardiacSurgerytrial) è stato utilizzato come strumento per indicare la complessità della malattia coronarica. I principali dati preoperatori dei pazienti sono illustrati nella tabella 1.

Le arterie mammarie interne (IMA) sono state isolate chirurgicamente con tecnica standard, peduncolate, con le vene e il tessuto circostante. È stata sempre utilizzata cauterizzazione a basso voltaggio (20 mV), ed i rami laterali sono stati chiusi con clips metalliche. I campioni sono stati ottenuti dalla regione di biforcazione (prima e dopo la biforcazione), immediatamente dopo l'isolamento chirurgico e posti in una soluzione salina sterile tamponata con fosfato (PBS). Il tessuto avventiziale è stato accuratamente rimosso e un sottile strato di cellule endoteliali, è stato raccolto raschiando la superficie endoluminale. Tutte le cellule raccolte sono state immediatamente congelate in azoto liquido e conservate a -80°C . L'espressione di eNOS-mRNA è stata analizzata mediante reazione polimerasica a catena (PCR) e reazione polimerasica a catena quantitativa inversa in tempo reale (qRT - PCR). Il livello della proteina e-NOS è stato valutato mediante Western-blot. Per le valutazioni dinamiche, i segmenti di IMA sono stati tagliati in due anelli misuranti 3 mm di lunghezza dopo che tutto il tessuto avventiziale circostante era stato accuratamente rimosso con dissezione al microscopio, per evitare gli effetti dell'innervazione adrenergica.

Estrazione RNA , PCR e Real-Time qRT –PCR

La **reazione a catena della polimerasi** comunemente nota con la sigla **PCR**, è una tecnica di biologia molecolare che consente la moltiplicazione (*amplificazione*) di frammenti di acidi nucleici dei quali si conoscano le sequenze nucleotidiche iniziali e terminali. La PCR ricostruisce in vitro uno specifico passaggio della duplicazione cellulare rappresentato dalla sintesi di un segmento di DNA "completo" (a doppia elica) a partire da un filamento a singola elica. Il filamento mancante viene ricostruito a partire da una serie di nucleotidi che vengono disposti nella corretta sequenza, complementare a quella del DNA interessato.

Questo processo viene svolto in natura da enzimi chiamati DNA-polimerasi che sono in grado di sintetizzare progressivamente un nuovo filamento di DNA nelle seguenti condizioni:

- Disponibilità di nucleotidi da polimerizzare, sotto forma di desossiribonucleosidi trifosfati (dNTP);
- il DNA deve essere in forma denaturata, ovvero le due eliche che compongono i filamenti devono essere già separate;
- il segmento da ricostruire può essere soltanto *prolungato*, ovvero non è possibile sintetizzare un nuovo filamento a partire da zero;
- vanno rispettate opportune condizioni di temperatura, di pH, ecc.

È possibile quindi ricostruire le condizioni che portano alla formazione dei nuovi segmenti di DNA, ponendo in soluzione:

- una quantità, anche minima, del segmento di DNA che si desidera riprodurre;
- una quantità opportuna di nucleotidi liberi per costituire i nuovi filamenti;
- opportuni "inneschi", detti primer, costituiti da brevi sequenze di DNA (oligonucleotidi) complementari agli estremi 3' dei due filamenti del segmento da riprodurre;
- una DNA polimerasi termo-resistente
- un Buffer che serve a mantenere il pH stabile (tampono) e necessario per costituire l'ambiente adatto alla reazione;
- altri elementi di supporto (ad es. ioni magnesio) indispensabili per il corretto funzionamento della DNA polimerasi;
- acqua per portare a volume la soluzione.

Per avviare la reazione della polimerasi (fase di prolungamento del filamento a partire dal *primer* 5') è prima necessario provvedere alla separazione dei filamenti del DNA (fase di denaturazione), quindi alla creazione del legame tra i *primer* e le regioni loro complementari dei filamenti di DNA denaturati (fase di annealing). Questo processo risulta però incompatibile con la DNA polimerasi umana, che viene distrutta alle temperature necessarie alla denaturazione (96-99 °C).

Tale inconveniente viene risolto facendo ricorso alle polimerasi appartenenti a organismi termofili che non sono inattivate dalle alte temperature, come la Taq polimerasi proveniente da un batterio termofilo. Ciò consente di realizzare più cicli di PCR in sequenza, in ciascuno dei quali viene duplicato anche il DNA sintetizzato nelle fasi precedenti, ottenendo una reazione a catena che consente una moltiplicazione estremamente rapida del materiale genetico di interesse

La **PCR real-time**, denominata anche **PCR quantitativa** o **PCR quantitativa in tempo reale** (rtq-PCR), è un metodo di amplificazione (reazione a catena delle polimerasi o PCR) e quantificazione simultanea del DNA.

Il DNA è amplificato da reazioni a catena della DNA polimerasi e quantificato dopo ogni turno di amplificazione. I metodi comuni di quantificazione includono l'uso delle colorazioni fluorescenti che intercalano con il DNA a doppio-filamento e gli oligonucleotidi modificati del DNA che sono fluorescenti una volta ibridati con un DNA. Spesso la PCR real-time è combinata con la PCR Retro-trascrizionale (RT-PCR) per quantificare i livelli di espressione di specifici RNA: la retro-trascrizione (o trascrizione inversa) produce del DNA complementare a singolo filamento detto cDNA mantenendo inalterati i rapporti relativi di concentrazione delle diverse specie degli RNA. In questo modo è possibile, misurare l'espressione relativa di un gene ad un tempo particolare, o in una cellula o in un tipo particolare di tessuto. La combinazione di queste due tecniche è spesso denominata RT-PCR quantitativa.

Nelle cellule endoteliali del nostro studio, l'RNA cellulare totale è stato isolato in TRIZOL reagente (Life Technology, Carlsbad, CA), seguendo le istruzioni del produttore. L'RNA totale è stato purificato mediante l'RNeasy Mini RNA Minikit (Quiagen, Milano, Italia) con una procedura automatizzata sul QIAcube (Quiagen), la concentrazione è stata determinata mediante Nano Drop ND -2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), e la qualità è stata determinata misurando l'assorbanza a 260 nm e 280 nm.

L'RNA totale è stato miscelato con sonde di RNA antisenso, complementari alla sequenza di interesse e i filamenti complementari sono stati ibridati per avere l'RNA a doppio filamento. Questa tecnica ha mappato le estremità 5' e 3' degli introni delle regioni del gene trascritte. La miscela è stata poi esposta a ribonucleasi che attaccava specificamente solo l'RNA a singolo filamento, ma non aveva attività sull'RNA a doppio filamento.

Le sequenze di primer e le sonde TaqMan utilizzate sono state progettate secondo le seguenti sequenze: forward primer : GGC AAG GTC TTC TGC AAT ATC TAC A (25 nucleotidi), reverse primer : GGT ACC GCA GTG GGT CCA TGA (22 nucleotidi), e sonda CTT CAT GAT CAG CCT CGA CCG GTA CTG (27 nucleotidi). Sei - carbossi - fluoresceina e 6 - carbossi - tetrametil- rodamina sono state usate come reporter e quencher, rispettivamente. La reazione è stata visualizzata mediante analisi TaqMan Universal PCR su ABI Prism 7700 Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA). I valori ottenuti con gli rRNA-primer 18S

sono serviti come controllo interno. I risultati sono stati espressi come unità arbitrarie relative ai controlli (100 %).

Western Blots

Il **western blot** o **immunofissazione** è una tecnica biochimica che permette di identificare una determinata proteina in una miscela di proteine, mediante il riconoscimento da parte di anticorpi specifici. In genere, per facilitare il riconoscimento, la miscela di proteine viene prima separata in base alle loro dimensioni (o peso molecolare) utilizzando un gel di poliacrilammide; successivamente le proteine vengono trasferite su di un supporto, che comunemente è una membrana di nitrocellulosa, e quindi si procede al riconoscimento vero e proprio della proteina mediante l'utilizzo di un anticorpo specifico.

Il Western Blots si articola in varie fasi:

- *Preparazione del tessuto*

I campioni possono essere presi da tessuti interi o da colture cellulari. I tessuti solidi sono prima meccanicamente frantumati mediante frullatori oppure con omogeneizzatori. Detergenti, sali, e soluzioni tampone possono essere impiegate per incrementare la lisi cellulare e solubilizzare proteine. Inibitori di proteasi e fosfatasi sono spesso aggiunte per prevenire la digestione dei campioni

da parte dei loro stessi enzimi. La preparazione dei tessuti è spesso fatta a temperature basse per evitarne la degradazione.

- *Elettroforesi su gel*

Le proteine del campione sono separate usando l'elettroforesi in gel. La separazione di proteine può avvenire per punto isoelettrico (pI), peso molecolare, carica elettrica, oppure con una combinazione di questi fattori. La natura della separazione dipende dal trattamento del campione e dalla natura del gel. Questo metodo è il più utilizzato per l'identificazione di una proteina. Il tipo più comune di elettroforesi in gel impiega gel di poliacrilammide (Elettroforesi su gel di poliacrilammide) e tamponi caricati con laurilsolfato di sodio (SDS). Le proteine campionate si ricoprono di cariche negative SDS e si muovono verso l'elettrodo positivo attraverso il gel. Quando la tensione elettrica è applicata lungo il gel, le proteine migrano attraverso esso a velocità differenti in funzione della loro dimensione.

- *Transfer*

Per rendere accessibile le proteine alla rilevazione dell'anticorpo, esse si muovono dal gel alla membrana di Nitrocellulosa. Il metodo principale per il trasferimento è chiamato "electroblotting" ed impiega la corrente elettrica per trasferire le proteine dal gel alla membrana. Il legame alla proteina è basato sulle interazioni idrofobiche.

- ***Bloccaggio***

Dopo aver scelto la membrana, in relazione alla capacità di legare la proteina, è necessario prevenire le interazioni tra la membrana stessa e l'anticorpo utilizzato per rilevare la proteina bersaglio. Il bloccaggio di legami non specifici è raggiunto ponendo la membrana in una soluzione diluita, in genere latte polvere (TBS), con una piccola percentuale di detergente Triton X-100. La proteina nella soluzione diluita attecchisce alla membrana in tutti i punti dove le proteine bersaglio non hanno attecchito.

- ***Rilevamento***

Durante il processo di rilevamento la membrana diventa il provino per la proteina d'interesse con un anticorpo modificato che è collegato a un enzima messaggero; quando esposto ad un appropriato substrato questo enzima crea una reazione colorimetrica e produce un colore.

- ***Analisi***

Dopo che i provini non legati sono lavati via, il western blot è pronto per la rilevazione di provini che sono etichettati e legati alla proteina di interesse.

Esistono vari metodi di rilevazione:

Rilevazione colorimetrica

La rilevazione colorimetrica dipende dall'incubazione del western blot con un substrato che reagisce con l'enzima *reporter* (come perossidasi) legato all'anticorpo secondario. Questo converte il colorante solubile in forma insolubile di differenti colori che precipitano in prossimità dell'enzima e conseguentemente colora la membrana.

Rilevazione con chemiluminescenza

I metodi con rilevazione chemiluminescente dipendono dall'incubazione del western blot con un substrato che emette luce quando esposto al *reporter* dell'anticorpo secondario. La luce è rilevata dalla pellicola fotografica. L'immagine analizzata con densitometria, rileva l'ammontare di proteina colorante e quantifica i risultati in termini di densità ottica.

Rilevazione radioattiva

Label radioattive non richiedono substrati enzimatici, permettendo il posizionamento di pellicole a raggi X direttamente contro il western blot, che sviluppa con l'esposizione, zone scure corrispondenti alla proteina d'interesse. È una tecnica dispendiosa e pericolosa.

Rilevazione fluorescente

Il provino fluorescente è eccitato dalla luce e l'emissione dell'eccitazione è rilevata da fotosensori che catturano un'immagine digitale del western blot; ciò permette

ulteriori analisi come peso molecolare e un'analisi quantitativa del western blot. La rilevazione fluorescente è considerata uno dei migliori metodi per quantificare, anche se meno sensibile della chemiluminescenza.

Nel nostro studio la metodica del Western Blots è stata applicata nel seguente

modo:

Detriti cellulari sono stati rimossi mediante centrifugazione a 16.000 g per 10 minuti. Le cellule sono state incubate in un tampone di lisi (soluzione salina tamponata con fosfato 10 %, NP-40 10 %, sodio desossicolato 10 %, sodio dodecil solfato 10 %, e la proteasi inibitrice contenente aprotinina, leupeptina e vanadato di sodio). Gli estratti sono stati sottoposti a elettroforesi con sodio dodecil solfatopoliacrilamide, elettroforesi su gel e trasferiti su nitrocellulosa. L'e-NOS è stato visualizzato utilizzando anticorpi specifici (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL) anti-topo HRP-coniugato, e chemiluminescenza standard (Amersham International, Little Chalfont, UK) su pellicola autoradiografica. Attraverso il Western Blot, questo anticorpo riconosce una proteina di circa 135 kDa rappresentante e-NOS proveniente da cellule endoteliali umane corrispondente a residui S (1179) di e-NOS umani. Tutte le immagini sono state poi digitalizzate, ed è stata eseguita l'analisi densitometrica. Per avvalorare l'espressione di e-NOS come standard interno, abbiamo analizzato l'espressione di β -actina utilizzando anticorpi specifici (Anti-Beta Actin, Abcam, Cambridge, UK). I risultati sono espressi come unità arbitrarie relative ai controlli (100 %).

Camere d'organo

I vasi sono stati sospesi in camere d'organo (37 °C), contenenti 20 ml di soluzione salina tamponata con fosfato, tra due staffe di tungsteno per la misura della tensione isometrica e ventilati con una miscela di O₂/CO₂ (95% /5%). Tutti gli esperimenti sono stati fatti in presenza di 10 mmol/L di indometacina per inibire la sintesi dei prostanoïdi. Ogni vaso è stato poi progressivamente allungato con incrementi di tensione di 1-g alla sua tensione ottimale di riposo, che ha prodotto una risposta massima a 80 mmol/L KCl. Studi di rilassamento sono stati eseguiti dopo che i vasi sono stati contratti con 0.1 mmol/L di 1 mmol/L di U46619 affinché la contrazione fosse dal 50 % al 60 % della massima contrazione KCl-indotta. La vasodistensione è stata segnalata come riduzione percentuale della tensione indotta da U46619. La risposta dell'IMA all'acetilcolina è stata valutata in presenza (alla concentrazione di 300 mmol/L) o assenza dell'inibitore eNOS-metilestere-G-nitro-L -arginina (L-NAME).

Analisi dei dati

Il gruppo di controllo ha fornito il necessario punto di riferimento per l'analisi dei dati. I risultati sono stati quantificati in unità arbitrarie riferite al valore normale ottenuto per il gruppo di controllo, stimato arbitrariamente come 100 unità e la valutazione comparativa tra i due gruppi di studio è stata riportata come differenza percentuale. I risultati sono riportati come media ± SD per numero di esperimenti.

Il test T-Student è stato utilizzato per determinare la significatività delle differenze tra le medie dei gruppi di studio e di ciascuno di questi con il gruppo di controllo. Un valore di $p < 0.05$ è stato considerato significativo. Le curve dose-risposta per l'acetilcolina e L-NAME sono state confrontate tra i gruppi mediante analisi bidirezionale della varianza per misure ripetute. L'analisi statistica è stata effettuata da SPSS versione 16.1 per Windows (SPSS, Chicago, IL).

Risultati

Analisi quantitativa RT-PCR

L'espressione del gene e-NOS nei tessuti endoteliali dell'IMA è stata determinata mediante la tecnica qRT - PCR. All'analisi densitometrica, la banda di mRNA per e-NOS nelle cellule endoteliali nell'IMA appariva diminuita in entrambi i gruppi di uomini e donne, rispettivamente, 25.2% e 37.4 %, rispetto a quella nella corsia del gruppo di controllo. Tuttavia, riferita al gruppo di controllo (100 %), la banda di mRNA di e-NOS in IMA nelle cellule endoteliali provenienti dalle donne in postmenopausa è apparsa significativamente diminuita rispetto a quella proveniente da uomini invecchiati ($62.6 \% \pm 4.8 \%$ contro il $74.8 \% \pm 5.3 \%$, $p < 0.001$). Di conseguenza, il gene e-NOS è stato espresso ad un livello inferiore in entrambe le cellule endoteliali di IMA dei pazienti anziani (donne e uomini), ma il livello di espressione nelle donne era significativamente inferiore rispetto agli uomini invecchiati. La Figura 1 mostra un esempio di analisi mRNAeNOSqRT - PCR (la

banda 18S RNA ribosomiale è lo standard) e confronta gli istogrammi dei risultati densitometrici ottenuti da ciascun gruppo di studio.

Analisi Western Blot dell'Ossido Nitrico Sintasi di derivazione endoteliale

I livelli della proteina e-NOS nei tessuti endoteliali delle IMA sono stati valutati mediante analisi Western Blot. È stata rilevata una singola banda di circa 135 kDa. Le bande immunoreattive a 135kD della proteina e-NOS, ottenute dai tessuti endoteliali dell'IMA, sono diminuite in entrambi i gruppi di uomini e di donne, rispettivamente del 34.5 % e del 44.2 % rispetto a quelle ottenute nel gruppo di controllo. Riferita al gruppo di controllo (100 %), la valutazione comparativa tra i gruppi di pazienti anziani (donne e uomini) ha confermato minori bande proteiche immunoreattive e-NOS nei tessuti endoteliali dell'IMA prelevata nelle donne in menopausa ($55.8 \% \pm 4.6 \%$ contro $65.5 \% \pm 5.2 \%$, $p < 0.001$). Quindi, il livello di proteina e-NOS nelle cellule endoteliali di IMA era più basso nei pazienti anziani rispetto ai controlli, ma era significativamente più basso nelle donne in postmenopausa rispetto al gruppo di uomini statisticamente omogeneo. La Figura 2 mostra le bande proteiche immunoreattive e-NOS a 135 kD nella corsia dei pazienti di controllo e nella corsia dei pazienti anziani e confronta gli istogrammi dei risultati densitometrici ottenuti da ciascun gruppo di studio.

Dinamica Vascolare

Le contrazioni dell'IMA a 80 mmol/L KCl erano comparabili in entrambi i gruppi di pazienti anziani (8.3 ± 0.6 g vs 8.1 ± 0.8 g; $p = 0.4$), ed entrambi erano maggiori rispetto al gruppo di controllo (4.9 ± 0.5 , $p < 0.001$). La massima contrazione dell'IMA, in risposta al L-NAME, inibitore specifico dell'enzima NOS, era significativamente più bassa nelle donne in postmenopausa ($17 \% \pm 4 \%$) sia rispetto agli uomini anziani del gruppo di studio ($20 \% \pm 4 \%$, $p = 0.02$) sia rispetto al gruppo di controllo ($26 \% \pm 6 \%$, $p < 0,001$) e si verificava a minor concentrazione di L-NAME nelle donne in postmenopausa, rispetto agli uomini anziani o ai controlli. Il massimo rilassamento dell'IMA in risposta alla somministrazione di acetilcolina, farmaco che determina una significativa produzione endoteliale di NO, era significativamente più basso nelle donne in postmenopausa ($21 \% \pm 5 \%$) che negli uomini anziani ($35 \% \pm 4 \%$; $p < 0.001$) o nei controlli ($59 \% \pm 8 \%$, $p < 0,001$) e si verificava a maggiore concentrazione di acetilcolina nelle donne in postmenopausa rispetto agli uomini anziani o ai controlli (Fig. 3). Il rilassamento dell'IMA, grazie all'acetilcolina in presenza di 300 mmol/L di L-NAME, è stato inibito nel 82% delle donne in post-menopausa, nel $83 \pm 8 \%$ degli uomini anziani, e nel $92 \pm 4 \%$ nei controlli. Tutti questi dati suggeriscono un'alterata produzione di e-NOS nell'IMA prelevata da una donna in menopausa rispetto agli uomini o ai controlli statisticamente omogenei.

Commento

È largamente dimostrato che l'IMA ha peculiari caratteristiche biologiche, tali da rendere questa arteria un condotto quasi ideale per la chirurgia di rivascularizzazione miocardica. Studi biologici, morfologici e angiografici hanno dimostrato chiaramente come l'IMA sia in qualche modo protetta dallo sviluppo di aterosclerosi, anche in pazienti con grave malattia coronarica e fornisce migliori risultati angiografici rispetto ad altri condotti utilizzati per il bypass aortocoronarico [17]. Queste differenze, analizzate da studi recenti, hanno sottolineato le diverse proprietà biologiche dell'IMA rispetto ad altri condotti alternativi. L'IMA sembra rilasciare una maggiore quantità di NO, sostanza che è nota per avere un ruolo chiave nell'omeostasi endoteliale, inibendo lo sviluppo di aterosclerosi e malattia del trapianto [18-21]. La produzione maggiore di NO da parte degli innesti di IMA, rilasciato nel flusso sanguigno, potrebbe inoltre, esercitare gli stessi effetti benefici sui vasi coronarici riceventi [22]. Questi risultati forniscono un valido supporto biologico per le osservazioni di Cosgrove e coll [23], il quale ha per primo riferito che un innesto di bypass con IMA può modificare macroscopicamente (rallentando o impedendo) il processo aterosclerotico dell'arteria ricevente. Al contrario, è ben noto che la morbilità precoce e a lungo termine e la mortalità dopo interventi coronarici sono notevolmente più elevate nelle donne rispetto agli uomini. Questa disparità tra i sessi aumenta ampiamente per le donne anziane dopo la menopausa. Oltre alla maggior comorbilità, alla maggiore estensione della malattia coronarica, alla minore

dimensione del vaso coronarico e alla minor superficie corporea, le proprietà biologiche dei condotti arteriosi e/o venosi stessi, utilizzati per la chirurgia coronarica, possono essere determinanti per i peggiori risultati chirurgici registrati nelle donne anziane. Gli studi molecolari e clinici che hanno valutato gli effetti degli ormoni steroidei hanno evidenziato differenze ormonali associate alla formazione di lesioni ateromasiche sesso-specifiche. In particolare è stato a lungo teorizzato che gli estrogeni esercitino un effetto protettivo sullo sviluppo di aterosclerosi, ritardando la comparsa di una malattia sintomatica. Dopo la menopausa, l'incidenza della malattia coronarica è drammaticamente aumentata, probabilmente a causa della perdita degli effetti protettivi degli estrogeni. Il meccanismo con cui l'esaurimento degli estrogeni accelera la senescenza endoteliale è stato un interessante oggetto di dibattito negli ultimi anni. Un certo numero di studi pubblicati di recente, forniscono evidenze che gli estrogeni ritardano la senescenza cellulare attraverso un meccanismo NO-dipendente: la perdita degli effetti protettivi degli estrogeni porta alla diminuita biodisponibilità endoteliale dell'NO e di conseguenza ad un maggior stress ossidativo, che è largamente accettato come il più importante potenziale candidato responsabile della senescenza [4-13]. Il presente studio ha esaminato se nei pazienti sottoposti a CABG l'attivazione di e-NOS può essere diversa nell'IMA di pazienti di sesso femminile in postmenopausa comparata con una popolazione di controllo di soggetti giovani e confrontati con un gruppo di maschi della stessa età. Diversamente dagli studi precedenti che hanno riportato la misurazione della produzione di NO come marker di ridotto metabolismo dell'NO endoteliale sia diretta (metodica

elettrochimica) sia indiretta (attraverso nitrati o nitriti), questo studio ha valutato il livello di espressione del gene di e-NOS mediante mRNA di e-NOS e dei livelli proteici di e-NOS, che rappresentano le due più importanti fasi di espressione del gene e-NOS [13].

I risultati in vitro sono stati supportati anche da valutazioni funzionali mirate a valutare la produzione di e-NOS dall'endotelio dell'IMA [24]. I nostri risultati hanno confermato che sia l'mRNA per e-NOS sia le proteine e-NOS sono significativamente ridotte nelle cellule endoteliali dell'IMA sia in donne in menopausa sia in uomini statisticamente omogenei rispetto ad un gruppo di controllo di soggetti giovani. Tuttavia, la donna in menopausa ha mostrato un minor grado di espressione endoteliale dell' mRNA per e-NOS e dell'enzima. Inoltre, la valutazione funzionale in ambo gli stati basale e stimolato era coerente con la ridotta produzione di e-NOS nell'endotelio dell'IMA prelevato da donne in menopausa. Presi insieme, questi dati indicano ragionevolmente un meccanismo genomico-dipendente nella ridotta sintesi di e-NOS sia in uomini più anziani, come conseguenza della senescenza, sia nelle donne in menopausa, come conseguenza della senescenza e della menopausa. Sulla base di questi risultati, vi è un'alterazione endoteliale definita (metabolica e funzionale) nelle IMA provenienti da donne in postmenopausa correlata alla diminuzione dei livelli di espressione di e-NOS e all'alterata produzione di NO endoteliale. I nostri risultati, quindi, sembrano sostenere l'ipotesi che la disfunzione endoteliale mediata da NO, e quindi le proprietà biologiche vascolari dei condotti stessi, dovrebbero essere coinvolte anche nei peggiori risultati chirurgici

nella donna più anziana dopo CABG. Questo studio ha diversi limiti che meritano menzione. In primo luogo, il numero di pazienti è piccolo, dovuto principalmente alle procedure complesse e costose per qRT-PCR e Western blot e le valutazioni in camera d'organo. In secondo luogo, ci si può chiedere se i risultati di questo studio sono applicabili alla pratica corrente dato che il sesso e la menopausa, non sono fattori di rischio modificabili per CABG. Riteniamo che il riconoscimento dei profili di rischio sesso-specifici, e la comprensione del loro impatto sui risultati postoperatori, possa essere utile per una pianificazione sesso-specifica della strategia chirurgica, in modo da migliorare la morbilità e la mortalità. In conclusione, il ruolo del sesso e dell'età sono questioni complesse che influenzano la sopravvivenza dopo la chirurgia coronarica. Questo studio contribuisce alla comprensione dell'importanza del metabolismo endoteliale dell'NO e fornisce la prima dimostrazione di una alterata espressione di e-NOS-mRNA e ridotti livelli di e-NOS nelle cellule endoteliali dell'IMA provenienti da donne in menopausa sottoposte a CABG. La ridotta bioattività dell'NO come modulatore principale della funzione endoteliale, a causa dei bassi livelli di e-NOS, si traduce in una compromissione del metabolismo endoteliale, che potrebbe contribuire ad un peggior risultato chirurgico in questi pazienti.

Bibliografia

1. O'Connor GT, Morton JR, Diehl MJ, et al. Differences between men and women in hospital mortality associated with coronary artery bypass graft surgery. The Northern New England Cardiovascular Disease Study Group. *Circulation* 1993;88:2104 –10.
2. Guru V, Fremes SE, Tu JV. Time-related mortality for women after coronary artery bypass graft surgery: a population-based study. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2004;127: 1158 – 65.
3. Blankstein R, Ward RP, Arnsdorf M, Jones B, Lou YB, Pine M. Female gender is an independent predictor of operative mortality after coronary artery bypass graft surgery: contemporary analysis of 31 Midwestern hospitals. *Circulation* 2005;112(Suppl):I323–7.
4. Blasberg JD, Schwartz GS, Balaram SK. The role of gender in coronary surgery. *Eur J Cardiothorac Surg* 2011;40:715–21.
5. Guru V, Fremes SE, Austin PC, Blackstone EH, Tu JV. Gender differences in outcomes after hospital discharge from coronary artery bypass grafting. *Circulation* 2006;113:507–16.

6. Mehta RH, Honeycutt E, Shaw LK, et al. Clinical and angiographic correlates of short- and long-term mortality in patients undergoing coronary artery bypass grafting. *Am J Cardiol* 2007; 100:1538–42.
7. Vaccarino V, Lin ZQ, Kasl SV, et al. Sex differences in health status after coronary artery bypass surgery. *Circulation* 2003;108:2642–7.
8. Gaudino M, Toesca A, Maggiano N, Pragliola C, Possati G. Localization of nitric oxide synthase type III in the internal thoracic and radial arteries and the great saphenous vein: a comparative immunohistochemical study. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2003;125:1510–5.
9. Stähli BE, Greutert H, Mei S, et al. Absence of histamine induced nitric oxide release in the human radial artery: implications for vasospasm of coronary artery bypass vessels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;290:1182–9.
10. He GW, Fan L, Grove KL, Furnary A, Yang Q. Expression and function of endothelial nitric oxide synthase messenger RNA and protein are higher in internal mammary than in radial arteries. *Ann Thorac Surg* 2011;92:845–50.
11. Kitamura S. Physiological and metabolic effects of grafts in coronary artery bypass surgery. *Circ J* 2011;75:766–72.
12. Politarchou C, Papadimitriou E. Antioxidants inhibit human endothelial cell functions through down regulation of endothelial nitric oxide synthetase. *Eur J Pharmacol* 2005;510:31–8.

13. Hayashi T, Matsui-Hirai H, Miyazaki-Akita A, et al. Endothelial cellular senescence is inhibited by nitric oxide: implications in atherosclerosis associated with menopause and diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:17018 –23.
14. Quyyumi AA, Dakak N, Andrews NP, et al. Cannon RO III. Nitric oxide activity in the human coronary circulation. *J Clin Invest* 1995;95:1747–55.
15. Avis NE, Crawford S, Stellato R, Longcope L. Longitudinal study of hormone levels and depression among women transitioning through menopause. *Climacteric* 2001;4:243–9.
16. Mannacio VA, De Amicis V, Di Tommaso L, Stassano P, Iorio F, Vosa C. The association of acute aortic dissection with *Helicobacter pylori* virulence specific serotypes: distinct diversity of systemic antibodies to CagA and VacA genotypes. *Surgery* 2011;149:240–6.
17. Loop FD. Internal-thoracic-artery grafts. Biologically better coronary arteries. *N Engl J Med* 1996;334:263–5.
18. Radomski MW, Palmer RMJ, Moncada S. The role of nitric oxide and cGMP in platelet adhesion to the vascular endothelium. *Biochem Biophys Res Commun* 1987;148:1482–9.
19. Kubes P, Kurose I, Granger DN. NO donors prevent integrin- induced leukocyte adhesion but not P-selectin dependent rolling in postischemic venules. *Am J Physiol* 1994;267:931–7.

20. Garg UC, Hassid A. Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cGMP inhibit citogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1989;83: 1774–7.
21. Laufs U, La Fata V, Plutzky J, Liao JK. Upregulation of Endothelial oxide nitric synthase by HMG CoA reductase inhibitors. *Circulation* 1998;97:1129 –35.
22. Tarr FI, Sasvári M, Tarr M, Rácz R. Evidence of nitric oxide produced by the internal mammary artery graft in venous drainage of the recipient coronary artery. *Ann Thorac Surg* 2005;80:1728 –31.
23. Cosgrove DM, Loop FD, Saunders CL. Should coronary arteries with less than fifty percent stenosis be bypassed? *J Thorac Cardiovasc Surg* 1981;82:520 –30.
24. Hayashi T, Fukuto JM, Ignarro LJ, Chaudhuri G. Basal releases of nitric oxide from aortic rings is greater in female rabbits than male rabbits: implications for atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:11259–63.

Tabella 1 . Principali caratteristiche cliniche e demografiche dei pazienti

Caratteristiche	donne in postmenopausa (n = 20)	uomini (n = 20)	controlli (n = 20)
Età , anni	62 ± 4	62 ± 4	39 ± 3
Maschio / femmina (m/f)	0 / 20	20 / 0	11/9
Ipertensione , m / f	0 / 6	6 / 0	2/3
Storia di familiarità di CAD , m / f	0 / 12	12 / 0	4/4
Precedente MI , m / f	0 / 5	5 / 0	2 / 0
Classe CCS III - IV , m / f	0 / 15	15 / 0	3/3
Punteggio SYNTAX	28 ± 8	27 ± 7	24 ± 7
LogisticEuroSCORE	2.8 ± 1.4	2.4 ± 1.2	3.1 ± 1.3
Status socio-economico	77 ± 14	74 ± 15	61 ± 18

Lo status socioeconomico è valutato secondo l'indice di Hollingshead : 15-120 (basso = 15-45 ; media = 46-80 ; alta = 81-120) .
 CAD = malattia coronarica; CCS= Canadian Cardiovascular Society; EuroSCORE= Sistema europeo di cardiocirurgia di Valutazione del Rischio Operativo; IM= infarto del miocardio; SYNTAX= sinergia tra Intervento coronarico percutaneo con Taxus e Cardiocirurgia.

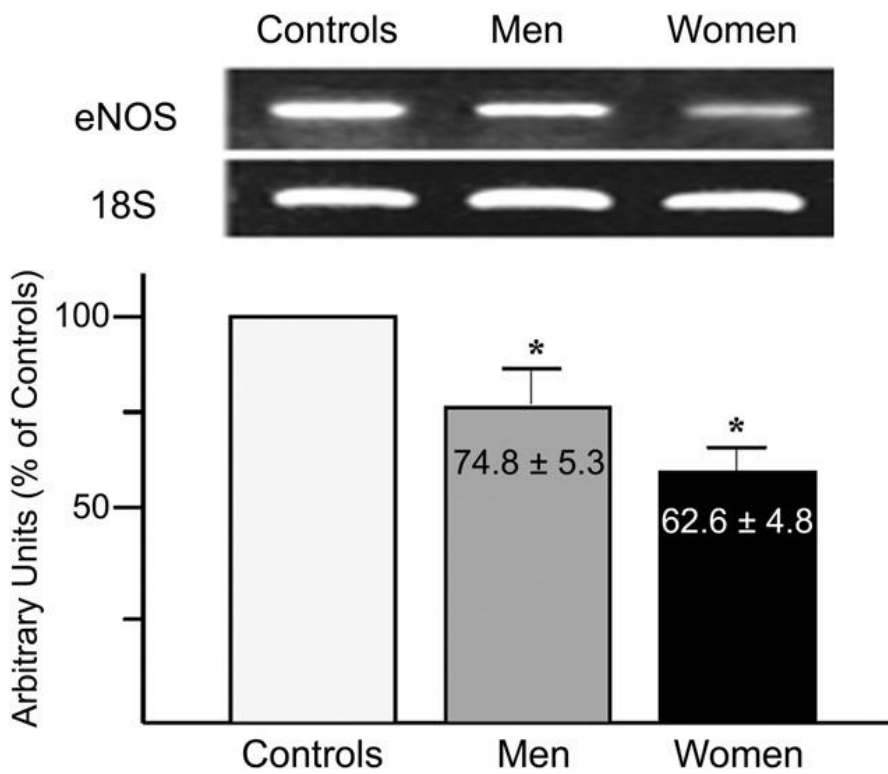


Fig 1. Rappresentazione dei livelli di m-RNA per l'ossido nitrico sintetasi di derivazione endoteliale (mRNA-eNOS) nel tessuto endoteliale dell'arteria mammaria interna (vedi sezione Materiali e Metodi per dettagli). I risultati sono riportati come unità arbitrarie rispetto ai controlli (100%). * $p < 0.001$ donne in postmenopausa versus uomini anziani .

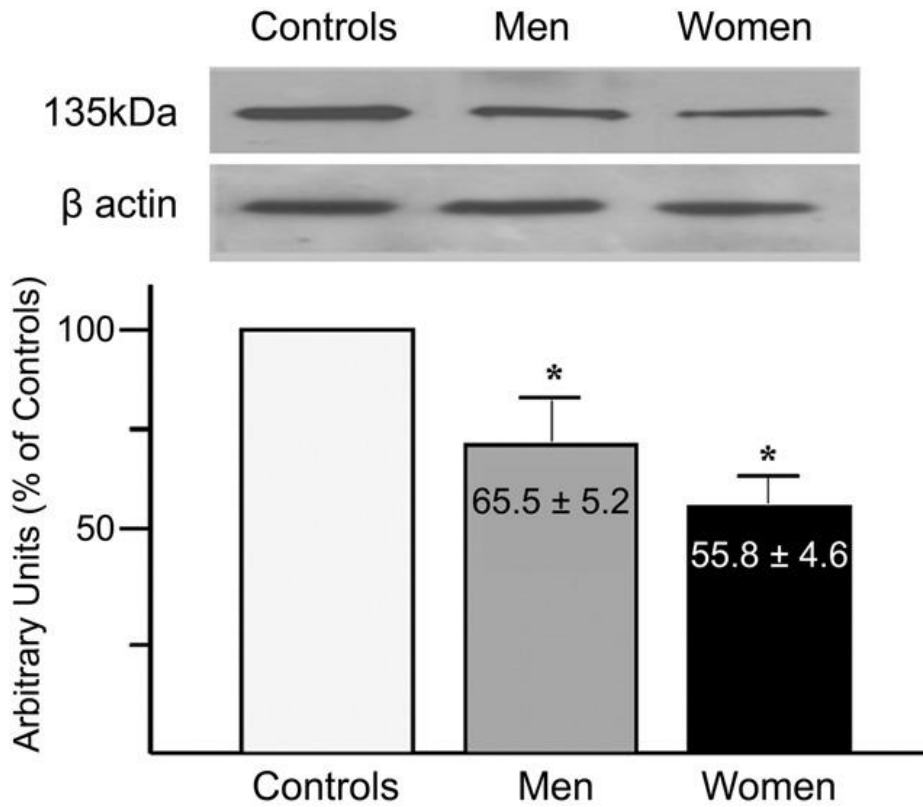


Fig 2. Rappresentazione dei livelli di NOS mediante analisi Western blot nel tessuto endoteliale dell'arteria mammaria. I risultati sono riportati come unità arbitrarie rispetto ai controlli (100%). * $p < 0.001$ donne in postmenopausa versus uomini anziani.

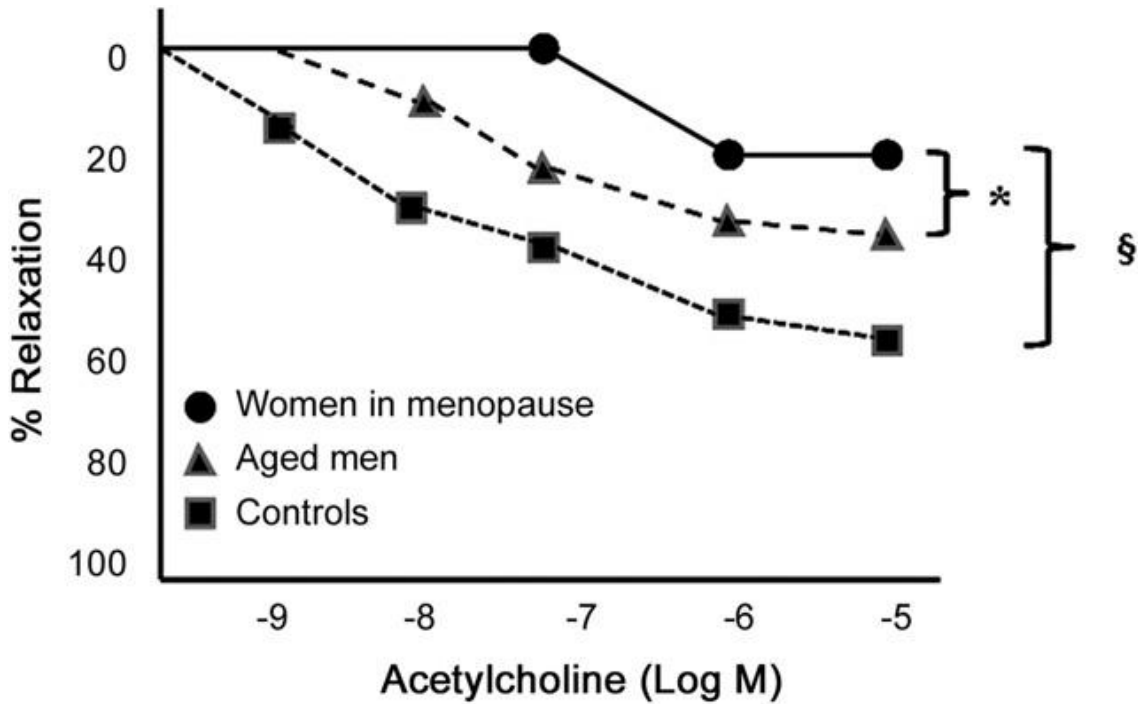


Fig 3. Rilasciamento endotelio-dipendente allo stimolo con acetilcolina di segmento di arteria mammaria interna, sospesi in camera d'organo e stimolati alla contrazione con concentrazioni da 0.1 mmol/L a 1 mmol/L di U46619. Il rilasciamento è determinato in risposta alle concentrazioni indicate di acetilcolina. I dati rappresentano la riduzione percentuale di contrazione (media \pm DS).

* $p < 0.08$ donne in menopausa (cerchio) versus uomini anziani (triangoli);

§ $p < 0.02$ donne in menopausa (cerchio) versus controlli (quadrati) .