

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA

Dottorato di Ricerca in Fisiopatologia dell'Insufficienza Renale

Ciclo XXV

**ASPETTI CELLULARI DELLA TOSSICITA' RENALE
DA MEZZI DI CONTRASTO IODATI**

**Coordinatore:
Chiar.mo Prof. Carlo Buzio**

**Tutor:
Chiar.mo Prof. Enrico Fiaccadori**

Dottorando: Dott. Michele Meschi

*« Forse io sono un'innata ottimista,
ma penso che ci sia sempre qualcosa che ci salva »*

RITA LEVI-MONTALCINI, 1909-2012

INDICE

PRIMA PARTE

1. INTRODUZIONE

- 1.1. Mezzi di contrasto iodato e potenziale nefrotossicità (pag. 6)
- 1.2. Nefropatia da mezzi di contrasto iodati: definizione, incidenza, *outcome* (pag. 7)
- 1.3. Fattori di rischio (pag. 10)

2. TOSSICITA' RENALE DA MEZZI DI CONTRASTO IODATI: DISFUNZIONE ENDOTELIALE E ALTERATA FUNZIONE VASCOLARE (pag. 14)

3. ASPETTI CELLULARI DELLA TOSSICITA' TUBULARE DA MEZZI DI CONTRASTO IODATI

- 3.1. Premessa (pag. 17)
- 3.2. Danno diretto sulle cellule tubulari (pag. 18)
- 3.3. Stress ossidativo, Ca^{++} *signaling* e apoptosi (pag. 21)
- 3.4. Alterata funzionalità neutrofilica (pag. 24)

4. ASPETTI CELLULARI DELLA TOSSICITA' ENDOTELIALE DA MEZZI DI CONTRASTO IODATI (pag. 25)

SECONDA PARTE

1. STUDIO SUGLI EFFETTI DEI MEZZI DI CONTRASTO ISO-OSMOLARI SU MORFOLOGIA E FUNZIONE ENDOTELIALE

- 1.1. Obiettivo dello studio (pag. 28)
- 1.2. Materiali e metodi (pag. 28)
- 1.3. Risultati (pag. 32)

2. DISCUSSIONE (pag. 36)

3. CONCLUSIONI (pag. 41)

TABELLE E FIGURE (pag. 43)

BIBLIOGRAFIA (pag. 54)

RINGRAZIAMENTI (pag. 66)

PRIMA PARTE

1. INTRODUZIONE

1.1. Mezzi di contrasto iodati e potenziale nefrotossicità

I **mezzi di contrasto** (*CM, contrast media*) attualmente disponibili in ambito tomografico o di interventistica cardiovascolare sono essenzialmente derivati benzenici tri-iodati, costituiti allo scopo di coniugare la radio-opacità dello iodio molecolare (I_2) o in forma ionica (I^-) con complessi dotati di proprietà fisico-chimiche (osmolarità, viscosità, forza ionica) a ridotta tossicità per cellule e tessuti [1]. Nello specifico, tuttavia, gli stessi mantengono comunque la capacità di indurre un potenziale danno renale, come si evince dalla relativa letteratura di consenso [2,3].

Storicamente, la nefrotossicità dei primi CM si correlava essenzialmente all'osmolalità e alla forza ionica di questi ultimi; nella forma ionica, inoltre, l'anello benzenico risultava legato ad almeno un gruppo carbossilico, di per sé chemiotossico. L'innovazione tecnologica costituita dai CM non ionici, privi di esso e recanti anzi numerosi gruppi idrossilici, ha consentito un impiego più sicuro della classe, in ragione di un minor legame con le proteine plasmatiche e di una netta riduzione in termini di osmolarità [4]. È però abbastanza recente il rilievo di come il vantaggio si riduca nettamente per i CM non ionici a struttura dimerica, caratterizzati da maggior viscosità e pertanto in grado di aggravare l'ipossia renale per motivi non solo emoreologici [5].

La **Tabella 1** illustra in dettaglio le caratteristiche dei principali CM in uso.

1.2. Nefropatia da mezzi di contrasto iodati: definizione, incidenza, *outcome*

Classicamente la **nefropatia da contrasto** (*RCIN*, *Radiocontrast-Induced Nephropathy*) viene definita come deterioramento acuto della funzione renale dopo somministrazione intravascolare di CM iodati, in assenza di cause ulteriori [6]. Da un punto di vista strettamente laboratoristico, la diagnosi viene posta per un incremento dei valori di creatininemia di almeno 0,5 mg/dL (o del 25%) rispetto a quelli basali, a distanza di 48-72 ore dalla procedura diagnostica o interventistica che abbia richiesto impiego del mezzo di contrasto stesso [7]. L'*Acute Kidney Injury Network*, istituito al fine di studiare le possibilità di miglioramento degli *outcomes* associati alle varie forme di insufficienza renale acuta, da tempo ha espresso l'auspicio della standardizzazione dei criteri diagnostici per tutti i casi di **danno renale acuto** (*AKI*, *Acute Kidney Injury*), proponendone come *conditio sine qua non* l'improvvisa (ovvero entro le 48 ore) riduzione di funzione renale, evidenziata da un incremento nei valori sierici di creatinina di almeno 0,3 mg/dL, o di almeno il 50% rispetto a quelli basali, ovvero l'evidenza di oligoanuria (*output* urinario < 0,5 mL/kg/h per almeno 6 ore consecutive) [8]. Non esiste, tuttavia, univoco consenso nel ricondurre anche i parametri di riferimento della RCIN entro quelli

di AKI, dal momento che solitamente il danno da CM iodato comporta un picco di creatininemia al terzo-quinto giorno dopo esposizione alla sostanza e solo raramente si manifesta col rilievo di oligoanuria, salvo in pazienti con compromissione della funzione renale già netta [9]. Ciò nonostante, nella letteratura recente la definizione “**Radiocontrast-Induced Acute Kidney Injury**” (RCI-AKI) tende a prevalere rispetto alla classica RCIN, pur non essendo state verificate su larga scala le possibili implicazioni cliniche in termini di epidemiologia e di *outcome* che potrebbero derivare dall’impiego delle differenti definizioni [10].

La RCIN rimane la **terza entità nosologica** correlata ad AKI acquisito in ambito ospedaliero, dopo il danno da ipoperfusione d’organo e l’impiego di farmaci nefrotossici quali gli antinfiammatori non steroidei [11]. L’incidenza di RCI-AKI appare significativamente maggiore in caso di somministrazione di contrasto per via endoarteriosa (dal 10-20% nei pazienti a rischio moderato al 25-70% in quelli a rischio elevato, contro lo 0,15-2,30% nella popolazione generale) rispetto alla via endovenosa (attorno al 5%) [12].

La probabilità di trattamento sostitutivo della funzione renale dopo evenienza di RCI-AKI è strettamente legata alle comorbilità che affliggono il singolo paziente, ma è ragionevole ipotizzare che essa possa variare da meno dell’1% dei casi per la totalità dei pazienti sottoposti a interventi cardiaci percutanei, fino ad oltre il 10% per quelli già affetti da malattia renale cronica, che sviluppino ulteriore riduzione di funzione renale dopo angiografia

coronarica [13]. In altri termini, se da un lato la probabilità che una RCI-AKI richieda un trattamento sostitutivo in acuto può aumentare dallo 0,04% al 48% per velocità di filtrazione glomerulare (GFR, *Glomerular Filtration Rate*) basale ridotta da 50 a 10 mL/min/1.73 m², dall'altro il 13-50% dei pazienti sottoposti a procedure depurative a seguito di RCI-AKI rischia di protrarre le procedure stesse in via definitiva [14].

Come in generale per tutti i pazienti nefropatici, anche per quelli affetti da RCI-AKI si è valutata l'incidenza di **eventi cardiovascolari associati** (*MACE, Major Adverse Cardiac Effects*): da uno studio su oltre 16.000 pazienti ospedalizzati e sottoposti a procedure di angiografia coronarica emerge chiaramente come quelli interessati da RCI-AKI sviluppino un rischio 5,5 volte maggiore di complicanze cliniche e di morte per MACE rispetto ai controlli, anche dopo correzione dei dati per eventuali patologie coesistenti [15].

Pure per la maggioranza dei casi, ovvero quelli a decorso clinico favorevole, cioè completamente asintomatici, con ripristino dei valori di creatininemia abituali in 1-3 settimane e senza necessità di trattamento sostitutivo, si è registrato un significativo incremento di mortalità a 1 e a 5 anni; l'evidenza diviene, ovviamente, ancora più manifesta per i casi a prognosi nefrologica sfavorevole, che abbiano richiesto un transitorio impiego di procedure depurative [16].

Alla luce di quanto esposto, pur non essendo chiara la relazione fisiopatologica tra nefropatia da contrasto iodato,

morbilità e mortalità cardiovascolare, oggi si tende a definire con relativa sicurezza RCI-AKI un fattore predittivo indipendente di mortalità a lungo termine. È suggestivo ipotizzare che il processo patogenetico alla base della RCI-AKI possa interferire coi meccanismi proaterogeni cardiovascolari, anche se non vi sono studi definitivi al riguardo [17].

1.3. Fattori di rischio

Dal momento che gli eventi patogenetici alla base della RCI-AKI non sono tuttora completamente chiariti, appare problematica l'identificazione di precisi fattori di rischio per la malattia, intendendo per essi condizioni cliniche o nosologiche passibili di intervento terapeutico. Si ritiene, invece, che il termine **markers** sia più utile per l'identificazione del paziente che, in ragione delle proprie caratteristiche contingenti, sia più suscettibile di deterioramento acuto della funzione renale in tale contesto [18].

In un terzo dei casi i *markers* in questione corrispondono a condizioni realmente non modificabili; la precoce ricognizione dei rimanenti, invece, è premessa all'impiego di protocolli di profilassi che, pur in assenza di evidenze incontrovertibili, dimostrerebbero una variabile riduzione di incidenza di RCI-AKI in corso di studi prospettici e retrospettivi.

Tra i *markers* di rischio, la **riduzione di funzione renale preesistente alla somministrazione di contrasto iodato** riveste un significato predominante, soprattutto in caso di valori basali di GFR < 60 mL/min/1,73 m², ovvero di nefropatia cronica agli stadi

3, 4 e 5 secondo la *National Kidney Foundation*. Da una recente analisi su oltre 20.000 pazienti sottoposti ad angiografia coronarica emerge un'incidenza di RCI-AKI significativamente maggiore nei **soggetti anziani**, in particolare di sesso femminile, che di regola presentano un significativo deterioramento di GFR anche a fronte di valori di creatininemia apparentemente normali, per la loro massa muscolare totale relativamente ridotta [19].

Da vari studi volti a identificare, tra le alterazioni del profilo glicolipidico e proteico (dislipidemia, iperuricemia, sindrome metabolica), quelle in grado di costituire reali marcatori di RCI-AKI si evince come il **diabete mellito** non costituisca in sé un rischio aggiuntivo, e che possa diventarlo in caso di conseguente alterazione della funzione renale. Per contro, una valutazione prospettica suggerirebbe un lieve ma significativo incremento di incidenza di RCI-AKI in soggetti diabetici non nefropatici, e addirittura in quelli che presentano unicamente alterata glicemia a digiuno, rispetto alla popolazione generale [20]. Ciò concorda con l'ipotesi fisiopatologica secondo cui allo sviluppo di RCI-AKI contribuirebbe la cosiddetta disfunzione endoteliale, verosimilmente comune a tutte le condizioni disglicemiche e in grado di comportare, a livello del glomerulo renale, una ridotta disponibilità di sostanze vasodilatatrici quali ossido nitrico e prostaglandine, sintetizzate proprio a livello dell'endotelio [21]. Si favorirebbe in tal modo l'ischemia renale associata alla somministrazione di contrasto iodato, cui si correla l'azione dei radicali liberi dell'ossigeno, capaci di indurre la formazione di

specie reattive su enzimi e strutture proteiche di membrana, attraverso meccanismi di nitrosilazione e di ossidazione [22].

Anche pazienti con **insufficienza cardiaca a bassa gittata** e conseguente **ridotta perfusione renale** sono a maggior rischio di RCI-AKI: tale condizione, infatti, potrebbe aggravare l'ipossia-ischemia d'organo mediata dai CM, che di per sé, dopo un'iniziale vasodilatazione, determinano prolungata vasocostrizione nella zona midollare del nefrone, già di base meno perfusa rispetto alla corticale [23]. Si troverebbero nelle stesse condizioni soggetti con **deplezione della volemia efficace**, ipoperfusi e/o ipotesici, e analoga tendenza potrebbe essere talora ascrivibile a sepsi, ad epatopatie decorrenti con disprotidemia e ipoalbuminemia significative, oppure a condizioni di grave perdita proteica di qualunque origine [24].

Pur essendo il danno renale da CM verosimilmente dose-dipendente, non è stato identificato con chiarezza un **volume di contrasto minimo** al di sotto del quale il rischio di RCI-AKI possa ridursi significativamente, in particolare in presenza di preesistente decremento di funzione d'organo in corso di malattia diabetica [25].

La **via di somministrazione** intrarteriosa (cardiologia interventistica) si associa a un maggior rischio di RCI-AKI rispetto alla via endovenosa (tomografia standard), soprattutto quando le indagini vengono ripetute in successione a un intervallo di tempo inferiore alle 72 ore [26].

In caso di impiego di mezzi di contrasto è altresì mandatoria non solo la proscrizione di **farmaci classicamente nefrotossici**, ma anche quella degli antinfiammatori non steroidei, in grado di ridurre la GFR per effetto antiprostaglandinico di inibizione della vasodilatazione intrarenale [27].

Terapie protratte con **agenti interferenti con l'asse renina-angiotensina** (ACE-inibitori, sartani) concorrono all'incremento di incidenza di RCI-AKI particolarmente nei soggetti affetti da nefropatia cronica, in ragione della vasodilatazione arteriolare efferente insita nel proprio meccanismo d'azione e della conseguente relativa riduzione di pressione all'interno del glomerulo. Alcune evidenze inducono a ritenere che, assieme alla terapia diuretica, ACE-inibitori e sartani debbano essere sospesi il giorno precedente e il giorno stesso della procedura diagnostico-interventistica con CM, e ripresi a 2 giorni da essa, compatibilmente con le condizioni cliniche e le indicazioni generali contingenti. Lavori più recenti smentirebbero, tuttavia, l'efficacia di tale *withdrawal* e documenterebbero addirittura il ruolo protettivo di alcune molecole di tale classe, perlomeno nel modello animale [28].

2. TOSSICITA' RENALE DA MEZZI DI CONTRASTO IODATI: DISFUNZIONE ENDOTELIALE E ALTERATA FUNZIONE VASCOLARE

I meccanismi fisiopatologici che sottendono allo sviluppo di RCI-AKI non sono completamente noti. Tra i diversi possibili fattori coinvolti, sembra svolgere un ruolo di primaria importanza l'alterazione dell'emodinamica renale indotta dalla somministrazione di CM; questi ultimi, infatti, determinerebbero un'iniziale vasodilatazione, seguita da vasocostrizione prolungata prevalente nella zona midollare, fisiologicamente meno perfusa rispetto alla corticale. Ne conseguirebbe un danno ipossico, a costituire un meccanismo cruciale della patogenesi del danno renale [29]. Oltre che su generici fenomeni di ipersensibilità e di trombogenicità, la ricerca sta focalizzandosi sulle dirette alterazioni a carico delle cellule tubulari, in cui giocano un ruolo decisivo gli aspetti legati all'iperosmolarità e all'iperviscosità degli stessi CM, nonché il cosiddetto stress ossidativo [30].

La maggioranza degli studi sperimentali *in vitro* condotti sull'argomento ha previsto l'impiego di CM testati a livello periarteriolare anziché intraluminale, conseguendone una sostanziale impossibilità di valutazione degli effetti diretti sull'endotelio in presenza di flusso [31]. Costituiscono tuttavia un'importante eccezione i rilievi di Sendeski et al. [32] su **vasa recta discendenti** (DVR, *descending vasa recta*) isolati e sottoposti a perfusione, emblematico esempio di

microvascolarizzazione deputata all'apporto di ossigeno alla midollare renale. L'endotelio dei DVR esterni, vasi di diametro non superiore a 15 μm originati dalle arteriole efferenti dei nefroni iuxtamidollari, è circondato da **periciti** che, capaci di contrazione attiva in risposta a mediatori quali angiotensina II ed endoteline, regolano direttamente le resistenze intravascolari; all'applicazione sperimentale di CM in sede luminale consegue la vasocostrizione dei DVR ed è ipotizzabile che, in dipendenza del calibro di questi ultimi, si realizzi *in vivo* la riduzione del flusso ematico in essi [32]. Ciò sarebbe favorito, per ragioni emoreologiche, anche dal **deficit di plasticità eritrocitaria** che si è osservata sempre in corso di somministrazione di CM [32].

La **disfunzione endoteliale** potrebbe essere letta anche nel senso di **ridotta produzione di mediatori della vasodilatazione**, come ossido nitrico e prostaglandine, sintetizzati proprio a livello dell'endotelio e carenti nei DVR profondi perfusi con CM [33]. Una ridotta disponibilità di tali sostanze endogene ad azione vasodilatatrice favorirebbe l'ischemia renale associata alla somministrazione di CM. Alla disfunzione endoteliale e al danno da ri-perfusione postischemica si correlerebbe l'azione dei radicali liberi dell'ossigeno, in grado di ridurre la disponibilità di ossido nitrico e di indurre la formazione di specie reattive capaci di alterare strutture proteiche di membrana ed enzimi, attraverso processi ossidativi e di nitrosilazione [34].

Si è osservato infine che i livelli di **endoteline** aumentano, sia *in vitro* che *in vivo*, dopo impiego di CM, verosimilmente per

diretto danno endoteliale; la vasocostrizione da esse mediata può ulteriormente aggravare l'ipossia midollare, come indirettamente suggerito dai potenziali effetti protettivi di bloccanti del recettore ET_A nel ratto [35].

Le interazioni descritte, avvallate dalle evidenze sperimentali della letteratura più recente, risultano alla base della patogenesi della RCI-AKI per il ruolo rivestito dall'endotelio nel mantenimento di un'adeguata perfusione renale e per il progressivo incremento di concentrazione del fluido intratubulare e nei DVR all'interno della midollare [36]. Sebbene il flusso ematico midollare costituisca soltanto il 20% di quello renale totale, la perfusione del peculiare distretto anatomico risulta critica per i meccanismi di concentrazione dell'organo e per la regolazione del riassorbimento di sodio [37]. Inoltre l'inibizione dell'ossido nitrico sintetasi riduce il flusso ematico renale totale del 35%, con paralleli riduzione di GFR ed incremento delle resistenze intravascolari dell'organo, strettamente correlabili ai livelli endogeni dei componenti del sistema renina-angiotensina [38].

Di recente un ulteriore studio del gruppo di Sendeski [39] ha confermato che l'esposizione a CM di DVR umani e murini, isolati e perfusi, risulta in una significativa vasocostrizione, mediata dai periciti, in grado di ridurre il calibro del lume a livelli inferiori al diametro eritrocitario. Tale modificazione delle resistenze microvascolari esaspera quella fisiologicamente indotta dall'angiotensina II, mentre viene ragionevolmente controllata dalla contemporanea presenza di **adrenomedullina**, peptide

dalle note caratteristiche endotelio-protettive [39]. Nel modello, infatti, il sistema endoteliale verrebbe danneggiato non soltanto in senso funzionale, ma anche nella propria integrità fisica di barriera. La compromissione dell'endotelio documentabile istocitologicamente sembrerebbe peculiare dei DVR midollari, a differenza di quanto avviene a livello corticale (ove flussi maggiori e bidirezionali, in ambiente costituzionalmente iso-osmotico costituirebbero un fattore protettivo) e potrebbe rendere ragione della non completa reversibilità del quadro clinico di RCI-AKI osservata in una percentuale variabile di casi [40].

3. ASPETTI CELLULARI DELLA TOSSICITA' TUBULARE DA MEZZI DI CONTRASTO IODATI

3.1. Premessa

Oltre ad avere come *target* principale le cellule endoteliali, i CM sono responsabili di un **danno citotossico diretto** a livello del tubulo renale, che si esplica attraverso l'alterazione dell'integrità delle membrane plasmatiche e mitocondriali [41]. Tale ipotesi è supportata dall'osservazione sperimentale di processi di vacuolizzazione ed apoptosi a carico delle cellule tubulari, pur non essendo chiarita del tutto la correlazione temporale tra tali processi e l'alterazione della funzione renale eventualmente evidenziatasi [42]. Il danno diretto acquisisce un ruolo indipendente rispetto a quello derivante dall'azione di fattori immunologici, quali il complemento e l'immunità cellulare da esso

attivata, comunque in grado di indurre un'alterazione mediata dall'infiltrazione flogistica di macrofagi e polimorfonucleati, con ulteriore liberazione di radicali liberi prodotti in loco. Apparirebbe infine decaduta l'ipotesi dell'ostruzione tubulare come possibile meccanismo alla base della riduzione acuta di funzione renale, in quanto esperimenti di micropuntura condotti su conigli anestetizzati affetti da RCI-AKI hanno evidenziato la riduzione del coefficiente di ultrafiltrazione glomerulare in assenza di incremento della pressione intratubulare [43].

3.2. Danno diretto sulle cellule tubulari

Evidenze *in vitro* consistono, ad esempio, in alterazioni del trasporto dello ione- potassio, riduzione del contenuto di adenosin-trifosfato (ATP) e in generale turbe dei processi respiratori a carico di cellule del tubulo prossimale di coniglio, dopo somministrazione di soluzioni di CM, senza chiara correlazione con il grado di osmolalità di queste ultime, ma con esacerbazione in caso di ipossia [44]. Le caratteristiche osmotiche del CM rivestirebbero un ruolo secondario, accanto a cationi di meglumina presenti nella preparazione, in associazione al **contenuto di iodio**, la cui tossicità cellulare intrinseca è riconosciuta [45]. L'elevato potenziale di ossidoriduzione dello iodio libero, non complessato (I_2), o della sua forma polarizzata in acqua (H_2OI^+), è notoriamente in grado di rendere inefficaci alcune delle reazioni elettrofiliche della catena respiratoria nei batteri e di determinarne perdita di integrità di membrana cellulare

per modificazioni di gruppi aminoacidici (tirosina, istidina, cisteina) [45]. In frammenti di tessuto renale murino trattato con CM sono stati isolati ulteriori indicatori diretti o indiretti di danno o di ridotto metabolismo cellulare a carico del tubulo, quali aumentati livelli di N-acetil- β -D-glucosaminidasi, lattico-deidrogenasi e δ -glutamyl-transferasi, oppure inefficacia della risposta regolatoria del volume cellulare alle variazioni di osmolalit  dell'ambiente in soluzione [46]. Altre modificazioni riguarderebbero la perdita di proteine legate alla membrana cellulare, tra cui la pompa Na^+/K^+ -ATPasi e la caveolina, e l'aumentata suscettibilit  della membrana stessa all'azione della fosfolipasi A_2 [47].

In modelli colturali di tubulo prossimale, ma anche distale, alla somministrazione di CM correla l'incremento netto di **vacuolizzazione intracitoplasmatica**. La formazione di vacuoli   spesso letta come reazione aspecifica all'azione di varie sostanze esogene ed   paradigmaticamente descritta nella nefrosi osmotica [48]. Sebbene si sia speculato che essa possa rappresentare nient'altro che la pinocitosi del CM da parte delle cellule tubulari, microanalisi a raggi X non avrebbero individuato la presenza di iodio all'interno dei vacuoli [48]. I dati attualmente disponibili possono addirittura apparire controversi, se si considera come la vacuolizzazione non veda un chiaro rapporto di causa-effetto col grado di osmolalit  del mezzo e non venga prevenuta dalla co-infusione di sostanze antiossidanti come la N-acetilcisteina, risultandone pertanto un'incorrelazione con i processi di stress ossidativo [49]. La formazione di vacuoli

andrebbe piuttosto interpretata come un sostanziale sovraccarico di meccanismi riparatori di membrana [49].

Dal momento che la quantificazione della genesi vacuolare in microscopia elettronica descriverebbe un incremento per i CM di nuova generazione, tra cui quelli a bassa osmolalità (LOCM, *Low Osmolar Contrast Media*) e soprattutto quelli iso-osmolari (IOCM, *Iso-Osmolar Contrast Media*), si specula che un ruolo molto importante nelle alterazioni funzionali dei tubuli, sia *in vitro* che *in vivo*, sia svolto piuttosto dall'**iperviscosità**, caratteristica peculiare solo di alcuni tipi di agenti contrastografici [50] (**Tabella 1**). Se da un lato tutti i CM subiscono un processo di concentrazione a livello tubulare, dall'altro quelli ad elevata viscosità comportano maggiori pressioni intratubulari, incremento della viscosità urinaria e minore efficacia di eliminazione [51]. La conseguente prolungata esposizione al CM può aggravare la tossicità intrinseca dello iodio, risultando in un'aumentata espressione dei biomarcatori di danno renale. Infine, l'iperviscosità potrebbe condurre ad incremento dello stress meccanico sulle cellule epiteliali (*tubular stretching*), con conseguente produzione di superossido in zone sensibili del nefrone, tra cui il tratto ascendente dell'ansa di Henle, sino alla disregolazione del fisiologico *cross-talk* tra questo settore e i DVR, giungendo così al peggioramento dell'ipoperfusione e dell'ipossia midollari [52].

3.3. Stress ossidativo, Ca⁺⁺ signaling e apoptosi

Altre evidenze sperimentali suggerirebbero la criticità dei fenomeni di **stress ossidativo** nella genesi della tossicità renale da CM: da tale ipotesi deriverebbe l'impiego nella pratica clinica di sostanze antiossidanti (N-acetilcisteina, sodio bicarbonato, acido ascorbico) per la prevenzione della RCI-AKI in pazienti a rischio sottoposti a procedure diagnostiche o interventistiche con CM iodato [53]. Nonostante, come sopra riportato, una parte della letteratura tenda a disgiungere il danno cellulare diretto dai fenomeni di ossidazione (prova ne è il mancato incremento a livello tubulare di malondialdeide dopo esposizione a CM) [54], alcuni rilievi *in vitro* deporrebbero per la formazione diretta, sempre a livello tubulare, di **specie reattive dell'ossigeno** (ROS, *Reactive Oxygen Species*), quali anione superossido, radicale idrossilico e perossido di idrogeno, che partecipano a processi parafisiologici quali fagocitosi e cascata dell'acido arachidonico [55]. L'esposizione dell'acido desossiribonucleico (DNA) alle ROS comporta invariabilmente idrossilazione delle basi ed interruzione dei filamenti, conducendo la cellula a fenomeni di apoptosi o di necrosi. Inoltre, aumentati livelli di 15-isoprostano F2t, uno specifico marcatore di stress ossidativo, sono stati osservati dopo indagini contrastografiche in pazienti con insufficienza renale. Infine, anche ipotizzando unicamente il ruolo dell'ischemia diretta nella RCI-AKI, non è possibile prescindere dal ruolo che le ROS possono giocare nel cosiddetto danno da ri-perfusione o da ri-

alcalinizzazione, quest'ultimo indotto da una rapida correzione del pH tissutale alterato [55].

Le interazioni tra **Ca⁺⁺ extracellulare**, fondamentale nella facilitazione dei meccanismi di contatto intercellulari, e la tossicità *in vitro* dei CM sono state testate su *monolayers* di cellule renali canine (MDCKC, *Madin-Darby Canine Kidney Cells*) cresciuti su supporti permeabili [56]. Le concentrazioni di CM ionici (diatrizoato, ioxaglato) ridurrebbero il Ca⁺⁺ extracellulare, a differenza di LOCM e IOCM non ionici quali ioexolo e iodixanolo [57]; la relazione tra il dato e la possibile citotossicità da rottura delle giunzioni intercellulari *in vivo* è tuttavia ancora da dimostrare con chiarezza. Modificazioni del *signaling* del **Ca⁺⁺ citosolico** sarebbero per il momento evidenti in corso di somministrazione di CM paramagnetici per tecniche di risonanza, ma non del tutto chiarite durante RCI-AKI, pur essendo ipotizzabili reciproche influenze tra esse e l'attivazione di canali ionici in grado di causare alterazioni di membrana, su base osmotica e non [58].

In generale, i processi di **apoptosi** o morte cellulare programmata, conservati in senso evuzionistico come meccanismi di eliminazione delle cellule alterate, sono classificabili come estrinseci od intrinseci [59]. Il *pathway* estrinseco si attiva mediante il reclutamento di *death receptors* sulla superficie cellulare; l'intrinseco è invece innescato da vari stress intra- ed extra-cellulari, i cui segnali convergono prevalentemente a livello mitocondriale. In quest'ultimo *setting*, le ROS sono in grado di attivare specifiche chinasi da stress, tra cui

le MAPKs (*Mitogen-Activated Protein Kinases*), che includono almeno tre sottoforme: ERK1/2 (*Extracellular signal-Regulated Kinases*), JNK1/2 (*c-Jun N-terminal Kinases*) e p38MAPK. Mentre la cascata di ERK1/2 è innescata da stimoli mitogenici e di sopravvivenza cellulare, quelle di JNK1/2 e di p38MAPK sono primitivamente attivate da stress cellulari che includono appunto ROS, ma anche radiazioni ultraviolette, ipossia e citochine proinfiammatorie [59]. In ultima analisi, il *pathway* apoptotico intrinseco si traduce in disregolazione della membrana mitocondriale e del reticolo endoplasmatico; dunque l'accumulo di Ca^{++} e l'attivazione di calpaina a livello subcellulare possono indurre rotture lisosomiali, liberazione di caspasi, rilascio di catepsina sino a danno diffuso del DNA. La disponibilità dello ione calcio funge in aggiunta da *link* con il *pathway* apoptotico estrinseco, in ragione delle modifiche indotte a livello di superficie cellulare [59].

Nei modelli sperimentali di RCI-AKI, il citocromo c può essere usato come marcatore del coinvolgimento degli organuli subcellulari in corso di danno esogeno: in circostanze normali, esso è stabilmente associato con la membrana mitocondriale interna, e solo in caso di danno raggiunge il citosol, ove contribuisce all'attivazione delle caspasi [60]. Nel lavoro di Zager et al. è mostrato chiaramente come il rilievo di concentrazioni elevate di citocromo c nel sovranatante cellulare sia associabile alla somministrazione di CM, in assenza di aumentato rilascio di lattico-deidrogenasi [47].

Analizzando campioni di urina ottenuti da pazienti con diagnosi di RCI-AKI, un ulteriore studio ha verificato, mediante tecniche di *western blotting* e di immunistochemica, che i CM possono indurre apoptosi delle cellule tubulari renali. Inoltre, in elementi in coltura, il CM ha causato un incremento di ROS dose-dipendente, con chiara attivazione dei sistemi apoptotici legati a JNK1/2 e a p38MAPK [61].

Ancor più di recente, un *work* sperimentale è stato disegnato al fine di determinare nel ratto il ruolo di ROS, mieloperossidasi e ossido nitrico nella patogenesi di un modello di nefropatia indotta da iodolo, oltre alle modificazioni su di esso in concomitanza della somministrazione di simvastatina [62]. L'ipocolesterolemizzante, verosimilmente in ragione degli effetti antiossidanti tipici della propria classe, ha dimostrato di attenuare il danno CM-mediato in maniera dose-dipendente, come si è evinto da osservazioni di laboratorio (urea, creatinemia) ed istocitologiche (anormalità strutturali) [62].

3.4. Alterata funzionalità neutrofilica

Un *report* suggerirebbe che i CM iodati sono in grado di aumentare l'incidenza di complicanze infettive locali e sistemiche in pazienti affetti da pancreatite acuta [63]. Dal momento che la risoluzione favorevole di un evento flogistico richiede necessariamente un bilanciamento tra i *signaling pathways* intracellulari dei neutrofili in senso pro- ed anti-apoptotico, è ragionevole ammettere che l'azione di agenti in grado di alterare

l'equilibrio della morte cellulare programmata del patrimonio neutrofilico in corso di infiammazione può tradursi in un effetto deleterio [64]. Oltre all'aumentata produzione di ROS a livello renale, i CM possono comportare reclutamento di leucociti polimorfonucleati proprio mediante l'alterazione del *signaling* del Ca^{++} intracellulare ed influenzare la sintesi *de novo* di leucotrieni, i meccanismi di aderenza intercellulare, di chemotassi e di fagocitosi [64].

4. ASPETTI CELLULARI DELLA TOSSICITA' ENDOTELIALE DA MEZZI DI CONTRASTO IODATI

L'**attivazione e/o il danno endoteliale** (ECAI, *Endothelial Cell Activation and/or Injury*) costituiscono un fenomeno fondamentale e pressoché ubiquitario nei processi di aterosclerosi, sia nel meccanismo cronico di progressione della placca, sia nella genesi delle complicanze acute della malattia [65]. La visione immunocentrica di un'entità nosologica tradizionalmente descritta come su base essenzialmente metabolica trae sostegno dal rilievo di concomitanti reazioni autoimmuni sulla superficie delle cellule endoteliali, mediate da auto-antigeni specifici, quali ad esempio HSP60 (*Heat Shock Protein 60*) [66]. L'ECAI può essere letta come espressione di uno stato (pro)infiammatorio locale o sistemico, che nello specifico si tradurrebbe in aumento di permeabilità microvascolare, produzione di chemochine ed

espressione delle molecole di adesione cellulare, oltre che nell'incremento del reclutamento e dell'attivazione dei leucociti. A livello renale, il protrarsi dell'alterazione del microcircolo comporterebbe dunque il rilievo morfologico di rarefazione del patrimonio capillare, peritubulare e non [67].

Le correlazioni patogenetiche tra i modelli teorici e sperimentali di aterosclerosi e di RCI-AKI sono state e sono oggetto di numerose speculazioni, come si evince anche dalla trattazione sin qui svolta. I diretti effetti della somministrazione di CM iodati sulla morfologia e sulla funzione delle cellule dell'endotelio renale sono lo specifico oggetto della seconda parte di questa tesi.

SECONDA PARTE

1. STUDIO SUGLI EFFETTI DEI MEZZI DI CONTRASTO ISO-OSMOLARI SU MORFOLOGIA E FUNZIONE ENDOTELIALE

1.1. Obiettivo dello studio

I dati sugli effetti diretti dei CM sulle cellule endoteliali (EC, *Endothelial Cells*) sono parziali, e frammentarie sono le informazioni circa il potenziale effetto protettivo sulle EC di sostanze antiossidanti ed antinfiammatorie utilizzate in clinica nella prevenzione di RCI-AKI, quali N-acetilcisteina (NAC) e statine, pur con risultati complessivamente contraddittori [68].

Il presente studio ha valutato in tempo reale le variazioni morfologiche, i livelli di stress ossidativo intracellulare, la ridistribuzione di HSP60 ed il rilascio di citochine, chemochine e sVCAM-1 (*solubile Vascular Cell Adhesion Molecules-1*) in EC trattate con lo IOCM iodixanolo (IODIX) a concentrazioni clinicamente significative, con o senza incubazione sequenziale con TNF- α (*Tumor Necrosis Factor α*). Si è altresì mirato a verificare il potenziale effetto preventivo di NAC o di rosuvastatina (ROSUVA) sulla tossicità endoteliale di IODIX.

1.2. Materiali e metodi

1.2.1. Colture di EC

Nel rispetto dei principi della Dichiarazione di Helsinki e dietro parere favorevole del Comitato Etico Unico per la Provincia di

Parma (n. di protocollo 33817), su materiale fornito dalla Struttura Complessa di Ginecologia ed Ostetricia dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria di Parma si sono ottenute EC umane isolate da vene di cordone ombelicale, cresciute in mezzo di coltura di DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) + siero fetale di vitello 20%.

1.2.2. Microscopia

È stato impiegato un microscopio confocale, attrezzato con camera per colture cellulari in grado di consentire osservazioni prolungate e in tempi differenti dei preparati di EC [69]. Ricostruzioni tridimensionali di EC vitali sono state ottenute successivamente da più immagini confocali mediante software specifico (Axiovision 4.5).

1.2.3. Visualizzazione delle variazioni morfologiche di EC

La morfologia delle EC è stata esaminata dopo incubazione delle stesse cellule vitali nel mezzo di coltura, a 37°C, in presenza di fluorocromo *calcein(AM)* 1 µM [70]. Le variazioni morfologiche delle stesse cellule sono state riscontrate al tempo 0 e a successivi intervalli, dopo sostituzione del mezzo di incubazione con un secondo addizionato di IODIX 10 mg/ml, alla stessa temperatura. Analoghe osservazioni sono state condotte dopo 16 ore di pre-incubazione delle EC con NAC 1 mM o ROSUVA 1 µM.

1.2.4. Determinazione dei livelli di stress ossidativo mediante variazione della fluorescenza in *calcein(AM)*

Ottenuti il carico di *calcein(AM)* nelle EC e la conseguente stabilità di fluorescenza, sono state effettuate misurazioni in 5 campi di osservazione, registrate come media dei pixel d'intensità di fluorescenza per campo. Le misurazioni sono state ripetute ad intervalli di 5 e 10 minuti sino ad 1 ora dall'inizio dell'incubazione di EC nel mezzo di coltura addizionato con IODIX. Osservazioni analoghe sono state condotte nei modelli di pre-incubazione con NAC e ROSUVA.

1.2.5. Visualizzazione della redistribuzione intracellulare di HSP60 in immunofluorescenza diretta

EC vitali sono state trattate con IODIX, TNF- α 1 nM o solo mezzo di coltura per 12 ore, dopo essere state lavate e fissate con metanolo a 4°C. Dopo il lavaggio, le EC sono state incubate con IgG monoclonali murini (LK1-clone) dirette contro HSP60 per 45 minuti, quindi nuovamente lavate e incubate con un anticorpo AlexaFluor488 anti-mouse per 30 minuti. Le EC di controllo sono state trattate solamente con quest'ultimo.

1.2.6. Misurazione della secrezione di prodotti infiammatori da parte di EC

Le EC sono state incubate per 16 ore con NAC, ROSUVA o il solo mezzo; quelle di ciascun gruppo sono state poi lavate e incubate per altre 12 ore con IODIX 5 mg/ml, TNF- α 1 nM o sola

coltura. Recuperato il sovrinatante, le EC sono state nuovamente sottoposte ad incubazione per 12 ore finali con la stessa stimolazione, oppure in *switch* da IODIX a TNF- α o viceversa, raccogliendo da ultimo il sovrinatante definitivo, analizzato per la ricerca di sVCAM-1, TNF- α , IL1- β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70 e MCP-1 (*Monocyte Chemotactic Protein -1*).

1.2.7. Attivazione di NF-kB

L'attivazione del fattore di trascrizione NF-kB (*Nuclear Factor k-light chain enhancer of activated B cells*) è stata valutata misurando i valori di p65 libero nucleare mediante ELISA-kit apposito. Le EC sono state trattate per 30 minuti con mezzo di controllo, IODIX 20 mg/ml, TNF- α , o IODIX e TNF- α in associazione. Le cellule lisate hanno permesso la raccolta delle frazioni nucleari per la misurazione di p65.

1.2.8. Analisi statistica

Tutte le analisi sono state condotte mediante il *package* Genstat Release 13. Gli effetti di NAC e di ROSUVA sull'aumento di fluorescenza in *calcein(AM)* sono stati valutati in analisi di varianza (ANOVA) per misurazioni ripetute, con *cut-off* di significatività $p < 0.05$. Le evidenze circa i prodotti proinfiammatori hanno richiesto una procedura statistica che considerasse l'accumulo di più analisi di varianza, nell'ambito di una ANOVA cosiddetta non bilanciata. I confronti a coppia si sono avvalsi inoltre del metodo di aggiustamento secondo Bonferroni per test

multipli, al fine di ottenere un EWER (*Experiment-Wise Error Rate*) di 0.05 nella modalità *two-tailed*. La quantità di prodotti proinfiammatori prodotti dalle EC sono state convertite in valore logaritmico. Infine, ANOVA e Bonferroni *post hoc* test sono stati impiegati in relazione ai risultati dell'attivazione di NF- κ B.

1.2.9. Materiali

IODIX è stato diluito a 37°C in terreno di coltura completo sino al raggiungimento di concentrazioni finali di 1-20 mg/ml. Come già accennato, TNF- α è stato impiegato alla concentrazione di 1 nM, mentre NAC e ROSUVA di 1 mM e 1 μ M, rispettivamente.

1.3. Risultati

1.3.1. Variazioni nella morfologia di EC

Le EC vitali subconfluenti, colorate con *calcein(AM)*, sono apparse di spessore sottile e ben aderenti al substrato e le une alle altre (**Figura 1, A**). Incubate con IODIX 10 mg/ml, dopo 15 minuti (e ancor più chiaramente ad 1 ora) le EC hanno mostrato una riduzione della superficie di adesione al substrato e alle cellule adiacenti, oltre ad un incremento di spessore (**Figura 1, B**). Analoghi rilievi sono stati ottenuti con incubazioni in IODIX 5 mg/ml, ma ancor più significativi in IODIX 20 mg/ml. Né la riduzione progressiva di IODIX, né il completo *washout*, una volta avvenuta l'incubazione per 10 minuti, hanno consentito la

reversibilità o il mancato sviluppo dell'evento. Il pretrattamento con NAC per 16 ore ha invece prodotto la completa prevenzione delle variazioni morfologiche di EC incubate con IODIX (**Figura 1, C** e **Figura 1,D**). Analogamente dicasi per ROSUVA (**Figura 1, E** senza iodixanolo, **Figura 1, F** con iodixanolo).

1.3.2. Stress ossidativo

La somministrazione di IODIX 10 mg/ml ha comportato un immediato e significativo livello di stress ossidativo, come dimostrato dall'incremento di fluorescenza nelle EC colorate con *calcein(AM)*. Tale incremento è progressivo e continuo, e si associa a *shrinking* periferico e a *bulging* centrale una volta trascorsa 1 h (**Figura 2, A, B, C**). Di nuovo, né la riduzione progressiva di IODIX, né il completo *washout*, una volta avvenuta l'incubazione per 10 minuti, hanno consentito la reversibilità o il mancato sviluppo dell'evento. In caso di preincubazione con NAC o con ROSUVA, si è rilevato un *burst* ossidativo contenuto nel corso dei primi 30 minuti dall'esposizione a IODIX, ma l'incremento di fluorescenza si è rivelato effimero e transitorio, con ritorno del segnale ai valori basali in circa 1 ora (**Figura 2, D, E, F, G, H, I**). La quantificazione delle variazioni di fluorescenza nel corso dei primi 30 minuti ha illustrato come la differenza di *burst* ossidativo tra EC trattate con IODIX e quelle preincubate con NAC o ROSUVA fosse statisticamente significativa (rispettivamente, $p < 0.0001$ e $p = 0.011$) (**Tabella 2, Tabella 3**). Occorre considerare che, a causa della relativa variabilità di entità e *timing* dello stress

ossidativo in colture di cellule vitali, un confronto può essere effettuato solo tra valori ottenuti nella medesima procedura sperimentale. Per questo motivo, il trattamento con IODIX è stato ripetuto sulle EC come controllo positivo sulle valutazioni dell'effetto citoprotettivo di NAC e ROSUVA.

1.3.3. Ridistribuzione intracellulare di HSP60

Nelle EC in condizioni colturali standard, HSP60 è evidenziabile come granuli sparsi o distribuiti in filamenti citoplasmatici, prevalentemente localizzati nella parte più interna delle cellule (**Figura 3**), a suggerirne una preminente collocazione intramitocondriale, come peraltro documentato in letteratura. La localizzazione di HSP60 nelle EC trattate con IODIX 10 mg/ml per 12 ore è apparsa differente rispetto a quella nelle EC di controllo, per una distribuzione più periferica dei granuli e dei filamenti intracitoplasmatici, ma soprattutto in ragione della comparsa di granuli evidenti lungo la membrana cellulare. Il pretrattamento per 16 ore con NAC ha impedito la quasi totalità delle modificazioni descritte, mentre un'efficacia più contenuta è stata dimostrata con ROSUVA. Una ridistribuzione di HSP60 sostanzialmente simile a quella ottenuta da IODIX si è osservata trattando le EC con TNF- α , e riscontri analoghi a quanto sopra indicato si sono rivelati ulteriormente con NAC e ROSUVA.

1.3.4. Secrezione di prodotti infiammatori da parte di EC

Esclusa la possibilità di misurare la quantità di IL-1 β , IL-12 e IL-12p70 nel sovranatante di EC, sono stati raccolti dati per gli altri prodotti disponibili. Il trattamento con IODIX 5 mg/ml non ha comportato modificazioni significative nella determinazione della quota di elementi di secrezione endoteliale nei due *steps* di incubazione di 12 ore ciascuno ($p > 0.05$) (**Figura 4**). La preincubazione con NAC ha comportato minor secrezione di MCP-1, sVCAM-1 e TNF- α (p tra < 0.005 e 0.0001) nelle EC standard e in quelle trattate con IODIX, e di IL-6 in quelle trattate con IODIX ($p < 0.005$). La preincubazione con ROSUVA non ha reso evidenti differenze significative di secrezione. Al trattamento sequenziale, consecutivo, di EC con IODIX e TNF- α , la secrezione da parte di EC è nettamente aumentata (**Figura 5**), all'incirca di 20 volte per sVCAM-1, di 200 volte per TNF- α , di 3 volte per IL-6, di 100 volte per IL-8, di 8 volte per MCP-1 ($p < 0.00001$). L'incremento dei prodotti infiammatori è stato anche significativamente maggiore rispetto a quello indotto dalla modalità TNF- α - TNF- α per i singoli casi di sVCAM-1 ($p < 0.00001$), IL-8 ($p < 0.0001$) e MCP-1 ($p < 0.00001$). In aggiunta, allorché si è provato ad invertire la sequenza di stimolazione, ovvero somministrando prima TNF- α e successivamente IODIX, la secrezione è apparsa ancora aumentata rispetto alle condizioni basali ($p < 0.00001$). La preincubazione con NAC prima della stimolazione sequenziale IODIX+TNF- α , indipendentemente dall'ordine di impiego degli stimoli, ha ridotto in maniera

significativa la risposta secretoria di EC per tutte le molecole (p tra 0.0001 e 0.00001), con la sola eccezione di IL-8 nelle EC trattate con la sequenza TNF- α seguito da IODIX. La preincubazione con ROSUVA non ha fornito invece risposte significative.

1.3.5. Attivazione di NF-kB

Il trattamento con IODIX 20 mg/ml non ha indotto l'attivazione di NF-kB in EC, che invece si è evidenziata in quelle incubate con TNF- α e, addirittura con tendenza ad effetto più marcato, in quelle incubate con IODIX e TNF- α associati (**Figura 6**).

2. DISCUSSIONE

Il presente studio è stato volto alla dimostrazione della **tossicità diretta dei CM iodati sulle EC**, attraverso la valutazione degli effetti di IODIX, da solo o in associazione a stimoli proinfiammatori come quelli mediati da TNF- α , sulla morfologia e la funzione di EC vitali in coltura. È stata testata altresì la potenziale efficacia di agenti antiossidanti protettivi già impiegati nella pratica clinica nella prevenzione di RCI-AKI, quali NAC e statine (nello specifico, ROSUVA).

IODIX induce effettivamente, a carico di EC, *shrinking* periferico e *bulging* centrale, oltre a parziale distacco dalla superficie basale e dalle cellule adiacenti. Simili **alterazioni**

morfologiche erano state descritte in letteratura per iopromide e iomeprolo, ma non per IODIX, in uno studio in cui le EC erano state esaminate in tre tempi diversi dopo fissazione [71]. Per contro, la maggior sensibilità di sistema del presente lavoro è determinata verosimilmente dall'osservazione di EC vitali sostanzialmente in tempo reale e a stretti intervalli, complessivamente per oltre 1 ora. È pertanto ipotizzabile che, in caso di occorrenza *in vivo* delle modificazioni riscontrate, possano verificarsi alterazione della permeabilità intimale e riduzione del calibro vascolare, in particolare in distretti specifici o in particolari condizioni. È stato infatti descritto *in vivo*, attraverso studi angiografici di tipo quantitativo, che IODIX è in grado di indurre reazioni vasomotorie divergenti nel circolo coronarico, con vasodilatazione a carico dei vasi sani e vasocostrizione in quelli affetti da aterosclerosi ed interessati da stenosi [72]; è stato inoltre documentato un effetto vasocostrittivo dello stesso agente a livello di DVR renali [32]. Il comportamento potrebbe dunque essere di particolare rilievo nel caso di iniezione di CM a bolo in settori vascolari quali coronarie, arterie renali o arterie polmonari, laddove i CM possono raggiungere concentrazioni relativamente elevate al primo passaggio.

È ormai assodato che lo **stress ossidativo** gioca un ruolo non trascurabile nella patologia cardiovascolare e nella patogenesi di RCI-AKI, come precedentemente sottolineato. Lo stress endoteliale CM-dipendente evidenziato confermerebbe tale convincimento. Singolarmente, il *washout* di IODIX dalla coltura

dopo pochi minuti non è in grado di prevenire la progressione dell'ossidazione, implicando un effetto tossico iniziale eccezionalmente rapido, che consente al *burst* ossidativo un'efficace autoalimentazione. Non sono chiari i meccanismi sottostanti alle variazioni morfologiche e allo stress ossidativo indotti da IODIX, ma non è illogico pensare che essi dipendano dalla perossidazione dei lipidi di membrana, dalla generazione di ROS all'interno della cellula, e dall'interazione con aminoacidi specifici, tra cui, come citato, la cisteina [73].

HSP60, una *chaperon protein* localizzata prevalentemente a livello mitocondriale e coinvolta nella mobilizzazione, nella ricostituzione e nella prevenzione di aggregazione delle proteine sottoposte a denaturazione, può essere attivamente trasportata dalla sede mitocondriale a quella citoplasmatica, e riscontrata successivamente sulla superficie di cellule neoplastiche o comunque sottoposte a stress [74]. Il presente rilievo di distribuzione di HSP60 in granuli discreti sulla membrana cellulare collima con dati precedenti sull'esposizione della molecola in cellule attivate, e verosimilmente correla allo stress ossidativo indotto da IODIX [75]. La ridistribuzione di HSP60 può essere rilevante sia per la funzione di EC, sia per specifiche risposte di ambito autoimmune. È noto infatti che HSP60 è coinvolta nel trasporto aminoacidico, nella traduzione del segnale e nella presentazione di specifici elementi peptidici, configurandosi come uno tra i principali autoantigeni nella patogenesi dei processi aterosclerotici [76]. I meccanismi di autoimmunità sono coinvolti

nello sviluppo precoce e tardivo della placca ateromasica e quindi influenzano la progressione delle malattie cardiovascolari e delle complicanze acute di queste ultime. È in particolare noto che autoanticorpi anti-HSP60 attivano *in vitro* le EC, mentre loro livelli circolanti correlano con lo spessore medio-intimale. L'esposizione della HSP60 su EC trattate con IODIX potrebbe suggerirne un ruolo nei meccanismi di danno vascolare, perlomeno in combinazione con altri fattori di rischio cardiovascolare.

La preparazione di EC con il solo CM non si traduce in modificazioni significative della ridotta secrezione basale dei **prodotti proinfiammatori**, mentre la stimolazione sequenziale IODIX + TNF- α comporta inequivocabilmente un incremento quantitativo dello stesso TNF- α , di IL-6, IL-8, MCP-1 e sVCAM-1, in particolare in caso di primitiva applicazione di IODIX. In microscopia si sono esclusi confondenti fenomeni litici grossolani o danno di membrana, e le basse dosi di CM sono state volutamente impiegate nello stesso senso. Un doppio danno, come dimostrato in questo studio per l'associazione IODIX-TNF- α , potrebbe spiegare almeno parzialmente il differente potenziale nefrotossico di IODIX in pazienti ad alto rischio e non. Si potrebbe ipotizzare che il CM costituisca in effetti uno stimolo capace di *preattivare* le EC, ovvero di favorire la comparsa di un esteso *burden* di reazioni avverse in pazienti con comorbilità predisponenti alla disfunzione endoteliale. L'**attivazione nelle EC di NF-kB** da parte di TNF- α e non dal solo IODIX appare in linea

con questa ipotesi, così come la tendenza di un'attivazione ancor più marcata in caso di associazione tra il CM e la citochina.

Sebbene siano state impiegate nello studio EC di derivazione umana, il *setting in vitro* di questo studio non implica di necessità la trasposizione dei risultati nei pazienti sottoposti a procedure contrastografiche di tipo diagnostico e/o interventistico. Tuttavia, le concentrazioni di IODIX impiegate appaiono comunque nel *range* di quelle calcolate e misurate nella circolazione periferica sino a 3 ore dopo la loro iniezione, alle dosi correntemente usate nella pratica clinica; la simulazione *in vitro* potrebbe pertanto riportare abbastanza fedelmente quanto avviene in corso di somministrazione intraarteriosa di CM non sottoposti a diluizione.

Come dimostrato dagli esperimenti di preincubazione, effettivamente **NAC** è in grado di prevenire *in vitro* gli effetti di IODIX sulle cellule endoteliali, e verosimilmente attraverso un effetto diretto. Le EC NAC-pretrattate non modificano la propria morfologia dopo incubazione con IODIX, appaiono molto meno responsive allo stress ossidativo ed anzi in grado di invertire i processi di ossidazione. NAC agisce come *thiol donor*, cioè mantiene o aumenta i livelli intracellulari di cisteina e glutatione, e protegge le cellule dagli effetti negativi dei ROS; il suo ruolo in condizioni sperimentali su differenti tipi di cellule è peraltro stato oggetto di altri recenti lavori [77,78]. Il pretrattamento con NAC ha mostrato inoltre l'inibizione della redistribuzione di HSP60 e del minor rilascio di prodotti proinfiammatori dopo incubazione con IODIX e TNF- α , indipendentemente dall'ordine di applicazione

dello stimolo di questi ultimi. Il diretto effetto di NAC sarebbe inoltre indirettamente confermato dalla ridotta secrezione dei prodotti anche in assenza di esposizione a IODIX, quasi che NAC sia in grado di modulare direttamente i *pathways* intracellulari, anziché interagire con gli stimoli inducenti il rilascio di citochine. Il *gap* tra l'enorme quantità di dati relativi all'efficacia di NAC *in vitro* e l'evidenza contraddittoria degli stessi *in vivo* [79] non può che dipendere, probabilmente, dalla diversità di protocolli applicati, dalle caratteristiche della popolazione di pazienti, oppure da sconosciute interazioni tra NAC stessa ed ipotetici fattori circolanti.

Il trattamento con **ROSUVA** prima dell'esposizione a IODIX preserva la morfologia di EC e le condizioni *redox*, in maniera congrua con le proprietà antinfiammatorie ed antiossidanti delle statine note sia *in vivo* che *in vitro* [80,81]. A differenza di NAC, tuttavia, ROSUVA non previene la secrezione di citochine proinfiammatorie indotta dall'associazione IODIX-TNF- α , e risultati solo parziali sono ottenuti nei riguardi di HSP60. Ulteriori studi saranno pertanto indispensabili per la conferma del ruolo di questa classe di farmaci nella prevenzione di RCI-AKI.

3. CONCLUSIONI

Dimostrato che IODIX induce rilevanti alterazioni morfologiche e funzionali a carico delle EC, tra cui *shrinking* e *bulging*, aumento dello stato di ossidazione, variazioni fenotipiche in ambito

immunogenico e proinfiammatorio, appare chiaro come l'evento sia innescato ed incrementato in presenza di un secondo insulto flogistico, emblematicamente rappresentato dalla presenza di TNF- α . Tali rilievi possono costituire un contributo alla conoscenza dei meccanismi di tossicità renale mediata dai CM iodati nel breve e nel lungo termine, e dunque di quelli sottostanti alla RCI-AKI nei pazienti ad alto rischio [\[82\]](#).

TABELLE E FIGURE

TABELLA 1

CARATTERISTICHE FISICO-CHIMICHE DEI MEZZI DI CONTRASTO IODATI

	Osmolalità (mOsm/ kgH ₂ O)	Ionicità	Rapporto tra atomi di iodio e particelle osmoticamente attive		Viscosità (mPa x S)
AD ELEVATA OSMOLALITA'					
Sodium-meglumine	2,160	Ionico	1,5	3:2	13,3
Diatrizoate meglumine/sodium	1,940	Ionico	1,5	3:2	10
A BASSA OSMOLALITA'					
Iohexol	844	Non ionico	3	3:1	20,4
Iopamidol	796	Non ionico	3	3:1	20,7
Iopromide	774	Non ionico	3	3:1	10
Ioversol	702	Non ionico	3	3:1	9,9
Ioxaglate	600	Ionico	3	6:2	15,7
ISO-OSMOLALI					
Iodixanol	290	Non ionico	6	6:1	26

FIGURA 1 - VARIAZIONI MORFOLOGICHE INDOTTE DA IODIXANOLO IN CELLULE ENDOTELIALI VITALI

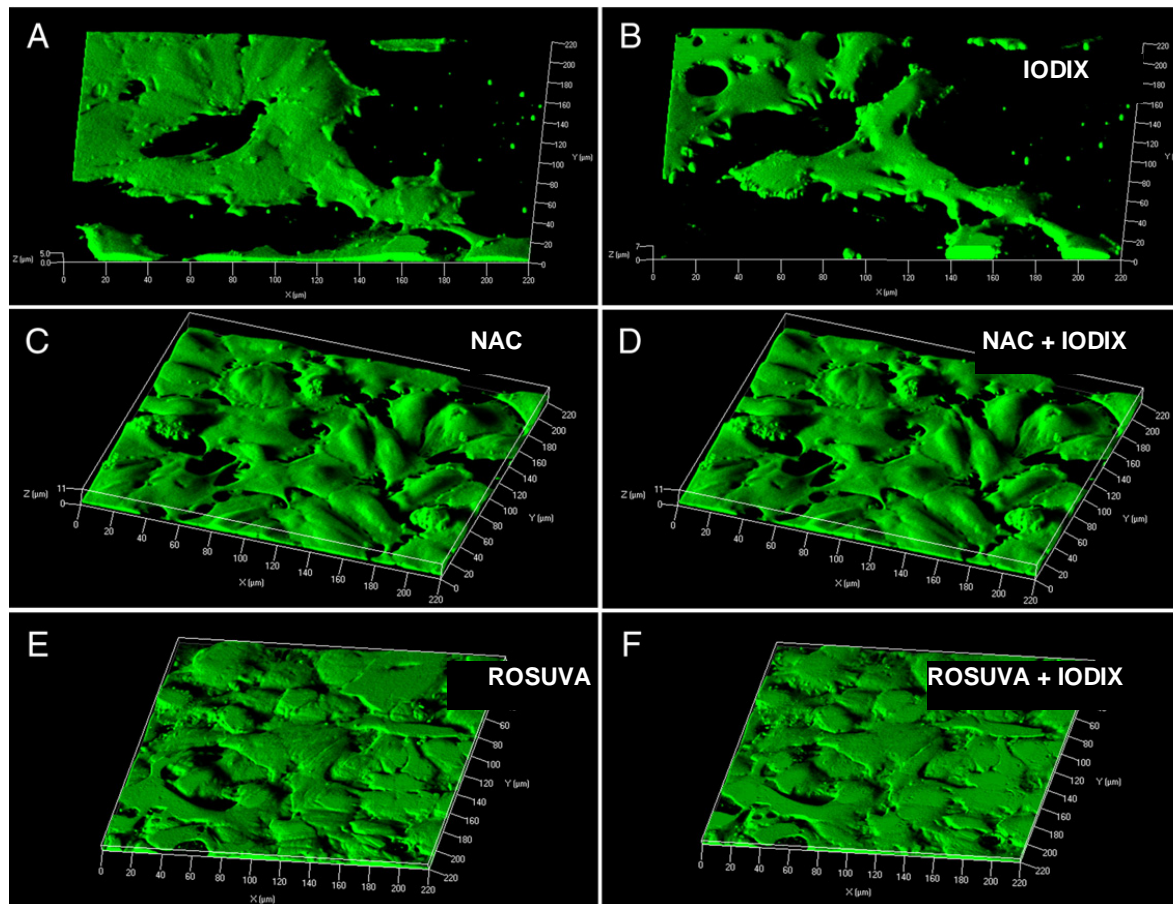


FIGURA 2 - STRESS OSSIDATIVO INDOTTO DA IODIXANOLO SU CELLULE ENDOTELIALI VITALI

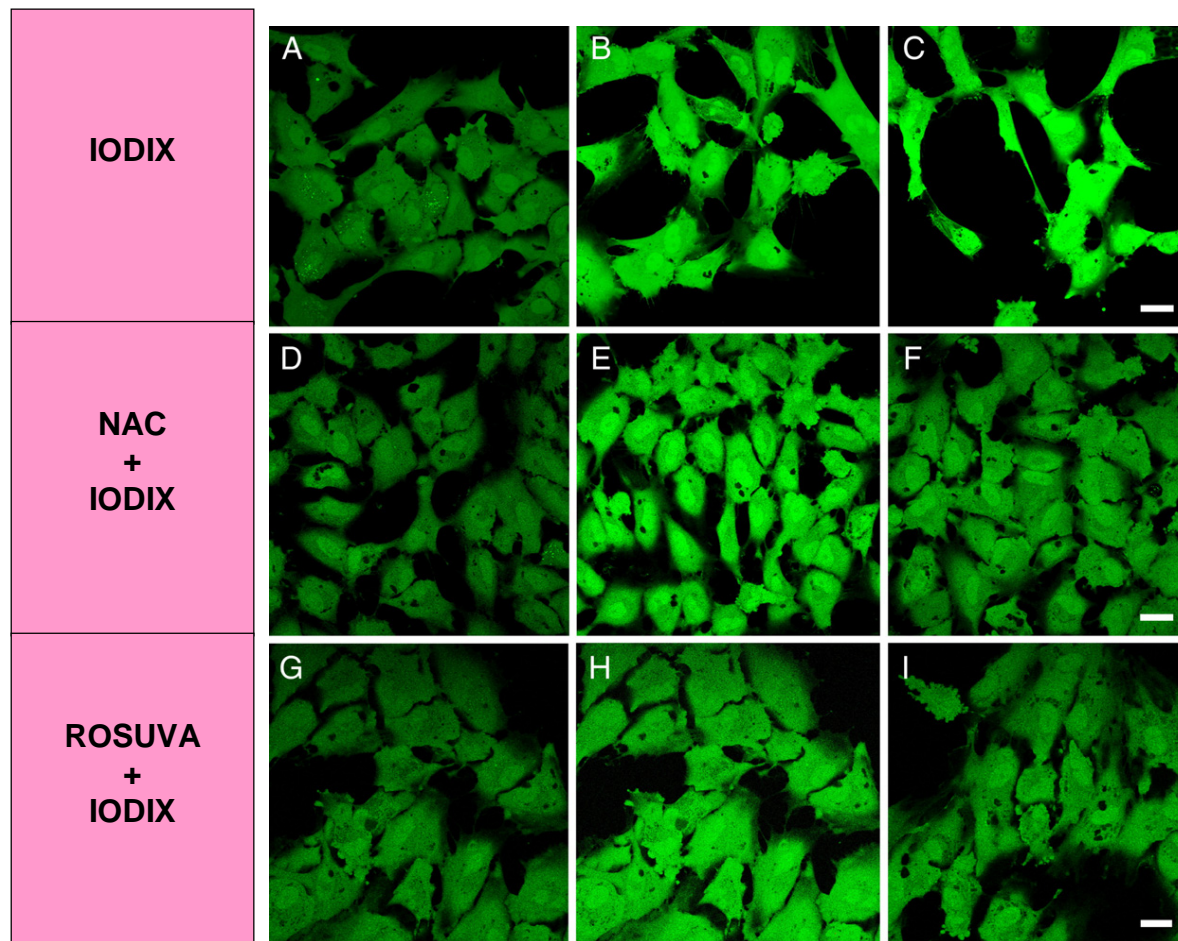


TABELLA 2

QUANTIFICAZIONE DELLO STRESS OSSIDATIVO INDOTTO DA IODIXANOLO IN CELLULE ENDOTELIALI VITALI

E PREVENZIONE MEDIANTE PRE-INCUBAZIONE CON N-ACETILCISTEINA (pixel fluorescence intensity/field, recorded as mean \pm SD)

	TIME 0	5 MIN	10 MIN	20 MIN	30 MIN
IODIX	50,5 \pm 10,2	70,3 \pm 15 (+ 39%)	81,4 \pm 16,5 (+ 61%)	102,5 \pm 21,7 (+ 103%)	124,7 \pm 18,6 (+ 147%)
NAC + IODIX	51,4 \pm 11,3	61,2 \pm 13,8 (+ 19%)	66,8 \pm 14,1 (+ 30%)	71,9 \pm 15,6 (+ 40%)	87,4 \pm 15,2 (+ 70%)

TABELLA 3

QUANTIFICAZIONE DELLO STRESS OSSIDATIVO INDOTTO DA IODIXANOLO IN CELLULE ENDOTELIALI VITALI E PREVENZIONE MEDIANTE PRE-INCUBAZIONE CON ROSUVASTATINA (pixel fluorescence intensity/field, recorded as mean \pm SD)

	TIME 0	5 MIN	10 MIN	20 MIN	30 MIN
IODIX	90 \pm 4,8	98,9 \pm 6,9 (+ 10%)	129,8 \pm 4,8 (+ 44%)	144,4 \pm 20 (+ 60%)	141,3 \pm 18,1 (+ 57%)
ROSUVA + IODIX	87,4 \pm 3	107,1 \pm 4,6 (+ 23%)	103,4 \pm 9,2 (+ 18%)	111,6 \pm 9,6 (+ 28%)	104,8 \pm 13,1 (+ 20%)

FIGURA 3

LOCALIZZAZIONE DI HSP60 NELLE CELLULE ENDOTELIALI IN CONDIZIONI BASALI E MODIFICAZIONI INDOTTE DA IODIXANOLO E TNF- α

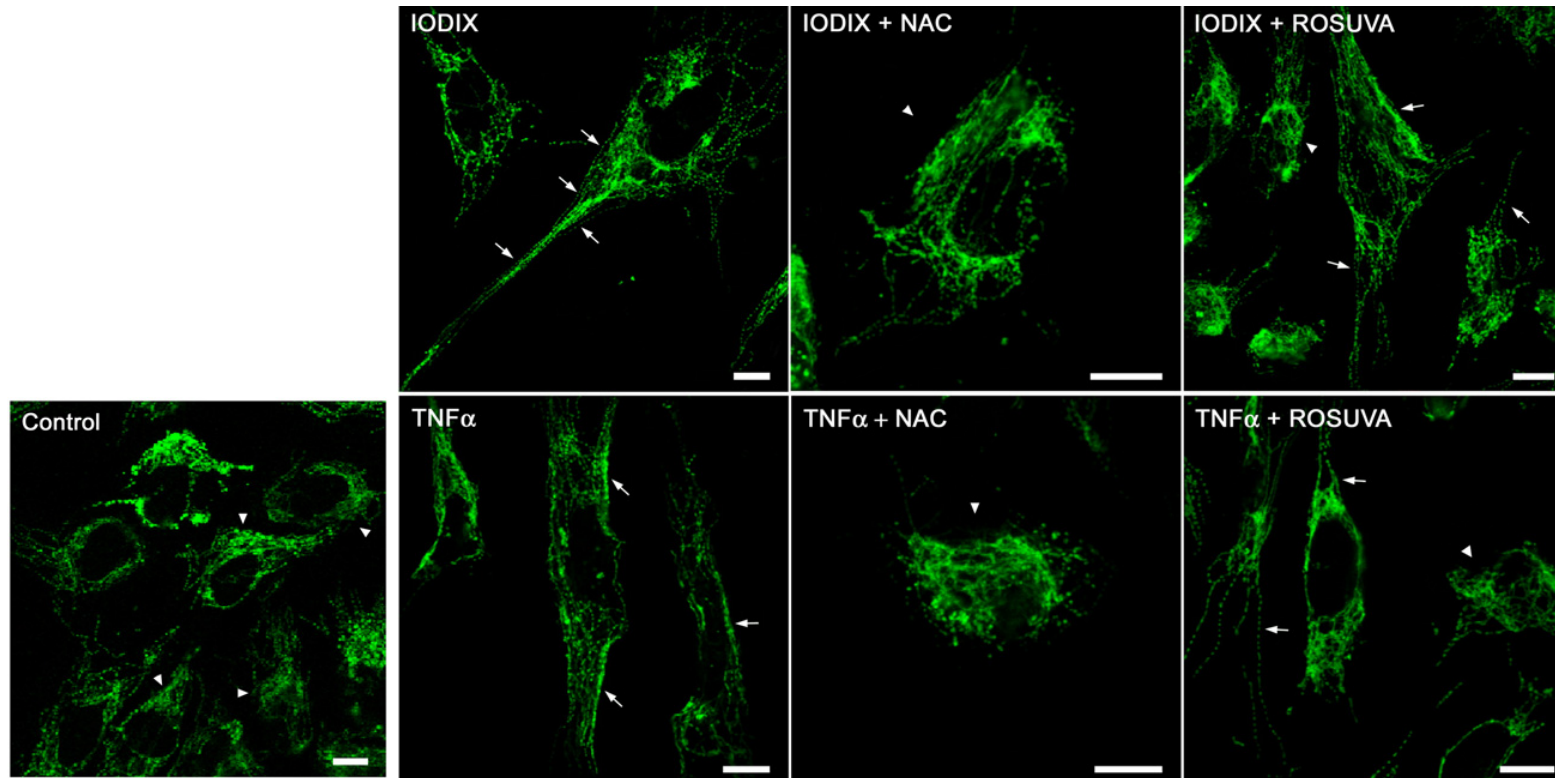


FIGURA 4

EFFETTI DI IODIXANOLO E TNF- α SULLA SECREZIONE DI PRODOTTI PROINFIAMMATORI (PARTE PRIMA)

(MEDIUM: COLONNE VUOTE; IODIX: COLONNE PIENE)

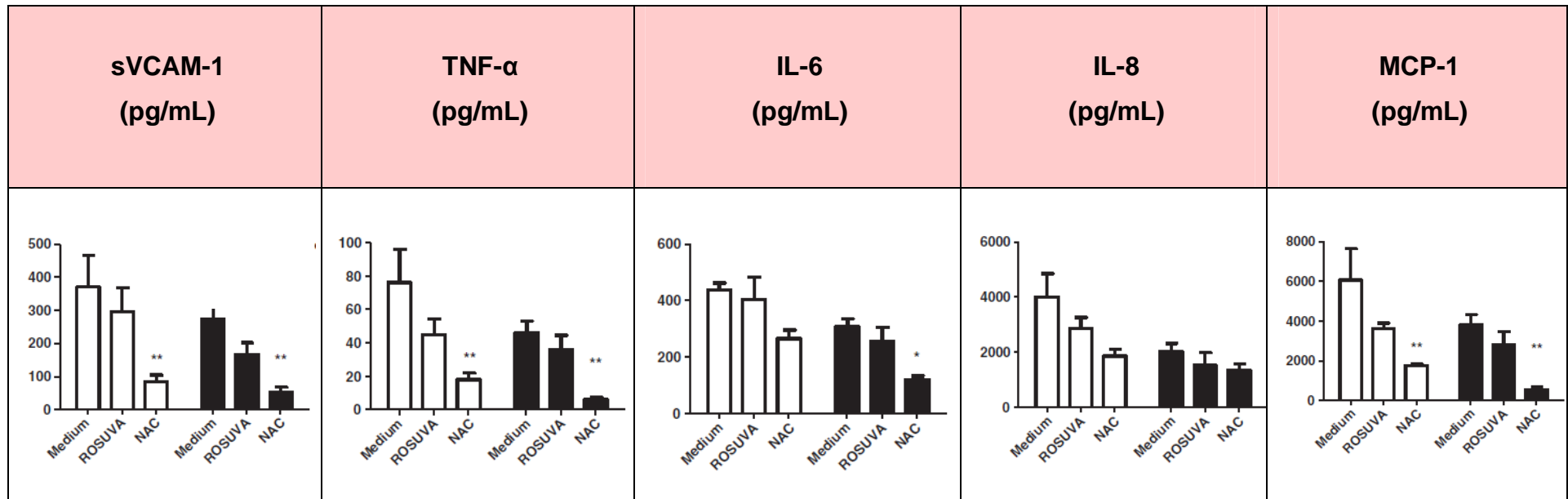


FIGURA 5

EFFETTI DI IODIXANOLO E TNF- α SULLA SECREZIONE DI PRODOTTI PROINFIAMMATORI (PARTE SECONDA)

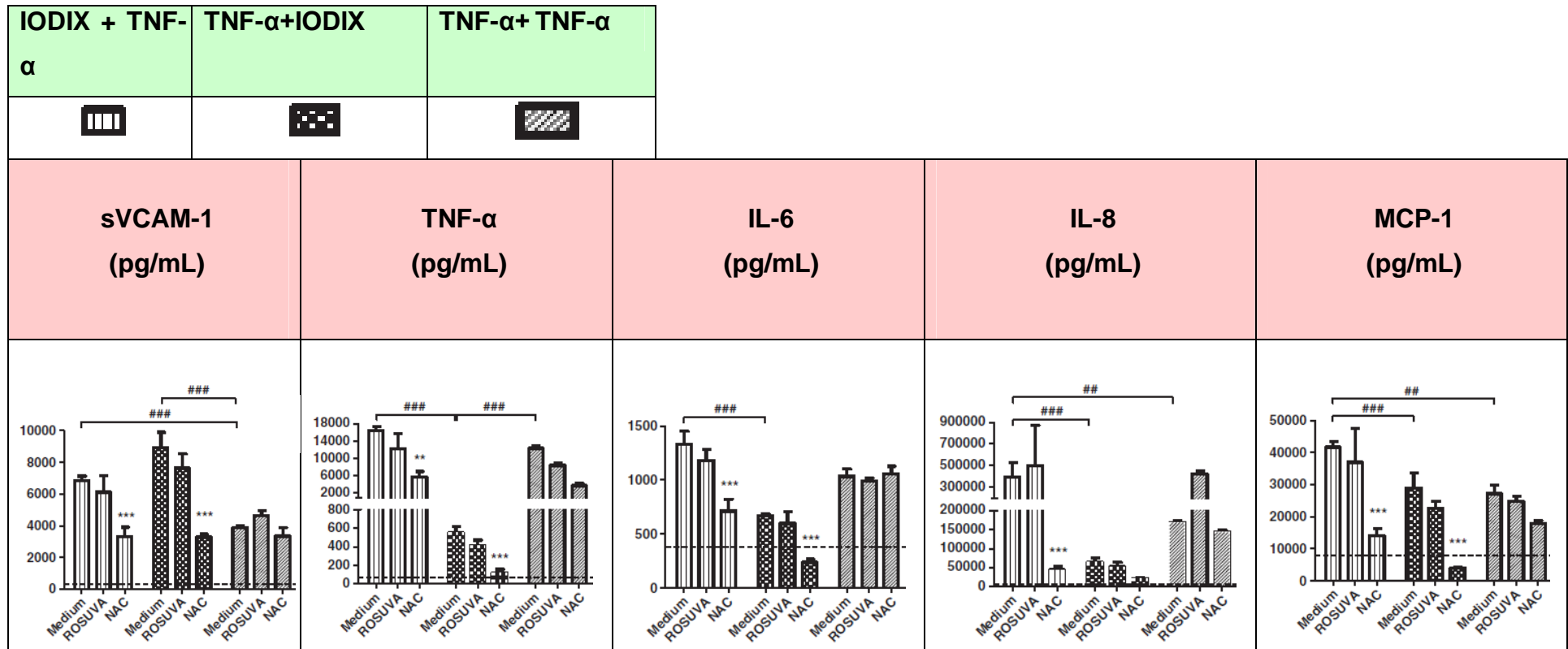
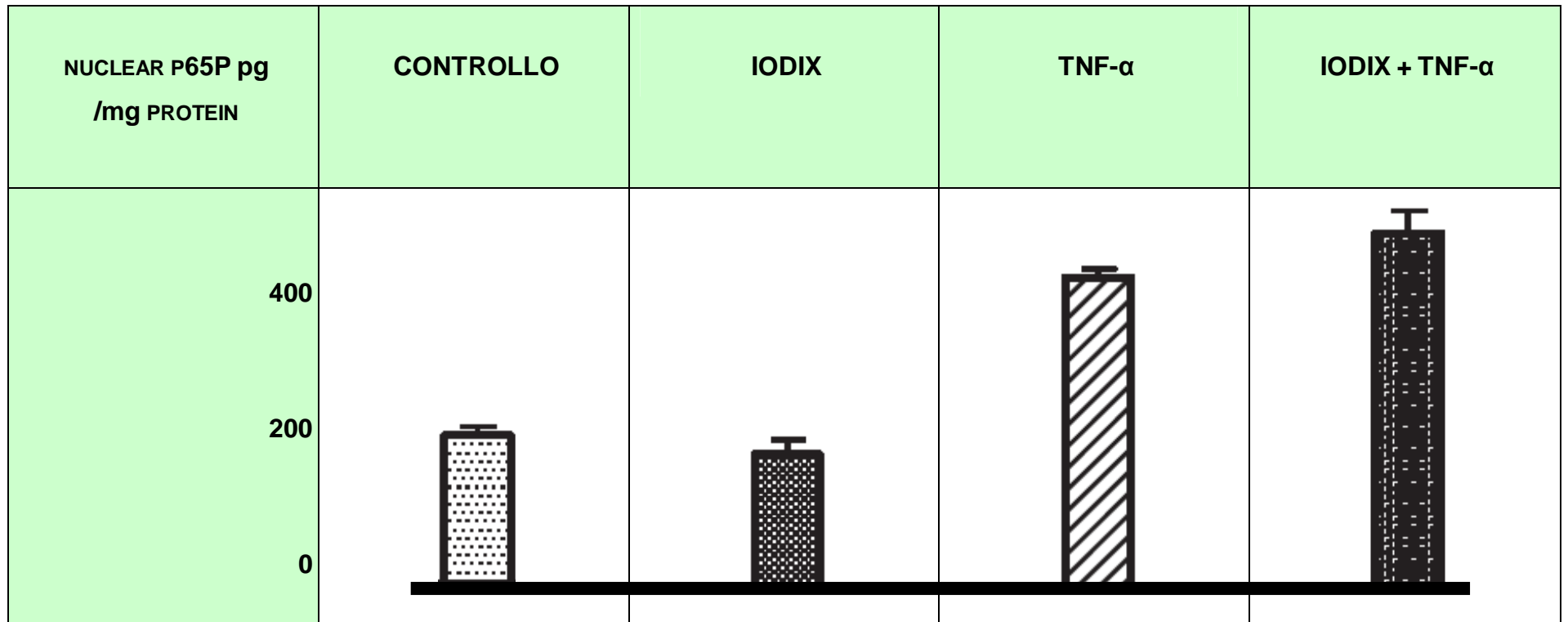


FIGURA 6

EFFETTI DI IODIXANOLO E TNF- α SULL'ATTIVAZIONE DI NF-KB NELLE CELLULE ENDOTELIALI



BIBLIOGRAFIA

1. Sendeski N. Clin Experiment Pharmacol Physiol 2011, 38:292-299
2. Thomsen HS, Morcos SK. Contrast-medium-induced nephropathy: is there a new consensus? A review of published guidelines. Eur Radiol 2006;16(8):1835-40
3. Meschi M, Detrenis S, Savazzi G. Contrast-induced nephropathy. Current concepts and propositions for Italian guidelines. Recenti Prog Med 2008;99(3):155-62
4. ESUR Contrast Media Safety Committee. Guidelines of the ESUR on Contrast Media. Eur Soc Urogen Radiol (ESUR), Vienna, 2010.
5. Briguori C, Tavano D, Colombo A. Contrast-agent associated nephrotoxicity. Prog Cardiovasc Dis 2003; 45:493-503
6. Detrenis S, Meschi M, del Mar Jordana Sanchez M, Savazzi G. Contrast medium induced nephropathy in urological practice. J Urol 2007; 178:1164-70
7. Goldfarb S, McCullough PA, McDermott J, Gay SB. Contrast induced acute kidney injury: specialty-specific protocols for interventional radiology, diagnostic computed tomography radiology, and interventional cardiology. Mayo Clin Proc 2009; 84(2):170-179
8. Mehta RL, Kellum JA, Shah SV, Molitoris BA, Ronco C, Warnock DG, et al. Acute Kidney Injury Network. Acute Kidney Injury Network: report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury. Crit Care 2007; 11(2):R31

9. Meschi M, Detrenis S, Musini S, Strada E, Savazzi G. Facts and fallacies concerning the prevention of contrast medium-induced nephropathy. *Crit Care Med* 2006; 34(8):2060-8
10. Meschi M, Detrenis S, Saccò M, Bertorelli M, Fiaccadori E, Caiazza A, Savazzi G. Patients at risk for contrast-induced acute kidney injury. *Ital J Med* 2010; 3:21-26
11. Nash K, Hafeez A, Hou S. Hospital-acquired renal insufficiency. *Am J Kidney Dis* 2002;39(5):930-6
12. Toprak O. Risk markers for contrast-induced nephropathy. *Am J Med Sci* 2007;334(4):283-90
13. Levy EM, Viscoli CM, Horwitz RI. The effect of acute renal failure on mortality. A cohort analysis. *JAMA* 1996;275(19):1489-94
14. Rihal CS, Textor SC, Grill DE, Berger PB, Ting HH, Best PJ, et al. Incidence and prognostic importance of acute renal failure after percutaneous coronary intervention. *Circulation* 2002;105(19):2259-64
15. McCullough PA, Wolyn R, Rocher LL, Levin RN, O'Neill WW. Acute renal failure after coronary intervention: incidence, risk factors, and relationship to mortality. *Am J Med* 1997;103(5):368-75
16. Marenzi G, Lauri G, Assanelli E, Compodonico J, De Metrio M, Marana I, et al. Contrast-induced nephropathy in patients undergoing primary angioplasty for acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2004;44(9):1780-5

17. Thomsen HS, Morcos SK. Contrast media and the kidney: European Society of Urogenital Radiology (ESUR) guidelines. *Br J Radiol* 2003;76(908):513-8
18. Meschi M, Detrenis S, Bianchi L, Caiazza A. Contrast nephropathy: a paradigm for cardiorenal interactions in clinical practice. *Renal Failure* 2012, chapter 28
19. Detrenis S, Meschi M, Bertolini L, Savazzi G. Contrast medium administration in the elderly patient: is advancing age an independent risk factor for contrast nephropathy after angiographic procedures? *J Vasc Interv Radiol* 2007;18(2):177-85
20. Parfrey PS, Griffiths SM, Barrett BJ, Paul MD, Genge M, Withers J, et al. Contrast material-induced renal failure in patients with diabetes mellitus, renal insufficiency, or both. A prospective controlled study. *N Engl J Med* 1989;320(3):143-9
21. Perkins BA, Nelson RG, Ostrander BE, Blouch KL, Krolewski AS, Myers BD, et al. Detection of renal function decline in patients with diabetes and normal or elevated GFR by serial measurements of serum cystatin C concentration: results of a 4-year follow-up study. *J Am Soc Nephrol* 2005;16(5):1404-12
22. Toprak O, Cirit M, Yesil M, Bayata S, Tanrisev M, Varol U, et al. Impact of diabetic and pre-diabetic state on development of contrast-induced nephropathy in patients with chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant* 2007;22(3):819-26
23. Detrenis S, Meschi M, Musini S, Savazzi G. Lights and shadows on the pathogenesis of contrast-induced

- nephropathy: state of the art. *Nephrol Dial Transplant* 2005;20(8):1542-50
24. Savazzi G, Cusmano F, Allegri L, Garini G. Physiopathology, clinical aspects and prevention of renal insufficiency caused by contrast media. *Recenti Prog Med* 1997;88(3):109-14
25. Komenda P, Zalunardo N, Burnett S, Love J, Buller C, Taylor P, et al. Conservative outpatient renoprotective protocol in patients with low GFR undergoing contrast angiography: a case series. *Clin Exp Nephrol* 2007;11(3):209-13
26. Mueller C, Buerkle G, Buettner HJ, Petersen J, Perruchoud AP, Eriksson U, et al. Prevention of contrast media-associated nephropathy: randomized comparison of 2 hydration regimens in 1620 patients undergoing coronary angioplasty. *Arch Intern Med* 2002;162(3):329-36
27. Rosenstock JL, Bruno R, Kim JK, Lubarsky L, Schaller R, Panagopoulos G, et al. The effect of withdrawal of drugs, ACE inhibitors or angiotensin receptor blockers prior to coronary angiography on the incidence of contrast-induced nephropathy. *Int Urol Nephrol* 2008;40(3):749-55
28. Duan SB, Wang YH, Liu FY, Xu XQ, Wang P, Zou Q, et al. The protective role of telmisartan against nephrotoxicity induced by X-ray contrast media in rat model. *Acta Radiol* 2009;50(7): 754-9
29. Toprak O. Conflicting and new risk factors for contrast induced nephropathy. *J Urol* 2007 Dec;178(6):2277-83

30. Sidhu RB, Brown JR, Robb JF, Jayne JE, Friedman BJ, Hettleman BD, et al. Interaction of gender and age on post cardiac catheterization contrast-induced acute kidney injury. *Am J Cardiol* 2008;102(11):1482-6
31. Hutcheson IR, Griffith TM, Pitman MR, et al. Iodinated radiographic contrast media inhibit shear stress- and agonist-evoked release of NO by the endothelium. *Br J Pharmacol* 1999; 128:451-57
32. Sendeski M, Patzak A, Persson PB. Constriction of the vasa recta, the vessels supplying the area at risk for acute kidney injury, by four different iodinated contrast media, evaluating ionic, nonionic monomeric and dimeric agents. *Invest Radiol* 2010; 45:453-7
33. Sendeski M, Patzak A, Pallone TL, Cao C, Persson AE, Persson PB. Iodixanol, constriction of medullary descending vasa recta, and risk for contrast medium-induced nephropathy. *Radiology* 2009; 251:697-704
34. Cao C, Edwards A, Sendeski M, et al. Intrinsic nitric oxide and superoxide production regulates descending vasa recta contraction. *Am J Physiol Renal Physiol* 2010; 299: F1056-64
35. Pollock DM, Polakowski JS, Wegner CD, Opgenorth TJ. Beneficial effect of ETA receptor blockade in a rat model of radiocontrast-induced nephropathy. *Ren Fail* 1997; 19:753-761

36. Beierwaltes WH. Endothelial dysfunction in the outer medullary vasa recta as a key to contrast media-induced nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol* 2013; 304:F31-32
37. McConnell F, Mersereau WA. The effect of angiographic contrast media on arterial endothelium: an experimental study. *J Can Assoc Radiol* 1964;15:14-22
38. Seeliger E, Sendeski M, Charanjit SR, Persson PB. Contrast-induced kidney injury: mechanisms, risk factors and prevention. *Eur Heart J* 2012; 2007-15
39. Sendeski M, Persson AB, Lium ZZ, Busch JF, Weikert S, Persson PB, Hippenstiel S, Patzak A. Iodinated contrast media cause endothelial damage leading to vasoconstriction of human and rat vasa recta. *Am J Physiol Renal Physiol* 2013 (first published Oct 17, 2012), doi:10.1152/ajprenal.00471.2012
40. Temmesfeld-Wollbrck B, Hocke AC, Suttorp N, Hippenstiel S. Adrenomedullin and endothelial barrier function. *Thromb Haemost* 2007; 98:944-51
41. Battenfeld R, Khater A el-R, Drommer W, Guenzel P, Kaup FJ. Ioxaglate-induced light and electron microscopic alterations in the renal proximal tubular epithelium of rats. *Invest Radiol* 1991; 26:35-9
42. Dobrota M, Powell CJ, Holtz E, Wallin A, Vik H. Biochemical and morphological effects of contrast media on the kidney. *Acta Radiol Suppl* 1995;399:196-203

43. Caglar Y, Mete UO, Kaya M. Ultrastructural evaluation of the effects of the contrast media on the rat kidney. *J Submicrosc Cytol Pathol* 2001;33:443-51
44. Messana JM, Cieslinski DA, Humes HD. Comparison of toxicity of radiocontrast agents to renal tubule cells in vitro. *Ren Fail* 1990; 12:75-82
45. Hsu YC, Nomura S, Krusé CW. Some bactericidal and virucidal properties of iodine not affecting infectious RNA and DNA. *Am J Epidemiol* 1965; 82:317-28
46. Soejima K, Uozumi J, Kanou T, Fujiyama C, Masaki Z. Nonionic contrast media are less nephrotoxic than ionic contrast media to rat renal cortical slices. *Toxicol Lett* 2003; 143:17-25
47. Zager RA, Johnson ACM, Hanson SY. Radiographic contrast media-induced tubular injury: evaluation of oxidant stress and plasma membrane integrity. *Kidney Int* 2003; 64:128-39
48. Andersen KJ, Christensen EI, Vik H. Effects of iodinated X-ray contrast media on renal epithelial cells in culture. *Invest Radiol* 1994; 29:955-62
49. Emch TM, Haller NA. A randomized trial of prophylactic acetylcysteine and theophylline compared with placebo for the prevention of renal tubular vacuolization in rats after iohexol administration. *Acad Radiol* 2003;10:514-9
50. Ueda J, Nygren A, Hansell P, Ulfendahl HR. Effect of intravenous contrast media on proximal and distal tubular

- hydrostatic pressure in the rat kidney. *Acta Radiol* 1993; 34:83-7
51. Jost G, Pietsch H, Sommer J, et al. Retention of iodine and expression of biomarkers for renal damage in the kidney after application of iodinated contrast media in rats. *Invest Radiol* 2009; 44:114-23
52. Seeliger E, Flemming B, Wronski T, et al. Viscosity of contrast media perturbs renal hemodynamics. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18:2912-20
53. Schwartz D, Blum M, Peer G, et al. Role of nitric oxide (EDRF) in radiocontrast acute renal failure in rats. *Am J Physiol* 1994; 267:F374-9
54. Naziroglu M, Yoldas N, Nur Uzgur E, Kayan M. Role of contrast media on oxidative stress, calcium ion signaling and apoptosis in kidney. *J Membrane Biol* 2013; doi: 10.1007/s00232-012-9512-9
55. Xiong XL, Jia RH, Yang DP, Ding GH. Irbesartan attenuates contrast media-induced NRK-52E cells apoptosis. *Pharmacol Res* 2006; 54:253-60
56. Schick CS, Bangert R, Kubler W, Haller C. Ionic radiocontrast media disrupt intercellular contacts via an extracellular calcium-independent mechanism. *Exp Nephrol* 2002; 10:209-15
57. Heyman SN, Rosen S, Khamaisi M, Idée JM, Rosenberger C. Reactive oxygen species and the pathogenesis of

- radiocontrast-induced nephropathy. *Invest Radiol* 2010; 45:188-195
58. Elmstahl B, Nyman U, Leander P, Golman K, et al. Iodixanol 320 results in better renal tolerance and radiodensity than gadolinium-based contrast-media: arteriography in ischemic porcine kidneys. *Radiology* 2008; 247:88-97
59. Romano G, Briguori C, Quintavalle C, Zanca C, et al. Contrast agents and renal cell apoptosis. *Eur Heart J* 2008; 29:2569-76
60. Mathai JP, Germain M, Shore GC. BH3-only BIK regulates BAX, BAK-dependent release of calcium ion from endoplasmic reticulum stores and mitochondrial apoptosis during stress-induced cell death. *J Biol Chem* 2005; 280:23829-36
61. Quintavalle C, Brenca M, De Micco F, Fiore D, et al. In vivo and in vitro assessment of pathways involved in contrast media-induced renal cells apoptosis. *Cell Death and Disease* 2011; 2, e155; doi:10.1038/cddis.2011.38
62. Al-Otaibi, KE, Al Elaiwi AM, Tariq M, Al-Asmari AK. Simvastatin attenuates contrast-induced nephropathy through modulation of oxidative stress, proinflammatory myeloperoxidase, and nitric oxide. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2012; doi:10.1155/2012/831748
63. Carmona-Sánchez R, Uscanga L, Bezury-Rivas P, et al. Potential harmful effect of iodinated intravenous contrast medium on the clinical course of mild acute pancreatitis. *Arch Surg* 2000; 135:1280-84

64. Lillevang ST, Albertsen M, Rasmussen F, et al. Effect of radiographic contrast media on granulocyte phagocytosis of *Escherichia coli* in a whole blood flow cytometric assay. *Invest Radiol* 1994; 29:68-71
65. Basile DP. The endothelial cell in ischemic acute kidney injury: implications for acute and chronic function. *Kidney Int* 2007; 72 (2), 151–156
66. Grundtman C, Kreutmayer SB, Almanzar G, et al. Heat shock protein 60 and immune inflammatory responses in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011; 31(5) 960–968
67. Basile DP, Friederich JL, Spahic J, et al. Impaired endothelial proliferation and mesenchymal transition contribute to vascular rarefaction following acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 2011; 300, F721–F733
68. Briguori C, Quintavalle C, De Micco F, Condorelli G. Nephrotoxicity of contrast media and protective effects of acetylcysteine. *Arch Toxicol* 2011; 85 (3), 165–173
69. Orlandini G, Gatti R, Gazzola GC, Borghetti A, Ronda N. Receptor-ligand internalization. In: Conn, P.M. (Ed.), *Techniques in Confocal Microscopy*. Academic Press, San Diego, pp. 175–188, 2010
70. Uggeri J, Gatti R, Belletti S, Scandroglio R, Corradini R, Rotoli BM, Orlandini G. Calcein-AM is a detector of intracellular oxidative activity. *Histochem Cell Biol* 2004; 122 (5), 499–505

71. Franke RP, Fuhrmann R, Hiebl B, Jung F. Influence of various radiographic contrast media on the bulking of endothelial cells. *Microvasc Res* 2008; 76 (2), 110–113
72. Limbruno U, Petronio AS, Amoroso G, et al. The impact of coronary artery disease on the coronary vasomotor response to non-ionic contrast media. *Circulation* 2000; 101, 491–497
73. Parasassi T, Brunelli R, Costa G et al. Thiol redox transitions in cell signaling: a lesson from N-acetylcysteine. *Sci World J* 2010; 10, 1192–1202
74. Soltys BJ, Gupta BJ. Cell surface localization of the 60 kDa heat shock chaperonin protein (hsp60) in mammalian cells *Cell Biol Int* 1997; 21 (5), 315–320
75. Jones M, Gupta RS, Englesberg E. Enhancement in amount of P1 (hsp60) in mutants of Chinese hamster ovary (CHO-K1) cells exhibiting increases in the A system of amino acid transport. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91, 858–862
76. Doria A, Sherer Y, Meroni PL, Shoenfeld Y. Inflammation and accelerated atherosclerosis: basic mechanisms. *Rheum Dis Clin North Am* 2005; 31 (2), 355–362
77. Masha A, Brocato L, Dinatale S, et al. N-acetylcysteine is able to reduce the oxidation status and the endothelial activation after a high glucose content meal in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Endocrinol Invest* 2009; 32 (4), 352–356
78. Biswas D, Sen G, Sarkar A, Biswas T. Atorvastatin acts synergistically with N-acetyl cysteine to provide therapeutic advantage against Fas-activated erythrocyte apoptosis during

chronic arsenic exposure in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 2011; 250 (1), 39–53

79. ACT Investigators. Acetylcysteine for prevention of renal outcomes in patients undergoing coronary and peripheral vascular angiography. Main results from the randomized acetylcysteine for contrast-induced nephropathy trial (ACT). *Circulation* 2011; 124 (11), 1250–1259
80. Liuni A, Luca MC, Gori T, Parker JD. Rosuvastatin prevents conduit artery endothelial dysfunction induced by ischemia and reperfusion by a cyclooxygenase-2-dependent mechanism. *J Am Coll Cardiol* 2010; 55 (10), 1002–1006
81. Ghaisas MM, Dandawate PR, Zawar SA, et al. Antioxidant, antinociceptive and anti-inflammatory activities of atorvastatin and rosuvastatin in various experimental models. *Inflammopharmacology* 2010; 18 (4), 169–177
82. Fiaccadori E, Maggiore U, Rotelli C, et al. Plasma and urinary free 3-nitrotyrosine following cardiac angiography procedures with nonionic radiocontrast media. *Nephrol Dial Transplant* 2004; 19:865-9

RINGRAZIAMENTI

Dedico il lavoro a mia moglie Laura,

ai miei genitori, Carla e Luciano, e a mio fratello Matteo. E ai miei nonni, comunque presenti pur se in forme al di là del tempo e dello spazio, ma non per questo meno vivi. Inoltre ai miei suoceri, Carla ed Enzo, e a mia cognata Caterina. E di certo al piccolo Huber, che mi osserva scodinzolando. Alle persone che sono entrate nel mio cuore o che vi dimorano da sempre: Simona, Dorianò e Giuliana Detrenis; Ilaria Montanari, Matteo Rossi, Mar e Danio Somenzi, Giovanna Morini, Emanuele Sani, Elena Bocchialini, Chiara Falzoi, Sara Martinelli, Stefano Todeschi, Marcella Saccò, Sabrina Musini, Chiara e Francesco Bassi, Monica Casella, Laura Bertolini, Marcello Bertorelli, Barbara Bruni, Lorenzo Finardi, Luca Giuri, Claudio Gatti, Caterina Maccari, Silvia Mattei, Manuela Musetti, Elisabetta Parenti, Sarah Pioli, Federico Rotelli, Elena Strada, Paolo Greco.

Ringrazio anzitutto il professor Enrico Fiaccadori, per l'amicizia e per i magistrali, impeccabili, eterni insegnamenti; e perché ha reso possibile la stesura di questa tesi da parte mia, quale sviluppo degli studi sull'argomento condotti assieme alla Dr.ssa Nicoletta Ronda; il mio insostituibile direttore, professor Alberto Caiazza, in ragione degli innumerevoli debiti che ho contratto nei suoi confronti; i miei colleghi e i collaboratori sanitari del Dipartimento di Medicina e Diagnostica, per la serenità di ogni giorno trascorso a Borgo Val di Taro.

E alcune delle tante figure di riferimento che ho avuto l'onore di incontrare sulla mia strada: Giuseppe Regolisti, Willy Cabassi, Umberto Maggiore, Stefano Bianchi, Roberto Bigazzi, Angelo Cavatorta, Giacomo Bruschi, Angelo Cuomo, Carlo Calzetti, Paolo Montanari, Landino Allegri, Carlo Buzio, Salvatore David, Lucia Bignardi, Marilena Minari, Ariberto Corradi, Vincenzo Cambi, Giovanni Delnevo, Roberto Delsignore, Giovanni Garini, Giuseppe Chesi, Giorgio Cioni, Giuseppe Civardi, Massimo Desimoni, Carlo Di Donato, Marco Grandi, Roberta Minelli, Alberto Montanari, Paolo Coruzzi, Giorgia Paoli, Domenico Panuccio, Tullio Poli, Egidio Rossi, Mauro Silingardi, Mino Tramaloni.

Ed infine, sempre e per sempre, il mio maestro professor Giorgio Savazzi, senza il quale non sarei nulla di quel (poco) che sono.

M.M.

