

## ABSTRACT

Exercise-based cardiac rehabilitation (CR) is effectively used as an adjuvant therapy in a number of cardiovascular diseases (CVDs), including chronic heart failure (CHF), and it is recommended by the American and European Society of Cardiology guidelines. Exercise training (ET) increases physical and functional capacity, ameliorates quality of life, decreases symptoms (fatigue and dyspnoea) and, more importantly, reduces the incidence of acute cardiac events, mortality and hospitalization rates. Recently, it has been shown that a moderate exercise is able to induce the recovery of antioxidant defences, whose expression changes with aging and during CVDs. Despite the number of evidences underling the CR-associated cardiovascular protection, CR itself is still an underused medical resource and the mechanisms accounting for such benefits are not completely elucidated yet.

The present study aimed at investigating whether a well-structured rehabilitation program of 4 weeks was able to modify systemic antioxidant potential in HF patients, and at examining the mechanisms by which exercise improves cardiovascular function.

For this purpose, 50 subjects with diagnosis of CHF (NYHA class II and III) were recruited from the Cardiac Rehabilitation Unit of "San Gennaro dei Poveri" Hospital in Naples. On admission, patients underwent case history recording, clinical examination, electrocardiogram, chest X-Ray, echocardiogram, cardiopulmonary stress test and a 6-minute walking test, blood sample collection for routinary and experimental analysis. The CR program consisted in ET of 30' on cycloergometer, respiratory gymnastic along with educational meetings, for a meantime of 4 weeks. Blood samples were collected at baseline and at the end of CR, and oxidants (TBARS and 8-hydroxy-2-deoxyguanosine), antioxidants (catalase, Cat, and superoxide dismutase, SOD), and bioavailability of nitric oxide (NO) were measured in patients' sera, whereas Sirtuin 1 (Sirt1) activity was quantified in patients' lymphocytes.

Human endothelial cells (ECs), exposed or not to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-oxidative stress, were conditioned with patients' sera, and cellular redox state and senescence were evaluated. A similar approach in an animal model of post-ischemic HF was used to confirm and assess the effect of exercise on senescence. Finally, inhibitors of Sirt1 (EX-527) and Cat (ATZ) activities were used to investigate the roles of these proteins in modulating endothelial cell senescence.

The results demonstrated that CR stimulated an increase of oxidants with concomitant rise of Sirt1 activity, antioxidants and NO bioavailability. Moreover, CR

prevented the ECs senescence via Sirt1 and Cat activation while the inhibition of these enzymes eliminated such effect, both in humans and in the animal model. Lastly, Sirt1 and Cat activities were, respectively, inversely and directly associated with cardiopulmonary stress test duration. Taken together, these findings suggest that CR triggers cellular adaptations leading to enhance systemic antioxidant effectiveness. Circulating levels of Sirt1 and Cat activity are suggested to be promising markers for assessing the efficacy of CR program.

## SOMMARIO

Le malattie cardiovascolari, incluso lo scompenso cardiaco, rappresentano ancora oggi la prima causa di morte e di disabilità a livello globale. Numerosi studi hanno dimostrato che l'esercizio fisico influenza favorevolmente la prognosi dei pazienti cardiopatici in quanto è in grado di migliorare le performances fisiche e i sintomi oltre che ridurre l'incidenza di eventi cardiaci acuti, il tasso di mortalità e di riospedalizzazione. In particolare, nei pazienti scompensati sono stati documentati molti dei benefici associati all'esercizio fisico. Recentemente è stato dimostrato che un esercizio moderato è in grado di indurre il recupero delle difese antiossidanti che variano considerevolmente con l'invecchiamento ed in presenza di malattie cardiovascolari. Tuttavia, i meccanismi alla base di tali effetti cardioprotettivi, non sono stati ancora completamente chiariti.

Lo scopo del mio lavoro di tesi è stato valutare, in pazienti con scompenso cardiaco stabile, se un programma di riabilitazione cardiaca (RC) di 4 settimane fosse in grado di modificare il potenziale antiossidante dei pazienti e quali fossero i meccanismi alla base degli effetti protettivi associati all'esercizio.

A tale scopo, sono stati reclutati 50 soggetti con diagnosi di scompenso (classe NYHA II e III) presso l'Unità di Cardiologia Riabilitativa dell'Ospedale "San Gennaro dei Poveri" di Napoli. Al momento del ricovero, i pazienti sono stati sottoposti ad anamnesi, esame clinico obiettivo, elettrocardiogramma, radiografia del torace, ecocardiogramma, test da sforzo cardiopolmonare e prelievo ematico per valutazioni di routine e sperimentali. Il programma di riabilitazione consisteva in un training di 30' su cicloergometro, ginnastica respiratoria ed educazione alimentare, per una durata complessiva di 4 settimane.

Nei campioni ematici raccolti al basale e dopo 4 settimane sono stati misurati i livelli sierici di perossidazione lipidica (TBARS) e di deossiguanosina (8-OHdG), la biodisponibilità di ossido nitrico (NO) e le attività della Superossido Dismutasi (SOD) e della Catalasi (Cat). Nei linfociti, invece, è stata misurata l'attività della Sirtuina 1 (Sirt1), una deacetilasi NAD<sup>+</sup>-dipendente che regola la sopravvivenza cellulare e la risposta allo stress ossidativo. In seguito, il siero dei pazienti è stato utilizzato per eseguire esperimenti *in vitro*, ossia per condizionare cellule umane endoteliali (HUVEC), esposte successivamente alla presenza o meno di stress ossidativo indotto con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. In tali cellule sono stati valutati i livelli di ossidanti e antiossidanti, l'attività di Sirt1 e la senescenza cellulare.

Per analizzare il ruolo svolto dalla Sirt1 e dalla Cat nella modulazione dei meccanismi di senescenza cellulare, le cellule endoteliali, precedentemente condizionate con i sieri dei

pazienti, sono state trattate con due inibitori, EX-527 (6-Cloro-2,3,4,9-tetraidro-1H-carbazol-1-carbossammide) e ATZ (3-amino-1,2,3-triazolo), capaci di inibire in maniera selettiva, rispettivamente, Sirt1 e Cat. Infine, lo stesso tipo di esperimento è stato eseguito utilizzando il siero isolato da un modello animale di ratto scompensato sottoposto a un programma di training fisico simile a quello utilizzato nei programmi di RC per i pazienti reclutati.

I risultati ottenuti suggeriscono che un programma di riabilitazione cardiaca di sole 4 settimane migliora la risposta allo stress ossidativo favorendo un adattamento cellulare di tipo ormetico. Infatti, la RC comporta un aumento delle specie ossidanti con un concomitante aumento dell'attività di Sirt1 nei linfociti e degli enzimi antiossidanti e della biodisponibilità di ossido nitrico nel siero dei pazienti. Inoltre, la RC è in grado di prevenire, sia nell'uomo sia nel modello animale, la senescenza delle cellule condizionate attraverso l'attivazione di Sirt1 e Cat, come dimostrato dall'azione degli inibitori specifici di queste proteine. Infine, l'attività di Sirt1 è risultata essere inversamente correlata, mentre l'attività di Cat è direttamente correlata alla durata del test da sforzo cardiopolmonare suggerendo un ruolo determinante di questi fattori nel modulare la tolleranza allo sforzo.