

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI

“FEDERICO II”

Scuola di Dottorato in Medicina Molecolare

Dottorato di Ricerca in Genetica e Medicina Molecolare



***“Espressione e regolazione di geni candidati
in placche aterosclerotiche umane”***

**Coordinatore:
Prof. Carmelo Bruno Bruni**

**Candidato:
Dott. Maria Donata Di Taranto**

**Anno
2007**

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI

“FEDERICO II”

“Dipartimento di Biochimica e Biotecnologie Mediche”

Dottorato di Ricerca in Genetica e Medicina Molecolare

Coordinatore Prof. Carmelo Bruno Bruni

**Sede amministrativa:
Dipartimento di Biologia e Patologia Cellulare e Molecolare
“Luigi Califano”**

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI

“FEDERICO II”

“Dipartimento di Biochimica e Biotecnologie Mediche”

**Tesi di Dottorato di Ricerca in Genetica e Medicina Molecolare
XIX ciclo**

***“Espressione e regolazione di geni candidati
in placche aterosclerotiche umane”***

Candidato: Dott. Maria Donata Di Taranto

Docente guida e relatore: Prof. Francesco Salvatore

Correlatore: Prof. Giuliana Fortunato

Indice

1.Introduzione.....	6
1.1 Rischio Cardiovascolare e Aterosclerosi	6
1.1.1. La struttura dei vasi arteriosi.....	7
1.1.2 Le ipotesi patogeniche dell'aterosclerosi.....	9
1.1.3 Sviluppo della placca aterosclerotica.....	11
1.1.3.1 Processi iniziali dell'aterosclerosi	12
1.1.3.2 Progressione della lesione aterosclerotica	17
1.1.3.3 Complicazioni della lesione aterosclerotica	20
1.1.4 Manifestazioni cliniche dell'aterosclerosi	21
1.1.5 Fattori di rischio per l'aterosclerosi	22
1.1.5.1 Predisposizione genetica all'aterosclerosi	27
1.1.6 Classificazione delle lesioni aterosclerotiche	31
1.2 Paraoxonasi e aterosclerosi.....	35
1.2.1 Fenomeni ossidativi nelle LDL associati a sviluppo di aterosclerosi	35
1.2.2 Caratteristiche dei geni della Paraoxonasi	37
1.2.2.1 PON1.....	38
1.2.2.2 PON2.....	40
1.2.2.3 PON3.....	41
1.3 Infiammazione e aterosclerosi	42
1.3.1 Il pathway della 5-lipossigenasi.....	44
1.4 L'adiponectina nell'aterosclerosi	46
2. Scopo della tesi.....	50
3. Materiali e metodi	51
3.1 Popolazione in studio e raccolta dei campioni	51
3.2 Caratterizzazione della lesione.....	53

3.3	Analisi immunoistochimica.....	54
3.4	Quantizzazione dei livelli di mRNA	55
3.5	Malondialdeide	58
3.6	Marcatori biochimici.....	58
3.7	Esperimenti <i>ex vivo</i>	58
3.8	Quantizzazione dell'adiponectina mediante ELISA.....	59
3.9	Analisi statistica.....	59
4.	Risultati	61
4.1	Espressione di PON2	61
4.2	Valutazione dello stato ossidativo.....	65
4.2	Valutazione dello stato ossidativo.....	66
4.3	Modulazione dell'espressione dell'mRNA di PON2 da parte dello stress ossidativo in campioni <i>ex-vivo</i>	67
4.4	Espressione di 5-LO e FLAP	69
4.5	Valutazione dei livelli di adiponectina	70
4.6	Espressione dei recettori dell'adiponectina.....	72
5.	Discussione	74
6.	Considerazioni conclusive.....	79
7.	Bibliografia	81
8.	Lista delle abbreviazioni.....	90

1.Introduzione

1.1 Rischio Cardiovascolare e Aterosclerosi

L'aterosclerosi, principale causa di morte nei paesi occidentali per cardiopatia coronarica o per ictus, è un processo morboso a carattere progressivo che inizia in genere in età precoce e si esprime clinicamente durante la media e la terza età (1-3). E' una patologia multifattoriale che, per divenire clinicamente manifesta, richiede la formazione di una placca fibro-lipidica all'interno della parete di un'arteria che riduce il flusso ematico. La formazione delle lesioni aterosclerotiche avanzate è la conseguenza di tre processi: 1) l'accumulo di lipidi, principalmente colesterolo libero ed esteri del colesterolo, nello spazio sub-endoteliale delle arterie; 2) l'instaurarsi di uno stato infiammatorio con infiltrazione di linfociti e di macrofagi che, fagocitando i lipidi accumulati, diventano cellule schiumose (foam cell); 3) migrazione e proliferazione di cellule muscolari lisce (smooth muscle cells – SMC – Tutte le abbreviazioni utilizzate in questa tesi sono riportate nel capitolo 8) con produzione di matrice extracellulare. Nonostante il termine “aterosclerosi” derivi dal greco *atheré*, “poltiglia” e *sclerosis*, “indurimento”, è importante sottolineare come nelle lesioni possa esservi una grande variabilità nel tessuto formatosi a causa della prevalenza di ciascuno dei tre processi (4, 5). Di conseguenza, alcune lesioni aterosclerotiche appaiono prevalentemente dense e fibrose, altre possono contenere grandi quantità di lipidi e residui necrotici, mentre la maggior parte presenta combinazioni e variazioni di ciascuna di queste caratteristiche. La distribuzione dei lipidi e del tessuto connettivo all'interno delle lesioni ne determina la stabilità, la facilità alla rottura e alla trombosi, con i conseguenti effetti clinici.

1.1.1. La struttura dei vasi arteriosi

La parete dei vasi arteriosi è costituita da una serie di strati (tuniche): dall'interno del lume del vaso verso l'esterno, si osservano una tunica intima, una tunica media e una tunica avventizia (Fig.1); nei capillari, invece la parete è costituita soltanto da uno strato di cellule endoteliali appiattite. La struttura e la consistenza delle tre tuniche è diversa in base al calibro delle arterie e ne determina le caratteristiche passive (elasticità, distensibilità) ed attive (contrattilità).

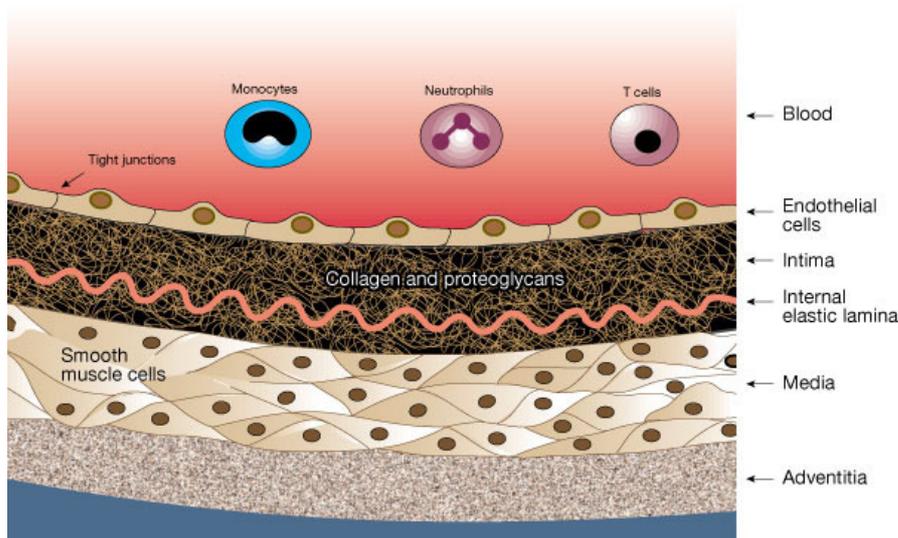


Figura 1: Struttura di un'arteria. (3)

La tunica intima è costituita da uno strato monocellulare, l'endotelio, supportato da uno strato di tessuto connettivo lasso, la lamina basale, e da uno strato elastico sub-endoteliale. Lo strato endoteliale è presente in tutto il sistema circolatorio e si trova a diretto contatto con il sangue dal quale trae le sostanze nutritive. L'endotelio è un epitelio pavimentoso, semplice, piuttosto fragile ma con una grande capacità di rigenerazione e di crescita; si rigenera, infatti, continuamente e può formarsi su protesi naturali o artificiali inserite chirurgicamente. Variazioni nel diametro dell'arteria, nella forma del vaso (curvature e restringimenti) e nel moto pulsatorio della parete vasale, possono far assumere alle cellule endoteliali una diversa forma. Infatti, le cellule

endoteliali delle arterie, nelle quali il flusso sanguigno è uniforme e laminare, hanno forma allungata e sono allineate nella direzione del flusso, mentre quelle posizionate nelle regioni del vaso che presentano diramazioni o curvature, in cui il flusso è turbolento, presentano forma poligonale e non assumono particolari orientamenti. L'endotelio gioca un ruolo critico nel regolare l'entrata, l'uscita ed il metabolismo delle lipoproteine e di altri agenti che possono partecipare alla formazione di lesioni di tipo aterosclerotico (6).

Lo strato sub-endoteliale è costituito da fibroblasti e dalle fibre di collagene da essi generate, infine, nella parte di intima che confina con la media, è presente la lamina elastica interna, che contribuisce all'elasticità del vaso. Tale lamina è fenestrata per favorire il passaggio delle sostanze nutritive dal sangue fino alla tunica media.

L'intima è la tunica nella quale si formano le lesioni aterosclerotiche. In alcuni casi, le lesioni si formano a partire da un ispessimento generalizzato o asimmetrico dell'intima invadendo man mano il lume, con il risultato di una riduzione del flusso ematico. In altri casi l'aumento di spessore dell'intima si accompagna ad una continua dilatazione dell'arteria (aneurisma) cosicché il lume effettivo del vaso cambia poco di diametro. In questo secondo caso le lesioni aterosclerotiche appaiono più simmetriche e concentriche.

La *media* è lo strato più spesso della parete, tipicamente costituita da strati concentrici di elastina, separati da sottili strati di tessuto connettivo, fibre di collagene e cellule muscolari lisce (SMC) ed è responsabile del mantenimento della pressione sanguigna e del flusso continuo di sangue. Le SMC contengono filamenti di actina che si contraggono in risposta alla depolarizzazione della membrana cellulare e generano tensione. Nelle grandi arterie, le SMC tendono ad essere allineate longitudinalmente, sono circondate da una comune lamina basale e si associano a fibre di collagene strettamente intrecciate. Le fibre elastiche, che si interpongono tra le SMC, sono relativamente estensibili e permettono la contrazione e la distensione della parete dell'arteria in relazione

alla pressione del flusso sanguigno durante il ciclo cardiaco. Le SMC, oltre a sintetizzare fibre elastiche e collagene, determinano le proprietà meccaniche della parete arteriosa e sono attivamente coinvolte nei processi metabolici che contribuiscono al tono della parete; in condizioni in cui la pressione, la motilità e la tensione della parete sono aumentate, il metabolismo delle SMC della media è incrementato.

La tunica *avventizia*, lo strato più esterno, protegge le arterie e ne permette l'ancoraggio ai tessuti circostanti. È costituita da tessuto connettivo contenente fibre sparse di elastina e di collagene in cui, nel caso di grandi vasi, si possono trovare plessi nervosi e vasi linfatici. Grazie alla limitata elasticità delle fibre di collagene, questo strato pone un limite alla dilatazione dei vasi. In genere, nelle arterie di grosso calibro l'avventizia riceve le sostanze nutritive dai "vasa-vasorum", una rete di capillari che si sviluppa intorno al vaso.

1.1.2 Le ipotesi patogeniche dell'aterosclerosi

Le attuali teorie sulla patogenesi delle lesioni aterosclerotiche si riconducono alle prime ipotesi fatte da Virchow, von Rochitansky e Duguid. Virchow sosteneva che una piccola lesione della parete arteriosa provocasse un essudato infiammatorio, causa a sua volta dell'aumento del flusso e dell'accumulo di costituenti del plasma nell'intima dell'arteria (7). Ciò che von Rokitansky sosteneva e che fu sviluppato da Duguid, era che nei siti di lesione si potessero ritrovare "incrostazioni" di piccoli trombi murali; questi trombi si organizzavano grazie alla proliferazione nel loro interno di cellule muscolari lisce, e venivano in seguito incorporati nelle lesioni stesse, costituendo la base delle lesioni avanzate (8, 9). Negli anni '70 queste tesi furono modificate, grazie agli studi di biologia molecolare e cellulare della parete arteriosa e nacque la teoria patogenetica dell'aterosclerosi chiamata "ipotesi della reazione alla lesione" (10). Ross e Glomset, per lesione endoteliale intendevano qualsiasi alterazione dell'endotelio che non necessariamente implica il denudamento della parete

intimale ma può essere semplicemente rappresentata da una alterazione funzionale che ne modifichi le normali proprietà anticoagulanti e vasodilatanti e ne alteri la permeabilità. Le cause di disfunzione endoteliale sono multiple e sintetizzabili in quelli che sono considerati i vari fattori di rischio dell'aterosclerosi: l'aumento delle lipoproteine a bassa densità (LDL) ed in particolare delle LDL modificate ed ossidate, i radicali liberi prodotti dal fumo di sigaretta, i prodotti di glicosilazione avanzata presenti nei diabetici, l'ipertensione ed elevate concentrazioni plasmatiche di omocisteina (11). Nei paragrafi seguenti verrà illustrato il ruolo dei singoli fattori di rischio nello sviluppo delle lesioni aterosclerotiche.

Nell'ambito di un dato distretto arterioso l'aterosclerosi tende a colpire zone localizzate, le regioni predisposte, risparmiando invece i segmenti adiacenti. Le lesioni aterosclerotiche si formano spesso nei punti di ramificazione delle arterie caratterizzate da un flusso ematico turbolento; ciò supporta la tesi che la distribuzione localizzata delle lesioni dipenda da fattori locali come la dinamica dei fluidi.

Le varie teorie che si sono succedute nel tempo, riguardo alla patogenesi del processo aterosclerotico, basate sugli studi di Ross e Glomset, sono state fondamentalmente incentrate sul ruolo del sovraccarico lipidico. Anche nelle attuali teorie il ruolo della componente lipidica resta determinante in tutte le fasi dell'aterosclerosi, da quelle iniziali a quelle delle lesioni avanzate. L'ipotesi lipidica o teoria della "risposta alla ritenzione" di Williams e Tabas (12), postula che un aumento delle LDL plasmatiche sia responsabile dell'infiltrazione nella parete arteriosa delle lipoproteine, le quali risultano più suscettibili all'ossidazione e diventano più aterogene innescando i processi fisiologici responsabili dello sviluppo delle lesioni aterosclerotiche, come l'infiammazione.

Bisogna arrivare all'inizio degli anni 90 perché il ruolo della flogosi nell'aterosclerosi diventi sistematico oggetto di studio. Al momento attuale è ormai accettata da tutti i maggiori studiosi la definizione di aterosclerosi come

malattia infiammatoria cronica della parete arteriosa. L'infiammazione sembra essere un fattore chiave sia nello sviluppo che nella progressione della placca aterosclerotica (13). L'alterazione funzionale dell'endotelio si manifesta con l'espressione di molecole di adesione sulla membrana cellulare e con la secrezione di sostanze biologicamente attive (citochine, fattori di crescita, radicali liberi), che sono responsabili dell'infiltrazione dei leucociti, della permeabilità alle lipoproteine plasmatiche e del controllo del tono vasale (14). Le tre teorie, la teoria della risposta alla lesione, quella lipidica e quella infiammatoria, sono strettamente collegate e non si escludono a vicenda. Infatti, le LDL ossidate sono citotossiche per le cellule endoteliali in coltura e inducono un danno all'endotelio che "risponde" attraverso la messa in atto di una serie di eventi che scatenano una risposta infiammatoria (Fig.2) (15).

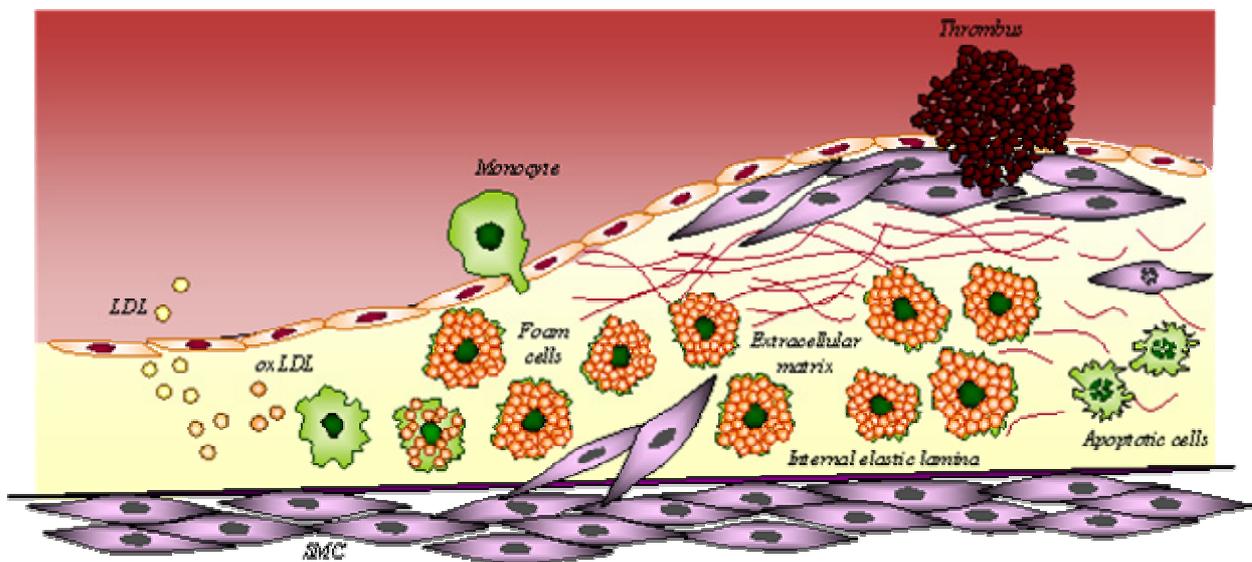


Figura 2 Sviluppo e progressione della placca aterosclerotica (16)

1.1.3 Sviluppo della placca aterosclerotica

Nello sviluppo delle lesioni aterosclerotiche possiamo distinguere diverse fasi: i processi iniziali che generano lesioni clinicamente silenti; le fasi di progressione che portano alla formazione di lesioni stenotiche non necessariamente

sintomatiche; eventi complicanti che sono alla base delle manifestazioni cliniche croniche o acute.

1.1.3.1 Processi iniziali dell'aterosclerosi

L'evento primario della formazione di lesioni aterosclerotiche è l'accumulo locale di lipidi nello spazio sub-endoteliale della tonaca intima delle arterie. I lipidi sono trasportati nel plasma sotto forma di lipoproteine, complesse molecole idrosolubili composte da un nucleo di esteri del colesterolo e trigliceridi e uno strato superficiale di fosfolipidi, colesterolo libero e specifiche proteine trasportatrici, le apolipoproteine. Esistono varie classi di lipoproteine che si distinguono in base al contenuto lipidico, alla densità in ultracentrifugazione, alla dimensione, alla mobilità elettroforetica e alle proteine presenti sulla loro superficie. Le principali lipoproteine plasmatiche sono i chilomicroni, le lipoproteine a bassissima densità (VLDL), le lipoproteine a densità intermedia (IDL o VLDL remnants), le lipoproteine a bassa densità (LDL) e le proteine ad alta densità (HDL). In seguito alla metabolizzazione le lipoproteine si trasformano scambiando lipidi e proteine e passano da una classe all'altra. Le lipoproteine contribuiscono differentemente allo sviluppo e alla progressione del processo aterosclerotico: quelle ricche in trigliceridi, i chilomicroni e le VLDL, non sono considerate aterogeniche, ma si ritiene che lo siano i derivati dalla loro lipolisi, le VLDL remnants e le LDL, lipoproteine più ricche in colesterolo (Fig. 3).

Il colesterolo è essenziale per l'integrità del tessuto nervoso e in tutti i tessuti per la sintesi di steroidi e delle membrane cellulari. Il principale vettore del colesterolo è costituito dalle LDL che ne trasportano circa il 70% del contenuto plasmatico totale. I tessuti assorbono colesterolo dal plasma attraverso il recettore delle LDL (LDL-R) che riconosce la apolipoproteina B-100 (ApoB-100) presente nelle LDL e ne permette l'internalizzazione nelle cellule. Tale recettore rimuove approssimativamente il 75 per cento delle particelle LDL dalla

circolazione ed è regolato negativamente nell'espressione quando i livelli di colesterolo intracellulare aumentano.

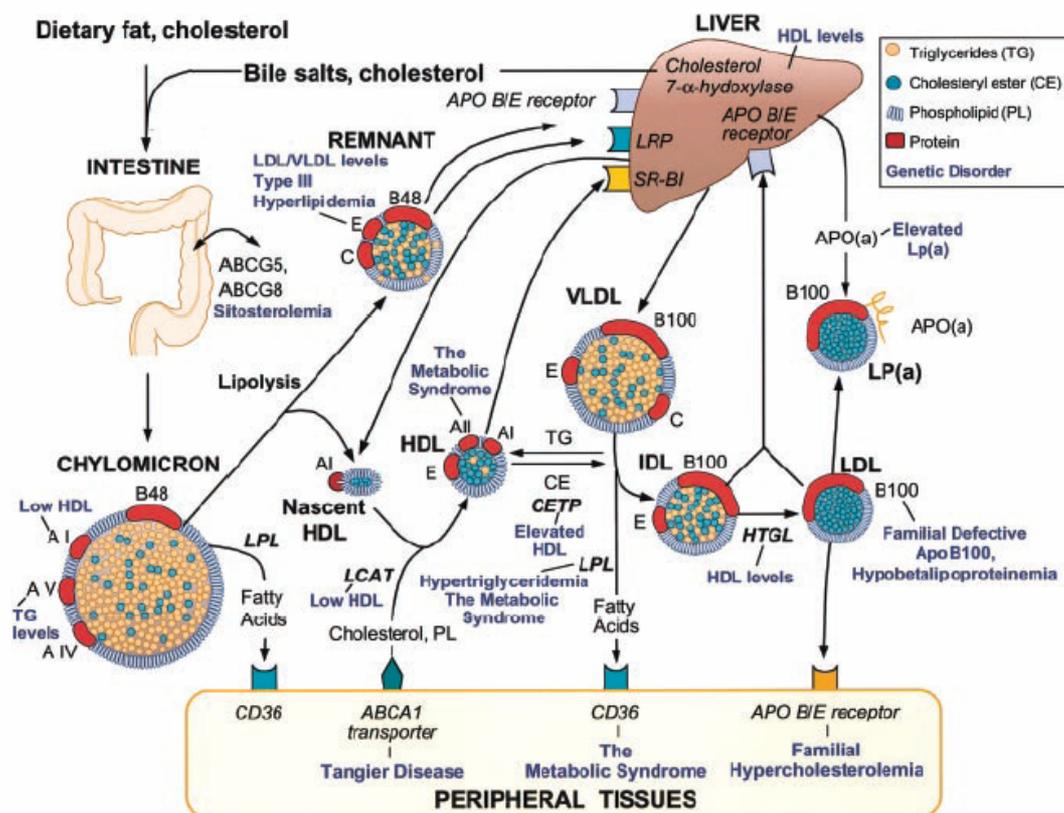


Figura 3 Metabolismo lipidico e difetti genici associati a patologie (17)

Pazienti con patologie cardiovascolari presentano frequentemente un profilo lipidico caratterizzato da elevati livelli plasmatici di VLDL remnants e di LDL mentre un'associazione inversa è stata stabilita con i livelli di HDL. Il meccanismo grazie al quale le HDL diminuiscono il rischio di malattie cardiovascolari è complesso. Un meccanismo proposto è che siano il possibile veicolo del trasporto inverso del colesterolo, il processo attraverso il quale il colesterolo in eccesso viene riportato dalle cellule periferiche al fegato. Si stima che ogni 1 mg/dl di aumento del colesterolo HDL diminuisca il rischio di malattie cardiovascolari del 2% negli uomini e del 3% nelle donne (18).

Le lipoproteine ritenute a maggior rischio per l'aterosclerosi sono le LDL piccole e dense. Questa frazione delle LDL, caratterizzata spesso da una taglia più piccola e un rapporto lipidi/proteine a favore delle proteine, è considerata più aterogena delle LDL normali. Infatti presenta un'aumentata emivita plasmatica che è dovuta alla diminuzione dell'affinità della apolipoproteina per il recettore delle LDL. Persistendo in circolo queste lipoproteine continuano a cedere lipidi, aumentando di densità e diminuendo di dimensioni e sono inoltre sottoposte a un numero maggiore di eventi ossidativi diventando LDL mediamente ossidate (MM-LDL) e poi LDL ossidate (oxLDL) (19).

L'ossidazione è ritenuta uno dei fattori d'iniziazione della lesione aterosclerotica poiché i prodotti ossidati sono in grado di indurre danno endoteliale e chemiotassi. L'ossidazione delle lipoproteine si verifica sia a livello della porzione lipidica che di quella proteica. Le modificazioni dei lipidi includono la formazione di idroperossidi, lisofosfolipidi, ossisteroli e prodotti aldeidici derivanti dalla rottura delle catene degli acidi grassi (20). Le modificazioni della porzione apolipoproteica includono rotture della catena peptidica come anche la formazione di specifici legami tra residui amminoacidici e componenti dei lipidi ossidati. Le LDL ossidate sono state riscontrate sia nel plasma che nelle lesioni aterosclerotiche precoci e avanzate. Non è ancora chiaro se l'ossidazione delle LDL avvenga nel plasma e poi sia la loro forma ossidata ad infiltrarsi sotto l'endotelio oppure se l'ossidazione avvenga nel sito della lesione in seguito all'accumulo di LDL native. Probabilmente si verifica l'insieme dei due fenomeni e in ogni caso l'infiltrazione di LDL o oxLDL nella parete delle arterie è sempre una conseguenza dell'alterazione endoteliale.

In risposta al danno indotto da prodotti ossidati e da alterazioni del flusso sanguigno, le cellule endoteliali si attivano esprimendo molecole di adesione sulla superficie e producendo mediatori chemiotattici. Le zone in cui solitamente si formano lesioni aterosclerotiche per es. nei punti di ramificazione, spesso sono caratterizzati da flusso turbolento. Le forze di taglio laminari, presenti nella

maggior parte delle zone delle arterie normali, inibiscono l'espressione delle molecole di adesione dei leucociti (21) ed incrementano la produzione di ossido nitrico (NO) da parte delle cellule endoteliali. Questa molecola oltre alle ben note proprietà vasodilatatrici, può agire come antinfiammatorio locale, limitando l'espressione di molecole di adesione.

Irregolarità locali nelle forze emodinamiche possono influenzare tali meccanismi cellulari che esercitano un'azione protettiva nei confronti dell'insorgenza della lesione aterosclerotica e rendono parzialmente conto della distribuzione focale delle lesioni aterosclerotiche (4).

Il primo evento della formazione di placche aterosclerotiche è quindi l'insieme di accumulo di lipidi, ossidazione e attivazione endoteliale cui fa seguito il reclutamento dei leucociti nel sito della lesione. Le principali cellule ematiche che si ritrovano normalmente nell'ateroma in via di sviluppo sono cellule di tipo mononucleato (monociti che si trasformano in macrofagi e linfociti). La chemiotassi dei leucociti verso il sito della lesione e l'espressione di molecole di adesione sono mediate sia dai prodotti dell'ossidazione lipidica che da citochine pro-infiammatorie, una classe di mediatori di natura proteica. Studi *in vitro* suggeriscono, per esempio, che le LDL ossidate promuovono la chemiotassi dei leucociti. Inoltre le lipoproteine ossidate possono stimolare la produzione, da parte delle cellule della parete vasale, di citochine chemiotattiche come la MCP-1 (monocyte chemoattractant protein- 1) (23). I leucociti riescono ad aderire alle cellule endoteliali grazie a molecole di adesione e a recettori specifici espressi sulla superficie di cellule endoteliali dell'arteria. (Fig. 4) Tra queste molecole, di particolare interesse sono la VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) e la ICAM-1 (intercellular adhesion molecule -1) che fanno parte della famiglie delle immunoglobuline e la P-selectina che fa parte di una famiglia distinta di recettori per i leucociti, noti come selectine (24).

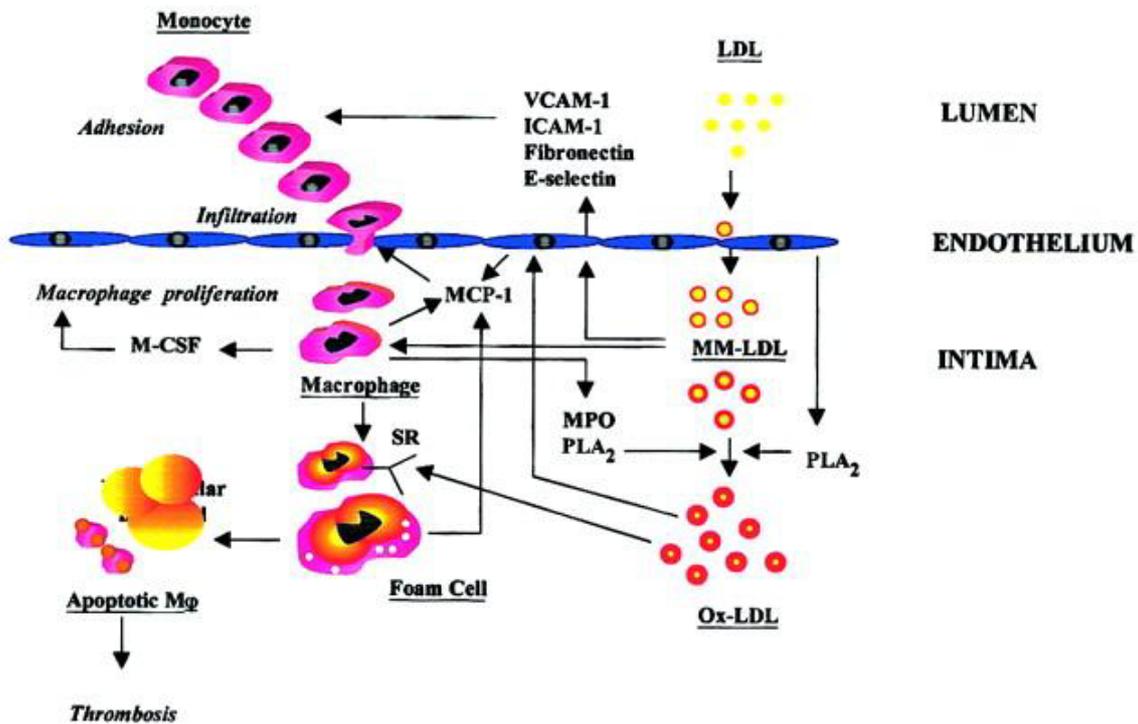


Figura 4 Ruolo dell'ossidazione delle LDL nello sviluppo delle lesioni aterosclerotiche (22)

Dopo avere aderito alla superficie delle cellule endoteliali dell'arteria interagendo con i recettori specifici, i leucociti attraversano lo strato endoteliale e si insediano nella tonaca intima. I monociti si differenziano in macrofagi e successivamente fagocitano ingenti quantità di lipidi e si trasformano in cellule schiumose. Infatti, le LDL ossidate accumulate nella lesione precoce sono riconosciute e fagocitate dai macrofagi mediante recettori specifici, come per esempio il recettore LOX-1, il CD36 o il recettore "spazzino" (Scavenger Receptor – SR) (25). Poiché l'espressione di questi recettori non è inibita dagli elevati livelli di colesterolo intracellulare, i macrofagi possono assorbire continuamente LDL fino a diventarne colmi e assumere l'aspetto di cellule schiumose (foam cells). Tali cellule possono accumularsi nella parete vasale e contribuire all'accrescimento della lesione. D'altra parte alcune di esse possono andare incontro a morte per apoptosi inducendo la formazione di un nucleo (core) necrotico ricco di lipidi, un aspetto caratteristico di placche aterosclerotiche.

La lesione a questo stadio è definita “stria lipidica”, proprio perché si è verificato solo l’accumulo di lipidi, liberi o sotto forma di cellule schiumose. Lesioni di questo tipo non hanno manifestazioni cliniche ma possono essere diagnosticate ecograficamente.

1.1.3.2 Progressione della lesione aterosclerotica

Anche se la stria lipidica solitamente precede lo sviluppo di una placca aterosclerotica in stadio avanzato, non tutte le strie lipidiche progrediscono in ateroma. Le strie lipidiche si riscontrano in popolazioni che non sono predisposte a lesioni avanzate per esempio indigeni africani. Mentre l’accumulo di macrofagi infarciti di lipidi è la caratteristica della stria lipidica, l’accumulo di tessuto fibrotico contraddistingue la lesione aterosclerotica avanzata (5).

Alcuni fattori di crescita o citochine prodotte dai fagociti mononucleati sono in grado di stimolare la migrazione verso l’intima e la proliferazione delle cellule muscolari lisce della tonaca media. L’interleuchina 1 (IL-1) ed il tumor necrosis factor- α (TNF α) costituiscono esempi di citochine che possono indurre produzione locale di fattori di crescita, inclusi il fattore di crescita di derivazione piastrinica (platelet-derived growth factor PDGF) e il fattore di crescita per i fibroblasti (fibroblast growth factor FGF). Altre citochine, in particolare l’interferone γ sintetizzato dalle cellule T attivate, presenti nella lesione, è in grado di inibire la proliferazione delle cellule muscolari lisce. Tali esempi illustrano come l’aterogenesi dipenda verosimilmente da un complesso equilibrio tra mediatori in grado di promuovere la formazione della lesione e altri meccanismi che possono inibirla.

Le cellule muscolari lisce sintetizzano la maggior parte della matrice extracellulare della lesione aterosclerotica complessa (5). È ormai un concetto acquisito che la proliferazione delle cellule muscolari lisce all’interno dell’intima rappresenta la “conditio sine qua non” per la formazione di lesioni aterosclerotiche avanzate. (Fig.5)

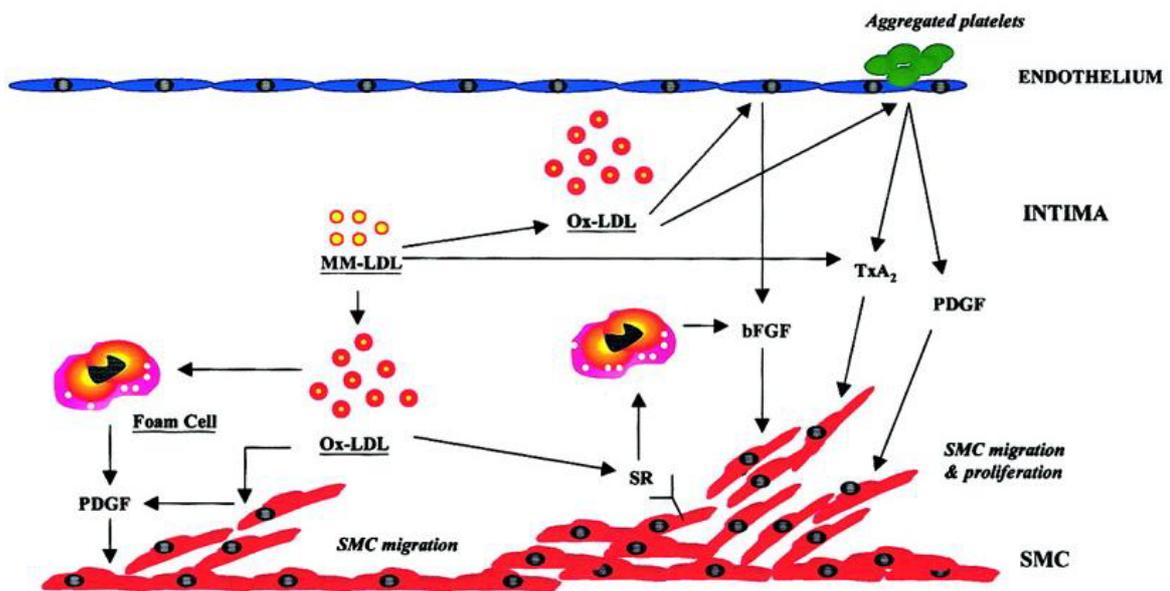


Figura 5 Migrazione e proliferazione delle cellule muscolari lisce (21)

In passato l'unica attività funzionale attribuita alla cellula muscolare liscia era la capacità contrattile. Successivamente, studi su colture cellulari hanno dimostrato che essa è in grado di sintetizzare e di secernere molti tipi di collagene, e numerosi tipi di proteoglicani. Le cellule muscolari lisce in coltura si differenziano in due distinti fenotipi. Il primo di questi, il fenotipo contrattile si pensa sia correlato alla contrattilità cellulare, in quanto le cellule contengono un gran numero di miofibrille, costituite da filamenti di actina e miosina, diffuse in tutto il citoplasma. Questo tipo di cellula non è in grado di rispondere a stimoli mitogeni quali il PDGF. Quando una cellula muscolare liscia viene stimolata in modo adeguato, essa abbandona il fenotipo contrattile e si trasforma in una cellula a minor contenuto di miofilamenti che possiede un reticolo endoplasmico rugoso ed un apparato di Golgi molto sviluppati. Questa cellula appartiene al fenotipo sintetizzatore di collagene e proteoglicani che è determinante nella formazione di grosse lesioni aterosclerotiche. Le citochine e fattori di crescita, prodotti nelle fasi iniziali del processo aterosclerotico, sono in grado di stimolare la migrazione delle cellule muscolari lisce dalla tonaca media alla tonaca intima dove queste rispondono agli stimoli mitotici (26). La proliferazione delle cellule

muscolari lisce rappresenta una fase di transizione critica, in quanto queste sono in grado di generare abbondante matrice extracellulare e formare una lesione fibrolipidica che va a sostituire il semplice accumulo lipidico delle fasi iniziali. L'accumulo di lipidi viene circondato da formazioni fibrose fino ad esserne quasi totalmente sostituito. La fibrosi è anche un fattore stabilizzante la lesione, poiché crea una specie di capsula intorno al core lipidico rendendo la placca più resistente alla rottura.

Il fattore di crescita trasformante β (TGF- β) è un esempio di molecola che stimola intensamente la produzione di collagene interstiziale da parte delle cellule muscolari lisce. Tuttavia le cellule muscolari lisce nelle lesioni aterosclerotiche complicate si replicano piuttosto lentamente. In effetti l'ateroma avanzato spesso ha carattere principalmente fibroso, mentre manca l'aspetto ipercellulare caratteristico della lesione precoce. Con l'ingrandirsi della lesione, le cellule muscolari lisce e i macrofagi, risentono della carenza di sostanze nutritive e dell'ipossia e possono andare incontro ad apoptosi.

La calcificazione è un altro fenomeno spesso riscontrato nelle placche di tipo avanzato. Il deposito minerale si verifica sia sui residui delle cellule morte che sui lipidi extracellulari, rimpiazzando a volte l'intero core lipidico. Inoltre, nelle placche aterosclerotiche avanzate si riscontra la presenza di proteine specializzate nel legare il calcio, come l'osteocalcina, l'osteopontina e le proteine morfogenetiche del tessuto osseo.

Il rimodellamento della lesione può avvenire anche in seguito all'espressione e attivazione di metalloproteasi in grado di degradare la matrice extracellulare della lamina fibromuscolare della placca. Queste comprendono vari enzimi: collagenasi, gelatinasi, stromelisina che degradano i diversi costituenti della matrice. La loro attività è inibita da specifiche proteine tessutali ma nella placca vulnerabile, l'esposizione delle varie componenti cellulari alle citochine infiammatorie, altera l'equilibrio con un incremento della produzione di

metalloproteinasi e non di inibitori. Questi processi tendono quindi ad aumentare la fragilità delle placche, favorendone la rottura (27).

L'evoluzione delle lesioni aterosclerotiche è estremamente variabile per cui tutti i fenomeni descritti per le fasi iniziali e tardive possono avere più o meno rilevanza nelle diverse placche.

1.1.3.3 Complicazioni della lesione aterosclerotica

Le placche aterosclerotiche finora descritte possono ingrandirsi fino ad occludere il lume vasale anche del 90% senza manifestare segni clinicamente evidenti. Le manifestazioni cliniche dell'aterosclerosi sono dovute quasi esclusivamente alla complicazione della lesione per trombosi in seguito a tre eventi: l'ulcerazione della superficie endoteliale, la rottura della capsula fibrosa o l'emorragia dei microvasi interni alla lesione (27).

Nelle placche di stadio avanzato possono verificarsi rotture sia dello strato endoteliale che della capsula fibrosa. In corrispondenza di zone di denudazione limitata dell'endotelio si possono formare microtrombi ricchi di piastrine, imputabili all'esposizione della matrice altamente trombogena della membrana basale sottostante. La maggior parte di questi microtrombi probabilmente si dissolve senza dar luogo a manifestazioni cliniche attraverso un processo di fibrinolisi locale, riassorbimento e riparazione dell'endotelio. Altri trombi sono invece più grandi e possono occludere maggiormente il lume del vaso, riducendo il flusso del sangue e causando ipossia. La rottura dell'involucro fibroso della placca causa l'esposizione del core lipidico interno e la formazione di trombi di grandi dimensioni; questa è infatti la causa dei tre quarti degli eventi acuti.

Gli eventi trombotici possono verificarsi anche in seguito ad emorragia intrapacca, infatti, man mano che la lesione avanza, si sviluppano in abbondanza plessi di microvasi per fornire nutrimento alle cellule della lesione (5). La rottura di tali vasi scatena la cascata della coagulazione e provoca

trombosi in situ. Le placche aterosclerotiche spesso contengono fibrina ed emosiderina, che indicano episodi pregressi di emorragia intrapacca. La trombina, la principale proteina costituente il trombo, è anche in grado di modulare molti aspetti della funzionalità della cellula vasale; tra gli altri effetti, può stimolare la proliferazione e il rilascio di citochine da parte delle cellule muscolari lisce e la produzione di fattori di crescita da parte delle cellule endoteliali, modificando ulteriormente la struttura della placca.

I trombi, formati sulla superficie o all'interno della lesione, possono causare eventi acuti in due modi: 1) possono ingrandirsi in situ fino ad occludere completamente il vaso bloccando il flusso sanguigno dal punto in cui si sviluppa la placca; 2) possono staccarsi dal sito della lesione e seguire il flusso sanguigno fino a bloccarsi in una ramificazione vasale di piccolo calibro, impedendo l'afflusso di sangue da quel punto in poi. Entrambi questi eventi impediscono la corretta ossigenazione dei tessuti inducendone la necrosi (28).

1.1.4 Manifestazioni cliniche dell'aterosclerosi

L'aterosclerosi ha manifestazioni cliniche diverse a seconda del letto vascolare colpito. Durante le fasi iniziali dello sviluppo dell'ateroma, la placca solitamente cresce nella direzione opposta al lume. I vasi colpiti da aterosclerosi tendono ad aumentare di diametro, un tipo di rimodellamento noto come allargamento compensatorio. Fino a quando la placca non copre più del 40% circa della circonferenza della lamina elastica interna, essa non comincia invadere il lume dell'arteria. Dunque per la maggior parte della sua evoluzione, l'ateroma non determina una stenosi che possa limitare il flusso ematico. Le stenosi occludenti sono solitamente la caratteristica della fase tardiva dell'evoluzione della placca.

Gli eventi clinici sono diversi a seconda che l'occlusione del vaso sia parziale, con riduzione del flusso ematico, o sia totale, con blocco totale del flusso. Gli effetti della riduzione dell'afflusso di sangue ai tessuti, sono più o meno gravi a seconda che l'apporto di ossigeno sia assente o ridotto.

La riduzione del flusso ematico nelle arterie coronarie determina solitamente angina pectoris e, in caso di occlusione totale, causa eventi acuti come l'infarto del miocardio. Gli eventi corrispondenti, in caso di aterosclerosi delle arterie del sistema nervoso centrale, sono l'ischemia cerebrale transitoria (Transient Ischemic Attack – TIA) e l'ictus. Se colpisce la circolazione periferica, l'aterosclerosi può determinare claudicatio intermittens o gangrena e danneggiando la funzionalità degli arti. Il coinvolgimento del circolo splanchnico può dare origine a ischemia mesenterica e infarto intestinale. L'aterosclerosi può interessare il rene determinando stenosi dell'arteria renale, contribuendo così alla patogenesi dell'ipertensione.

La crescita delle placche aterosclerotiche è un processo discontinuo e non lineare, con periodi di relativa quiescenza alternati a episodi di rapida evoluzione. Dopo un periodo “silente”, solitamente prolungato, l'aterosclerosi può divenire clinicamente manifesta. Molte di queste placche si manifestano attraverso sindromi stabili come l'angina pectoris o la claudicatio intermittens. D'altro canto, un evento clinico grave come un infarto miocardio o un ictus cerebrovascolare può essere la prima manifestazione dell'aterosclerosi. Lo stimolo ipossico derivante da attacchi ischemici ripetuti induce normalmente la formazione di vasi collaterali che consentono di mitigare le conseguenze di un'occlusione acuta di un'arteria coronaria. Molte lesioni che determinano sindrome aterosclerotiche acute, soprattutto nel circolo coronario, possono derivare da placche aterosclerotiche che non producono una stenosi emodinamicamente significativa ma sono suscettibili alla complicazione trombotica.

1.1.5 Fattori di rischio per l'aterosclerosi

Circa un milione di italiani ogni anno sono colpiti da infarto acuto del miocardio per aterosclerosi delle arterie coronarie. Invece l'aterosclerosi delle arterie cerebrali è responsabile dell'ictus, che rappresenta la seconda causa di morte e la

prima di invalidità permanente. Ridurre i fattori di rischio è il principale approccio clinico per la prevenzione delle patologie cardiovascolari (29). Il concetto di identificazione dei fattori di rischio si basa sulla premessa che la presenza di certi fattori personali e/o ambientali aumenta statisticamente il rischio di sviluppare una patologia, e che il mutamento di queste condizioni diminuisce il rischio. L'identificazione dei fattori di rischio fornisce un mezzo per ridurre l'incidenza di malattie coronariche attraverso l'eliminazione dei fattori modificabili. I fattori di rischio possono inoltre guidare le decisioni riguardo al trattamento farmacologico.

I fattori di rischio delle malattie coronariche sono distinti in fattori di rischio *modificabili e non modificabili*.

I fattori di rischio non modificabili comprendono: il sesso, l'età, la storia familiare e le caratteristiche genetiche.

Ovviamente tali fattori non possono essere corretti ma devono essere tenuti presente per la determinazione del rischio generale di sviluppare la patologia in futuro.

E' stato osservato che l'incidenza della patologia cardiovascolare è due volte superiore negli uomini rispetto alle donne e il 60% degli eventi coronarici avvengono negli uomini (1). L'inizio delle malattie cardiovascolari sintomatiche avviene generalmente 10 anni prima negli uomini anche se l'incidenza delle malattie cardiovascolari nelle donne aumenta rapidamente alla menopausa.

La maggioranza degli infarti del miocardio e degli ictus avvengono in pazienti con una età superiore a 65 anni (1). Infatti l'aterosclerosi è una patologia a lenta progressione e sebbene un ispessimento delle arterie sia riscontrabile già dalle prime decadi di vita, le complicanze fatali si verificano quando la lesione è fortemente avanzata.

La predisposizione genetica può spiegare la presenza di molteplici casi di patologie cardiovascolari nella stessa famiglia. Però poiché non sono noti tutti i

fattori genetici che costituiscono un rischio, la presenza di casi di malattia in famiglia, soprattutto se ad insorgenza precoce, costituisce un vero e proprio fattore di rischio. Le caratteristiche genetiche già accreditate come fattori di rischio saranno descritte nel paragrafo successivo.

Tra i fattori di rischio modificabili rientrano: il fumo, la sedentarietà, l'ipertensione, le dislipidemie, il diabete mellito e l'obesità.

Queste ultime sono patologie che possono essere trattate con un'adeguata terapia farmacologica ma sono spesso fortemente influenzate da caratteristiche genetiche. La riduzione dei fattori di rischio modificabili già dalla giovane età potrebbe diminuire gli eventi cardiovascolari.

Fumo

Si stima che il fumo di sigaretta sia la causa primaria, ma prevenibile, di morte prematura negli USA, infatti il fumo moltiplica l'effetto di altri fattori di rischio coronarico agendo in sinergia. Si pensa che l'uso dei prodotti del tabacco riduca il colesterolo HDL, aumenti significativamente il rischio di vasospasmo e favorisca l'aggregazione piastrinica (1).

Iipertensione

L'ipertensione contribuisce all'aterogenesi sia producendo stress emodinamico sulla parete arteriosa che promuovendo i processi ossidativi. Numerosi studi epidemiologici in popolazioni geograficamente ed etnicamente diverse hanno stabilito una relazione diretta fra l'elevazione della pressione arteriosa e l'incidenza di malattie cardio- e cerebrovascolari. Le concentrazioni di angiotensina II, il principale prodotto del sistema renina-angiotensina sono spesso aumentate nei pazienti con ipertensione arteriosa. L'angiotensina II è un potente vasocostrittore, che contribuisce all'aterogenesi stimolando la proliferazione di cellule muscolari lisce (30). Inoltre, l'angiotensina II

incrementa anche l'attività della lipossigenasi delle cellule muscolari lisce promuovendo l'ossidazione delle LDL e i processi infiammatori.

Dislipidemie

Come precedentemente descritto, numerosi studi epidemiologici hanno dimostrato una relazione continua e crescente tra il colesterolo LDL e l'incidenza di eventi cardiovascolari; invece per il colesterolo HDL è stata riportata una correlazione inversa. Per quanto riguarda i trigliceridi, non è chiaro se l'ipertrigliceridemia sia un fattore di rischio indipendente per l'aterosclerosi oppure se essa sia correlata con le alterazioni metaboliche associate all'ipertrigliceridemia ossia alla ridotta concentrazione di HDL, alla presenza di LDL piccole e dense oppure alla resistenza all'insulina (1).

Sedentarietà

Da un recente studio di meta-analisi è emerso che l'inattività fisica è associata ad un aumento dello spessore medio-intimale (Intima-Media Thickness – IMT) (33). L'IMT è un parametro normalmente utilizzato per valutare la presenza di ispessimento della parete arteriosa, caratteristica delle prime fasi dell'aterosclerosi. Dalla meta-analisi è emerso anche che l'esercizio fisico è in grado di migliorare alcune condizioni che costituiscono un rischio per l'aterosclerosi, come l'ipertensione, l'iperglicemia e l'insulino-resistenza.

Diabete

L'insulino resistenza è una componente eziopatogenetica fondamentale nel diabete di tipo 2 ed è frequentemente associata allo sviluppo di lesioni aterosclerotiche. E' possibile formulare delle ipotesi eziopatogeniche riguardo l'interazione tra il sistema insulinergico e la formazione della placca aterosclerotica. L'insulina normalmente riduce la concentrazione plasmatica degli acidi grassi liberi e il suo mancato effetto ne favorisce l'aumento. Nei

pazienti diabetici, in presenza di alte concentrazioni di glucosio, le lipoproteine possono essere modificate dalla glicazione (glicosidazione non enzimatica), che ne altera il riconoscimento e il legame da parte dei recettori. Per esempio, la glicazione delle LDL causa il prolungamento dell'emivita e quindi l'aumento della loro concentrazione plasmatica.

La continua interazione di aldosi con proteine può condurre alla formazione di prodotto di avanzata glicazione altamente reattivi definiti AGEs (Advanced Glycosilation Endproducts). Il continuo accumulo di AGEs in proteine a lunga emivita come quelle della membrana basale subendoteliale ne altera le caratteristiche e svolge un ruolo importante nello sviluppo di complicanze vascolari associate al diabete. Recentemente sono stati isolati e clonati recettori per tali prodotti finale di glicazione definiti RAGEs su cellule endoteliali e monociti. E' stato osservato che l'interazione degli AGEs con i propri recettori genera radicali dell'ossigeno modulando in tal modo la fisiologia endoteliale (32).

Obesità

L'obesità, cioè l'eccessivo peso corporeo associato ad un aumento del tessuto adiposo, ha un ruolo importante nello sviluppo della patologia aterosclerotica, influenzando tutte le patologie ad essa associate, come il diabete di tipo II, le dislipidemie e l'ipertensione (33, 34). Nel 1998 la World Health Organization (WHO) ha riconosciuto la dicitura di "Sindrome Metabolica" per indicare la presenza contemporanea di tali patologie. In uno studio su soggetti giovani, dai 15 ai 34 anni, morti per cause esterne, è stata osservata una forte associazione tra l'indice di massa corporea (BMI) e la presenza di lesioni aterosclerotiche (35).

Il tessuto adiposo non è solo un deposito passivo di riserve energetiche, ma un vero è proprio organo endocrino che produce diversi ormoni (adipocitochine) con effetti metabolici in tutto il corpo (pleiotropici). L'aumentata quantità di tessuto adiposo, caratteristica dell'obesità, altera la secrezione delle

adipocitochine, aumentando alcune di esse e riducendone altre. Infatti nel plasma di soggetti obesi sono presenti aumentati livelli di mediatori pro-infiammatori, come la leptina e ridotti livelli di adipocitochine anti-infiammatorie, come l'adiponectina. Gli effetti dell'adiponectina come mediatore anti-aterosclerotico saranno discussi in maniera più ampia nel relativo capitolo.

1.1.5.1 Predisposizione genetica all'aterosclerosi

Alcune varianti genetiche costituiscono un fattore di predisposizione allo sviluppo di aterosclerosi a parità di condizioni ambientali. L'insorgenza della patologia è determinata dall'interazione tra i fattori genetici e quelli ambientali. Non tutti i geni associati all'aterosclerosi sono ancora stati identificati, ma si stima che i geni candidati come fattori di rischio siano più di 400. L'identificazione dei tali geni risulta particolarmente difficile a causa di effetti confondenti come i fenomeni di pleiotropismo (un singolo locus genico determina fenotipi diversi tra loro) e di epistasi (un gene sopprime l'espressione fenotipica di un secondo gene mascherando un carattere ereditario) (17).

I principali geni candidati come fattori di rischio per lo sviluppo di patologie cardiovascolari sono riconducibili a diversi pathway metabolici

Emostasi

Il sistema emostatico è il responsabile dell'arresto del sanguinamento in seguito ad un danno vasale, per cui è anche implicato nel rischio di trombosi associato all'aterosclerosi. Alterazioni della funzione piastrinica e dei sistemi emocoagulativi e fibrinolitici, in parte geneticamente determinati, possono influenzare il rischio trombotico (36, 37). Tra tutti i fattori della cascata coagulativa, il fibrinogeno, il fattore VII, il fattore V, l'attivatore tissutale del plasminogeno (t-PA) e l'inibitore dell'attivatore del plasminogeno (PAI-1) sono apparsi i più coinvolti. È noto come il fibrinogeno, contribuendo ad incrementare la viscosità plasmatica e l'aggregazione piastrinica, faciliti la

coagulazione del sangue. L'attività plasmatica del fattore VII, primo proenzima coinvolto nella via estrinseca della cascata coagulativa, è considerata un altro importante fattore di rischio per l'insorgenza di trombosi e di eventi coronarici, ed è condizionata dall'interazione di fattori ambientali (dieta ad alto contenuto lipidico, peso corporeo, assunzione di contraccettivi orali, fumo) e genetici. Il fattore V è un altro fattore della coagulazione, la cui attività è modulata da uno dei principali regolatori della cascata coagulativa, il sistema proteina C/proteina S. Alterazioni a livello di questo naturale complesso inibitore conducono ad un aumentato rischio di trombosi. Il fattore V Leiden, variante genetica caratterizzata da una mutazione missenso che determina una sostituzione aminoacidica in uno dei siti proteolitici da parte della proteina C attivata, è forse il difetto ereditario del sistema della coagulazione più conosciuto, e si associa per l'appunto ad una certa resistenza alla degradazione del fattore V da parte per la proteina C attiva (38). Se la correlazione tra questo polimorfismo e l'insorgenza di trombosi venosa si rivela piuttosto forte, la maggioranza degli studi più o meno ampi e recenti non ha evidenziato alcuna associazione tra infarto miocardico e fattore V Leiden. Inoltre gli studi che hanno riportato risultati positivi e significativi li hanno riscontrati solo in presenza di altri fattori di rischio (ad esempio il fumo). Pertanto, la teoria che appare oggi più sostenibile è che questo polimorfismo non aumenti di per sé il rischio di sviluppare patologie cardiovascolari, ma che giochi un ruolo nella suscettibilità a queste interagendo con altri fattori ambientali e genetici. L'incremento in circolo di t-PA, principale enzima profibrinolitico endogeno, così come del PAI-1, è stato messo in relazione all'insorgenza di eventi trombotici acuti. Riguardo all'effetto delle varianti genetiche del PAI-1, ed in particolare della variante meglio indagata 4G per una guanina nella regione del promotore, sulla suscettibilità alla CHD si osservano risultati piuttosto controversi e non esaustivi (38, 39).

Integrità della parete vascolare

Livelli plasmatici elevati di un amminoacido solforato, l'omocisteina, costituiscono un fattore di rischio cardiovascolare accertato (40). Alcuni difetti a carico degli enzimi chiave del metabolismo dell'omocisteina sono responsabili di iperomocisteinemia, associata a manifestazioni cliniche precoci, quali l'ictus, la cardiopatia ischemica e l'arteriopatia obliterante degli arti. L'iperomocisteinemia di grado moderato è dovuta frequentemente a carenze nutrizionali di vitamine (acido folico, vitamina B6, vitamina B12), che normalmente agiscono come cofattori nel metabolismo degli amminoacido solforati. Per quanto riguarda la componente genetica è stata messa in luce una variante termolabile piuttosto frequente dell'enzima metilene-tetraidrofolato reduttasi (MTHFR), responsabile della rimetilazione dell'omocisteina a metionina. Il polimorfismo (C677T) altera la funzione dell'enzima MTHFR, causando una sostituzione aminoacidica nella regione codificante per il sito di legame dell'omocisteina (41). I soggetti omozigoti per questa variante genetica (TT) presentano livelli di omocisteina circolante più elevati rispetto agli eterozigoti o agli omozigoti della variante originaria (wild-type). L'iperomocisteinemia favorirebbe le manifestazioni anatomo-cliniche cardiovascolari attraverso un danno diretto sull'endotelio e attraverso un effetto pro-trombotico. È attualmente in corso di studio la possibilità di inibire l'aterogenesi attraverso l'assunzione di supplementi vitaminici che riducano le concentrazioni circolanti di omocisteina.

Metabolismo lipidico

Nei soggetti con patologie cardiovascolari si sono riscontrati elevati livelli di LDL, bassi livelli di HDL in associazione ad un aumento di trigliceridi e di colesterolo totale. La ricerca ha identificato i geni e le relative varianti che sono

coinvolti nelle alterazioni del metabolismo lipidico. Per quanto concerne l'incremento dei livelli di colesterolo LDL, le varianti genetiche del recettore delle LDL e delle apolipoproteina B, A ed E (apo-B, apo-A e apo-E) sono state le più indagate come potenziali responsabili. Sono note da tempo mutazioni a carico del gene del recettore delle LDL che causano ipercolesterolemia familiare e coronaropatia precoce. Nell'ipercolesterolemia familiare l'alterata funzionalità del recettore inibisce la captazione delle LDL, con il risultato di aumentarne i livelli plasmatici e prolungarne l'emivita favorendone l'ossidazione e gli effetti aterogeni. L'apo-E è presente nei chilomicroni, nelle VLDL, nelle IDL e nelle LDL ed è necessaria per la clearance di queste lipoproteine dal circolo essendo la proteina di legame al recettore delle LDL. Presenta tre diverse isoforme alleliche: la E2 possiede due residui di cisteina in posizione 112 e 158; la E3, presente nel 60-80% nei caucasici possiede la cisteina in posizione 112 e l'arginina in posizione 158; la E4 possiede due residui di arginina in posizione 112 e 158. L'isoforma apo E2 presenta ridotta affinità per il recettore delle LDL mentre l'apo E4 è caratterizzata da un legame più forte. Se paragonate all'allele più frequente e probabilmente originario, E3, le varianti genetiche E2 ed E4 si accompagnano sempre a livelli rispettivamente più bassi e più alti di colesterolo totale e LDL. L'associazione tra la presenza dell'allele E4 e rischio cardiovascolare è stata evidenziata in entrambi i sessi ed indipendentemente dai livelli di colesterolo LDL (42). Per quanto riguarda la apolipoproteina A è presente in tutte le HDL e si individuano tre diverse isoforme: l'apo A1, l'apo A2 e l'apo A4. Studi su modelli animali transgenici dimostrano che le tre isoforme proteggono dall'aterosclerosi indotta da diete ricche di grassi. I livelli di lipoproteina (a) (Lp(a)), una lipoproteina modificata, sono un fattore di rischio indipendente per l'aterosclerosi. Strutturalmente la Lp(a) è formata da una particella LDL e da una glicoproteina l'apo(a) legata all'apo B mediante un ponte disolfuro. Circa il 90% della variazione nel livello di Lp(a) è attribuibile a variazioni nel gene per Apo(a). Meno del 10% della variazione ereditata nel

livello di Lp(a) può essere attribuito a variazioni in altri loci genici (43). I meccanismi con cui la Lp(a) può aumentare il rischio di aterosclerosi sono molteplici. La Lp(a) può interferire con la generazione di plasmino, la proteina che degrada i trombi, a causa della similarità strutturale fra Apo(a) e plasminogeno. È stato dimostrato che la Lp(a), modificata dalla malondialdeide, viene rimossa dai recettori spazzini presenti sui macrofagi ad una frequenza 20 volte superiore a quella della Lp(a) nativa. Infatti la Lp(a) sembra essere più suscettibile a modifiche ossidative rispetto alle LDL e così può legarsi preferibilmente ai recettori spazzino.

Per quanto riguarda l'ereditarietà dei livelli di colesterolo HDL, studi su famiglie e gemelli hanno stimato il contributo della genetica in un valore del 35-50%, e hanno riscontrato una relazione tra familiarità per bassi valori di colesterolo HDL e suscettibilità familiare alla patologia cardiovascolare precoce. Le ultime ricerche riguardo al ruolo delle HDL si sono concentrate sul loro effetto antiossidante, in particolare in relazione ad una glicoproteina costituente, l'enzima paraoxonasi/arilesterasi (PON), che sembra giocare il ruolo di inibitore delle modificazioni di tipo ossidativo delle LDL.

1.1.6 Classificazione delle lesioni aterosclerotiche

La formazione di placche aterosclerotiche si verifica prevalentemente a livello delle arterie di medio calibro come le coronarie, la carotide, le arterie vertebrali e quelle che vascolarizzano gli arti inferiori, in particolare l'iliaca e le femorali superficiali. Anche le arterie di maggior calibro come l'aorta, possono essere interessate dal fenomeno e, in questo caso, le manifestazioni cliniche principali sono le dilatazioni aneurismatiche e gli effetti ad esse associate. Le lesioni aterosclerotiche più precoci si possono trovare già nei bambini e nei lattanti, mentre, le placche più avanzate compaiono in genere all'inizio dell'età adulta.

La stadiazione delle lesioni aterosclerotiche è stata inizialmente effettuata mediante l'osservazione macroscopica, utilizzando termini descrittivi come

“stria lipidica” o placca ateromatosa, fibrosa o rotta. Poiché la terminologia variava da studio a studio, il confronto dei dati era impossibile. Nel 1994-1995 il comitato scientifico dell’American Heart Association (AHA) ha ultimato la definizione di un sistema di stadiazione numerico, attualmente utilizzato in maniera universale (4, 5, 44). Questa classificazione è basata sull’analisi istologica della placca nel punto di massima estensione. Le caratteristiche peculiari di ogni stadio sono riportate di seguito e sono rappresentate graficamente nella figura 6.

Le lesioni I-III sono lesioni iniziali, precursori silenti delle lesioni avanzate (IV-VI) da cui originano gli eventi clinici. Nelle prime tre decadi di vita la composizione delle lesioni è prevalentemente lipidica e lo stadio è normalmente tra I e III; dopo questo periodo l’evoluzione della placca diviene imprevedibile (stadio IV-VI). La formazione delle lesioni dell’intima dell’aorta e delle arterie coronarie tipicamente subisce un’accelerazione a 25-30 anni per gli uomini e a 40-45 anni per le donne.

Stadio I – Le lesioni silenti appartenenti al I tipo presentano un ispessimento definito “adattivo”, poiché è considerato la risposta fisiologica dell’arteria agli insulti del flusso ematico. Queste lesioni sono tipiche dei neonati e dei bambini e sono presenti negli adulti nelle porzioni delle arterie meno suscettibili alle lesioni. Sono costituite da depositi lipidici rilevabili solo al microscopio elettronico.

Stadio II - Le lesioni di II tipo sono tipiche della pubertà e sono correlate alle concentrazioni plasmatiche di colesterolo. Sono costituite da macrofagi con inclusioni lipidiche (cellule schiumose) e leucociti T, disposti in strie di colore giallo grossolanamente individuabili sulla superficie dell’intima.

Stadio III- Le lesioni di III tipo, dette lesioni intermedie, transizionali o preateromi, sono tipiche degli adulti di giovane età. Oltre alle cellule schiumose, sono presenti accumuli lipidici extracellulari.

Stadio IV- Le lesioni avanzate di IV tipo presentano un'ulteriore deposizione e confluenza dei lipidi extracellulari con formazione di un "core lipidico" (ateroma).

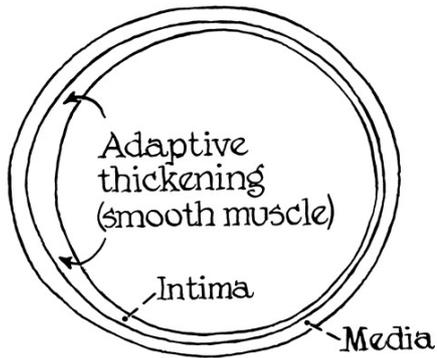
Stadio V- Le lesioni di V tipo sono caratterizzate dalla formazione di tessuto fibroso. Si distinguono tre sottoclassi:

- **Va**, costituite da fibroateroma con prevalenza di core lipidico;
- **Vb** (anche indicato come stadio VII) formate da fibroateroma con calcificazioni;
- **Vc** (anche indicato come stadio VIII) prevalentemente fibrose, con core lipidico quasi assente.

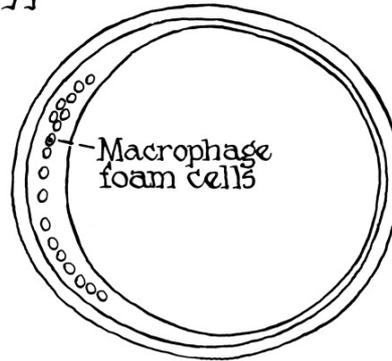
Stadio VI- Le lesioni di VI tipo sono definite complicate, in quanto sono quelle che più facilmente generano manifestazioni cliniche croniche o acute. Sono frequenti a partire dalla quarta decade di vita e si distinguono nei seguenti sottotipi:

- **VIa** caratterizzate da ulcerazioni della superficie endoteliale;
- **VIb** con presenza di ematoma o emorragia nei vasi interni alla lesione;
- **VIc** con trombi;
- **VIabc** con presenza di tutte le alterazioni suddette.

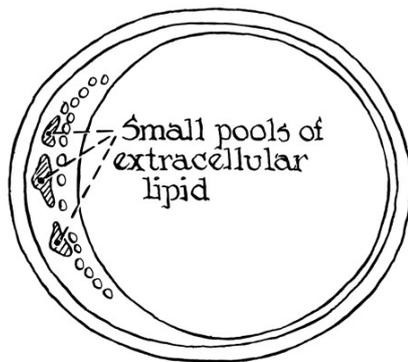
Coronary artery at lesion-prone location



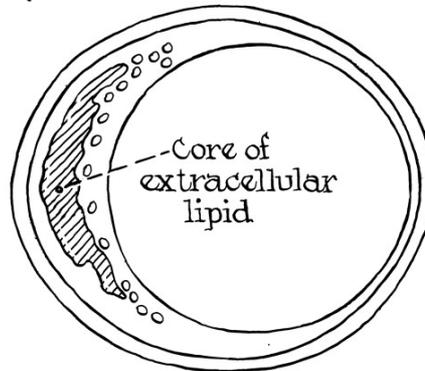
Type II lesion



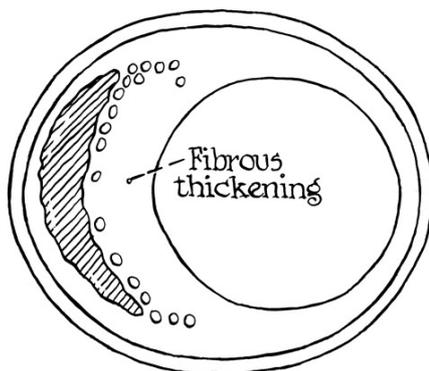
Type III (preatheroma)



Type IV (atheroma)



Type V (fibroatheroma)



Type VI (complicated lesion)

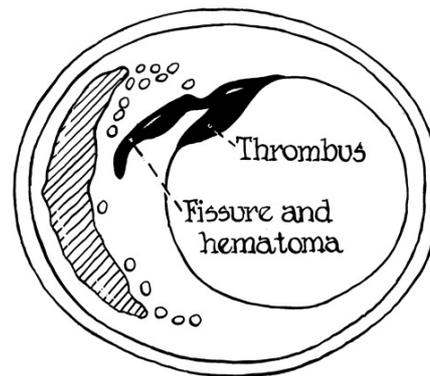


Figura 6 Classificazione delle lesioni aterosclerotiche secondo la American Heart Association (5)

1.2 Paraoxonasi e aterosclerosi

1.2.1 Fenomeni ossidativi nelle LDL associati a sviluppo di aterosclerosi

Nelle cellule le reazioni ossidative sono caratteristiche del metabolismo energetico e generano energia sotto forma di ATP. Se da una parte l'ossidazione è essenziale per il metabolismo, dall'altra diventa pericolosa a causa della produzione delle specie reattive dell'ossigeno (Reactive Oxygen Species - ROS), che possono provocare danni a carico delle cellule tissutali. Dal punto di vista biochimico, i radicali liberi sono molecole particolarmente instabili in quanto possiedono un solo elettrone, anziché due, nell'orbitale più esterno. Questo li porta a ricercare un equilibrio appropriandosi dell'elettrone delle altre molecole con le quali vengono a contatto, che in seguito diventano instabili e a loro volta ricercano l'elettrone mancante, innescando un meccanismo di instabilità a "catena". L'ossidazione di lipidi e proteine nelle lipoproteine è un processo estremamente importante nello sviluppo di lesioni aterosclerotiche (15).

I radicali liberi si formano naturalmente e costantemente all'interno dell'organismo e se sono in quantità minime aiutano il sistema immunitario nella difesa dai microrganismi patogeni. La loro produzione può però accelerarsi sotto l'influenza di:

- Fattori esterni come l'inquinamento atmosferico, l'esposizione a radiazioni ionizzanti, a prodotti chimici o al fumo;
- Fattori interni: tutte le forme di sofferenze dell'organismo come traumi, infezioni, intossicazioni e attività fisica intensa.

Quando nel bilancio fra fattori promotori e inibenti l'ossidazione, l'equilibrio pende a favore dei primi, si parla di "stress ossidativo". Gli effetti negativi dei radicali liberi divengono allora evidenti e possono condurre a morte della cellula:

- le membrane cellulari si alterano dal punto di vista strutturale (ossidazione dei fosfolipidi)
- le proteine interne alle cellule sono alterate e perdono la loro funzione
- il materiale genetico viene danneggiato.

In relazione all'aterosclerosi, la più importante reazione a catena indotta dai radicali liberi è la perossidazione lipidica. Il radicale innesca la perossidazione sottraendo H^+ dalla catena dell'acido grasso, in genere a carico di un diene non coniugato, cioè un atomo di carbonio posto tra due doppi legami. Le conseguenze sono l'alterazione strutturale e funzionale della membrana e la produzione a cascata di altri prodotti radicalici. Se i radicali liberi delle catene non vengono inattivati, la loro reattività chimica può danneggiare tutti i tipi di macromolecole cellulari. E' stato dimostrato *in vitro* che le specie reattive dell'ossigeno prodotte dalle cellule muscolari lisce e dai macrofagi, possono determinare l'idroperossidazione degli acidi grassi polinsaturi dei fosfolipidi presenti nelle LDL. I lipoidroperossidi si decompongono determinando la formazione di una varietà di sottoprodotti tossici, tra cui alcune aldeidi, come la malondialdeide (MDA), capaci di reagire con i gruppi ϵ -amminici dei residui di lisina presenti nella catena proteica dell'apo B delle LDL trasformandole in LDL ossidate (oxLDL) (20, 22). Per contrastare l'ossidazione, l'organismo ha diversi meccanismi di difesa, sia enzimatici che non enzimatici, spesso complementari in quanto agiscono in differenti compartimenti cellulari. Tra i primi si ricorda la superossido-dismutasi, la catalasi e la glutation-perossidasi, che decompongono rispettivamente l'anione superossido, l'acqua ossigenata e gli idroperossidi. Tra i secondi, sono da annoverare composti a basso peso molecolare che reagiscono con i composti ossidanti riducendo la loro capacità di produrre effetti dannosi, quali il glutatione, l'ubichinone e l'acido urico, prodotti dal normale metabolismo, e il tocoferolo (vitamina E), l'acido ascorbico (vitamina C) e i carotenoidi (vitamina A) contenuti in differenti alimenti (antiossidanti naturali) (45). Gli agenti antiossidanti riportano l'equilibrio

chimico nei radicali liberi grazie alla possibilità di fornire loro gli elettroni di cui sono privi. Il sistema antiossidante è perfezionato dalla possibilità che diversi composti antiossidanti possono interagire fra di loro producendo un effetto sinergico. Ne è un esempio il sistema vitamina E/vitamina C: la seconda mostra la capacità di rigenerare il tocoferolo dal suo radicale (tocoferile) potenziandone così l'attività antiossidante.

Le paraoxonasi, una famiglia di enzimi, sono un antiossidante endogeno, presente nelle HDL sieriche e nelle cellule dei vari tessuti. Il nome di tale enzima deriva dalla capacità di idrolizzare il paraoxon, un metabolita reattivo prodotto, per disulfurazione ossidativa dal sistema della citocromo P-450, a partire dal parathion contenuto negli insetticidi (46, 47).

L'attività sierica della paraoxonasi è inversamente correlata al rischio cardiovascolare (48). Bassi livelli dell'attività della proteina sono stati rilevati in pazienti con aterosclerosi, con ipercolesterolemia e con diabete. Studi clinici suggeriscono che la concentrazione della paraoxonasi e l'attività enzimatica siano un fattore predittivo del rischio cardiovascolare.

Negli ultimi anni vi è stato un interesse crescente sul ruolo protettivo che le lipoproteine ad alta densità (HDL) eserciterebbero sull'ossidazione delle LDL. La paraoxonasi, essendo associata alle HDL, potrebbe essere coinvolta nell'idrolisi degli idroperossidi fosfolipidici che si generano durante l'ossidazione delle LDL. Questa ipotesi si basa sull'osservazione che l'aggiunta *in vitro* di paraoxonasi purificata è efficace nel prevenire la perossidazione lipidica delle LDL indotta da ioni rame (49).

1.2.2 Caratteristiche dei geni della Paraoxonasi

La famiglia delle paraoxonasi consiste di tre membri: paraoxonasi 1, 2 e 3 (PON1, PON2 e PON3) codificati da tre diversi geni. Negli uomini questi geni presentano circa il 70% di omologia e sembra derivino da processi di

duplicazione genica a partire da un unico precursore (50). Sono localizzati in cluster sul braccio lungo del cromosoma 7 negli uomini (Fig.7).

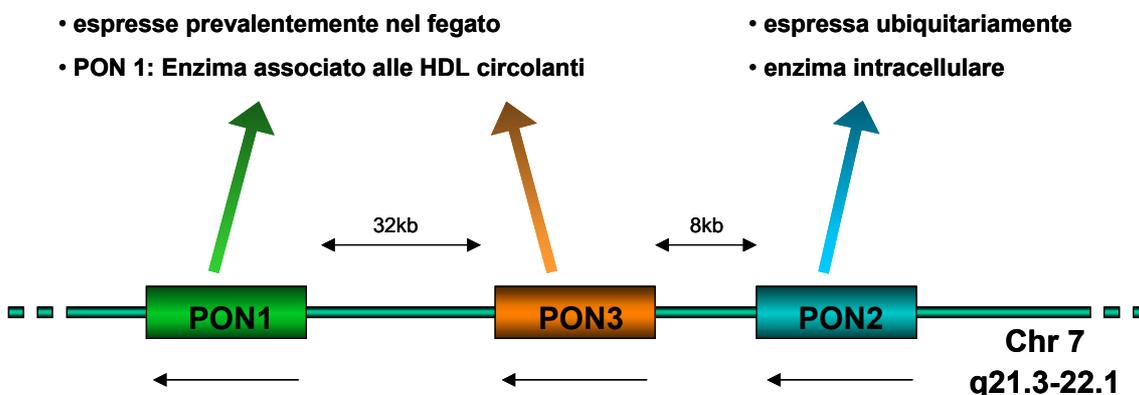


Figura 7 Cluster genico delle paraoxonasi (PON)

E' stato dimostrato che l'espressione di PON1 e PON3 è limitata esclusivamente al fegato, mentre PON2 è espresso ubiquitariamente (cuore, fegato, rene, placenta etc.). La differente espressione di questi geni comporta una diversa localizzazione degli enzimi. Mentre la paraoxonasi 1 e 3 sono associate alla HDL in circolo, la paraoxonasi 2 non è mai stata identificata nelle HDL ma sembra sia associata alle membrane cellulari (48).

1.2.2.1 PON1

Poiché la paraoxonasi 1 (PON1) è stata la prima ad essere individuata, è stata anche la più studiata. La paraoxonasi 1 è una glicoproteina calcio-dipendente di 43 kDa che circola associata all'apolipoproteina A-I nelle HDL; meno del 5% è associato alle VLDL e recentemente è stata dimostrata la sua presenza nei chilomicroni post-prandiali (51).

Studi cristallografici hanno evidenziato che PON1 è costituita da sei domini β , ciascuno dei quali contiene quattro foglietti (50). Nel canale centrale della proteina sono presenti due siti di legame per ioni calcio, uno è coinvolto

nell'azione catalitica e l'altro ha un ruolo strutturale. La paraoxonasi contiene tre residui di cisteina conservati in posizione aminoacidica 41, 284 e 352: i residui presenti in posizione 41 e 352, localizzati in prossimità dei terminali amminico e carbossilico, si legano a formare un ponte disolfuro; mentre il residuo in posizione 284, vicino al sito catalitico, resta libero in modo tale che il gruppo sulfidrilico funzioni da chelante e accettore di radicali, inibendo la propagazione delle reazioni ossidative.

Il gene *PON1* di circa 26 kb, è composto da 9 esoni. Sono noti dei polimorfismi genici associati ad alterazione dell'attività enzimatica: il polimorfismo Gln192Arg che determina la sostituzione di un residuo di glutammina con uno di arginino e il polimorfismo Met55Leu in cui la metionina è sostituita da una leucina (52).

E' stato dimostrato che il polimorfismo Glu192Arg altera l'attività enzimatica della proteina, riducendo l'attività di idrolisi del paraoxon. Il genotipo omozigote RR è stato associato a patologie cardiovascolari, ipercolesterolemia familiare e diabete di tipo 2, benché tali associazioni non siano state sempre verificate (52, 53).

Il polimorfismo Met55Leu è in grado di influenzare l'attività della paraoxonasi, infatti la presenza della metionina rende la proteina più suscettibile alla degradazione proteolitica forse modificando la capacità della paraoxonasi di associarsi alle HDL. Anche questo polimorfismo è associato, sebbene in maniera incerta, con patologie cardiovascolari (52, 54).

Recentemente in una popolazione finlandese è stato individuato un polimorfismo (Ile102Val) che risulta associato ad un incremento del rischio di cancro alla prostata (55).

Sono stati ritrovati anche tre polimorfismi nel promotore del gene, (-107), (-829) e (-907), capaci di ridurre i livelli di PON1 circolanti (56).

In aggiunta ai fattori genetici, anche i fattori ambientali modulano l'espressione di PON1 e la sua attività enzimatica. Studi su colture cellulari dimostrano che in

seguito all'incubazione con oxLDL e con il fattore di necrosi tumorale- α (TNF- α) si osserva una riduzione dell'mRNA di PON1 (57). Anche negli uomini una dieta ricca di lipidi e l'esposizione al fumo comportano una riduzione dell'attività di PON1 (58, 59). In contrasto, i polifenoli, le vitamine C ed E e un moderato consumo di alcol ne incrementano l'attività enzimatica antiossidante (60, 61).

La scoperta di Mackness e coll. relativamente all'associazione di PON1 con le HDL in circolo è stata decisiva nella determinazione del ruolo di PON1 nel metabolismo lipidico e nell'aterosclerosi (62). Numerosi studi dimostrano che PON1 inibisce l'ossidazione delle LDL e questo ruolo protettivo è confermato in esperimenti *in vitro* ed *in vivo*. Modelli knock-out per PON1 esposti ad una dieta ricca di grassi, sviluppano lesioni aterosclerotiche significativamente più grandi rispetto ai topi controllo e mostrano un incremento dello stress ossidativo (le HDL di questi topi falliscono nella protezione delle LDL contro l'ossidazione) (63). D'altra parte LDL, isolate da topi transgenici in grado di esprimere grandi quantità di PON1, sono risultate più resistenti all'ossidazione lipidica e alla formazione di lesioni aterosclerotiche (64, 65).

Questi studi *in vitro* ed *in vivo* attestano il ruolo protettivo della PON1 nell'ossidazione delle LDL. L'aumento di lipoproteine ricche di colesterolo e il loro accumulo nella parete arteriosa caratterizza gli stadi iniziali dell'aterosclerosi, pertanto PON1, agendo su questi processi è in grado di svolgere uno specifico ruolo protettivo dalle patologie cardiovascolari.

1.2.2.2 PON2

PON2 è una proteina di circa 44 kDa localizzata all'interno delle cellule ed espressa in maniera ubiquitaria nell'organismo (66). Infatti, l'RNA messaggero di PON2 è espresso anche nelle cellule della parete delle arterie come le cellule endoteliali e le cellule muscolari lisce, per cui potrebbe svolgere un'azione diretta nella protezione dei vasi dall'aterosclerosi. Anche PON2 presenta dei

polimorfismi associati con molteplici patologie. Il polimorfismo Ala148Gly (sostituzione di una alanina con una glicina) è associato a variazioni dei livelli plasmatici di LDL e di glucosio (67). Il polimorfismo Cys311Ser (sostituzione di una cisteina con una serina) è stato associato anche a patologia di Alzheimer (68).

In maniera simile a PON1, PON2 ha funzioni antiossidanti, che però svolge a livello intracellulare. Cellule transfettate per esprimere alti livelli di PON2, esposte a perossido di idrogeno o a fosfolipidi ossidati, mostrano bassi livelli intracellulari di marcatori di stress ossidativo (66).

In un recente lavoro, è stato descritto *in vivo* il ruolo svolto da PON2 nello sviluppo di lesioni aterosclerotiche (69). Per determinare la funzione antiossidante di PON2 nel processo aterosclerotico, i topi non esprimenti PON2 e topi di controllo sono stati esposti per 15 settimane ad una dieta ricca di grassi. Rispetto ai controlli, nei topi PON2-deficienti sono state osservate lesioni aterosclerotiche più grandi e le LDL isolate sono risultate più suscettibili all'ossidazione, dimostrando che PON2 effettivamente possiede proprietà antiaterogene.

1.2.2.3 PON3

PON3 è una proteina di circa 40 kDa associata alle HDL in circolo anche se in concentrazioni ridotte rispetto a PON1 (70). Due sostituzioni amminoacidiche sono state identificate nel sud Italia: S311T e G324D ma non sono state riportate conseguenze funzionali in seguito alla presenza di questi due polimorfismi (71). Similmente a PON1 e PON2 anche PON3 possiede proprietà antiossidanti. È stato descritto che PON3 purificata dal siero dei conigli è capace di inibire l'ossidazione delle LDL *in vitro* (70, 72) e che PON3 è più potente di PON1 nella protezione delle LDL contro l'ossidazione. Questa proteina è stata l'ultima della famiglia ad essere isolata, motivo per cui gli studi relativi alla sua funzione sono ancora pochi.

1.3 Infiammazione e aterosclerosi

L'aterosclerosi è stata tradizionalmente considerata una patologia strettamente legata all'iperlipidemia, in base al fenomeno di accumulo di lipidi nella parete vasale. Il legame tra dislipidemie e rischio cardiovascolare è stato ben definito sia da studi di associazione nell'uomo che da studi *in vivo* su modelli animali. Nell'ultima decade è stato evidenziato il ruolo fondamentale dell'infiammazione nella patogenesi dell'aterosclerosi; infatti oggi questa è definita come una patologia a base infiammatoria. L'infiammazione è il processo che collega gli effetti dell'iperlipidemia allo sviluppo della placca, sia nelle fasi iniziali che in quelle tardive. Inoltre, è fondamentale nella transizione da placca stabile a placca instabile e quindi nella conversione dell'aterosclerosi da patologia cronica a patologia acuta.

E' ben definito che le cellule endoteliali esprimono molecole di adesione per i leucociti in risposta a prodotti dell'ossidazione lipidica. La molecola di adesione Vascular Cell Adhesion Molecole-1 (VCAM-1) lega specificamente le classi di leucociti normalmente ritrovate nelle lesioni aterosclerotiche, i monociti e i linfociti T. Alcune citochine pro-infiammatorie (interleuchina 1β , IL- 1β , e Tumor-Necrosis Factor- α , TNF- α), rilevate nelle lesioni aterosclerotiche, sono in grado di indurre l'iper-espressione di VCAM-1 in cellule endoteliali (73). Varianti ipomorfiche di VCAM-1 in topi suscettibili all'aterogenesi mostrano una ridotta formazione di placche (74). In sostanza la molecola di adesione VCAM-1 non solo media la diapedesi di cellule infiammatorie ma è anche indotta da stimoli infiammatori. La diapedesi dei leucociti attraverso le cellule endoteliali è una migrazione direzionale guidata da un gradiente di citochine chemotattiche (chemochine). Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1) è una chemochina espressa ad alti livelli nelle lesioni aterosclerotiche. Topi suscettibili all'aterosclerosi che mancano di MCP-1 o del suo recettore CCR2

mostrano un ridotto accumulo di macrofagi e lipidi nel sito della lesione (75, 76).

I monociti infiltrati nell'intima delle arterie subiscono delle evoluzioni che li portano ad aumentare di numero e a diventare macrofagi e poi cellule schiumose. Il Macrophage Colony-Stimulating Factor (M-CSF), presente ad elevati livelli nelle placche, stimola la duplicazione dei monociti e induce l'espressione di recettori per le lipoproteine ossidate, lo scavenger receptor (SR) e il CD36, che mediano la trasformazione in cellule schiumose (77). La delezione di M-CSF riduce l'accumulo di macrofagi e ritarda lo sviluppo di placche (78).

Nelle fasi avanzate dell'aterogenesi l'infiammazione è coinvolta sia nell'accrescimento della lesione che nella sua destabilizzazione. Alcuni fattori di crescita secreti dai macrofagi stimolano la proliferazione delle cellule muscolari lisce (SMC) responsabile dell'evoluzione della lesione verso la fibrosi. Il ruolo dell'infiammazione nella destabilizzazione della placca è riconducibile sia alla distruzione endoteliale che all'induzione della degradazione della matrice extracellulare. Linfociti T killer stimolati da mediatori pro-infiammatori possono svolgere la loro azione citolitica sulle cellule endoteliali, causando la distruzione dello strato endoteliale. Citochine come IL-1 β e TNF- α sono capaci di aumentare l'espressione di metalloproteinasi (MMP) che, degradando il collagene della matrice extracellulare, assottigliano la capsula fibrosa (79). L'iper-espressione di diversi tipi di MMP è stata riscontrata nelle placche aterosclerotiche (80, 81). La distruzione dello strato endoteliale e la degradazione della matrice fibrosa rendono la placca più vulnerabile alla rottura e alla trombosi.

1.3.1 Il pathway della 5-lipossigenasi

I prostanoidi (prostaglandine, trombossani e leucotrieni) sono una classe di composti derivati dall'acido arachidonico con effetti sulla risposta immunitaria, l'infiammazione e la trombosi. La sintesi di questi mediatori è iniziata dalla reazione della fosfolipasi A2 che libera acido arachidonico dai fosfolipidi di membrana. Una volta generato, l'acido arachidonico può essere metabolizzato dalle ciclossigenasi per generare prostaglandine e trombossani o può essere il substrato per la 5-lipossigenasi (5-LO) per la sintesi di leucotrieni (LT) (82). La 5-lipossigenasi e i leucotrieni sono stati i più studiati in relazione all'aterosclerosi.

La 5-LO catalizza la reazione di conversione dell'acido arachidonico in acido 5-idroperossieicosatetraenoico (5-HPETE) e poi la sua trasformazione in leucotriene A₄ (LTA₄). Questa reazione necessita di una proteina attivante, la FLAP (5-LO activating protein) che agisce legando l'acido arachidonico e trasferendolo alla 5-LO facilitandone l'attività enzimatica. Il LTA₄ prodotto dalla 5-LO viene metabolizzato da due diversi enzimi: la LTA₄ idrolasi (LTA₄-H) che sintetizza il leucotriene B₄ e la LTC₄ sintasi (LTA₄-S) che introduce una molecola di glutatione e genera il leucotrieni C₄, D₄ ed E₄, anche detti cisteinil-leucotrieni (Fig. 8).

L'espressione della 5-LO è ristretta ai leucociti, ma il prodotto della reazione che questa catalizza, il LTA₄, può essere rilasciato all'esterno della cellula e utilizzato per la sintesi di LT da altre cellule vicine, prive di 5-LO, ma esprimenti LTA₄-H e LTA₄-S. Questo tipo di sintesi è detto "biosintesi transcellulare" ed è un meccanismo di amplificazione dell'infiammazione.

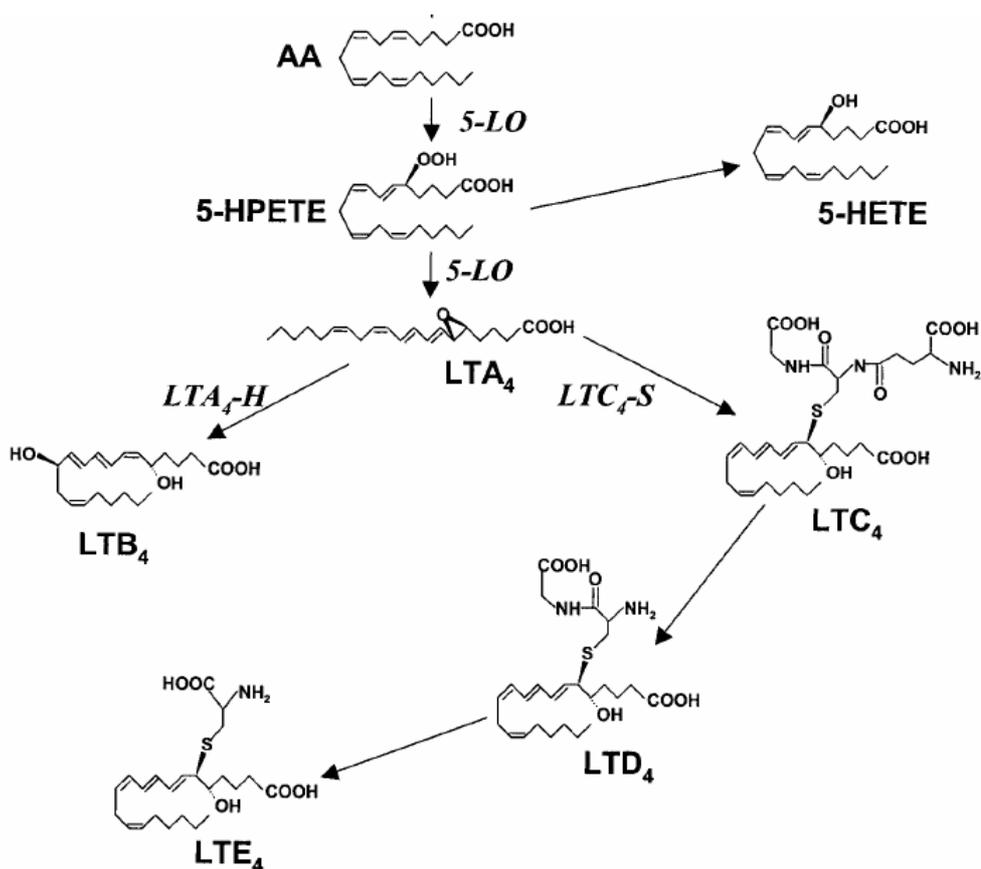


Figura 8 Schema della sintesi dei leucotrieni (82)

L'espressione di LTA₄-H e LTA₄-S e la sintesi di LT avvengono in un numero considerevolmente elevato di cellule tra cui le cellule endoteliali, che, possedendo anche i recettori per i LT, sviluppano un meccanismo di secrezione autocrina. La tappa enzimatica catalizzata dalla 5-LO è il punto di regolazione per la sintesi dei LT; le cellule endoteliali possono generare LT solo se nelle vicinanze sono presenti leucociti che esprimono 5-LO e producono LTA₄ (82).

I LT hanno effetti pro-infiammatori nello sviluppo delle lesioni aterosclerotiche: inducono la produzione di citochine pro-infiammatorie, come IL-1 (83); stimolano la proliferazione di linfociti e l'attività delle cellule natural killer; inducono l'attivazione delle cellule endoteliali mediante la produzione di specie reattive dell'ossigeno e l'espressione di molecole di adesione che mediano la diapedesi dei leucociti (84); stimolano la proliferazione delle SMC (85).

Uno studio di linkage ha identificato l'associazione di un aplotipo di 4 polimorfismi nel gene della FLAP con un rischio due volte maggiore di infarto miocardio e ictus (86)

Varianti del promotore nel gene codificante per la 5-LO (per delezione o aggiunta di siti di legame per il fattore trascrizionale Sp1) sono state associate ad elevato IMT (87).

In placche di modelli murini suscettibili all'aterosclerosi sono stati riscontrati alti livelli di 5-LO (88). Un aumento delle cellule positive per l'espressione di 5-LO è stato osservato anche in placche umane in maniera correlata con la progressione della lesione (89). Inoltre, sono stati trovati anche dei legami con l'instabilità della placca carotidea. Infatti, in soggetti sintomatici sono stati osservati livelli di 5-LO, LTB₄ e metalloproteinasi-2 e -9 più alti rispetto a soggetti asintomatici (90).

1.4 L'adiponectina nell'aterosclerosi

Le citochine secrete dal tessuto adiposo (adipocitochine) hanno effetti pleiotropici regolando il metabolismo cellulare nei diversi tessuti e partecipando alla regolazione dello stato infiammatorio. L'obesità influenza i livelli di alcune adipocitochine, infatti in soggetti obesi sono stati riscontrati aumentati livelli di resistina e leptina e ridotti livelli di adiponectina. Queste alterazioni sono ritenute alla base dell'implicazione dell'obesità nella patogenesi dell'aterosclerosi. D'altra parte in soggetti con patologie cardiovascolari sono state riscontrate simili alterazioni delle adipocitochine indipendentemente dalla presenza di obesità. Paradossalmente, le adipocitochine con effetti negativi per l'integrità vascolare sono presenti ad alti livelli, mentre quelle con effetti benefici sono presenti a bassi livelli. La leptina e la resistina, presenti a alti livelli nel plasma di soggetti affetti da aterosclerosi, inducono l'espressione di molecole d'adesione nelle cellule endoteliali, hanno effetti stimolanti su SMC e

macrofagi promuovendo la progressione delle lesioni aterosclerotiche. La leptina induce stress ossidativo nelle cellule endoteliali, stimola la produzione di citochine infiammatorie nei macrofagi e promuove la migrazione e la proliferazione delle SMC (91). La resistina nelle cellule endoteliali induce l'espressione di molecole d'adesione e stimola la produzione di citochine infiammatorie; nei macrofagi aumenta l'espressione di recettori per le oxLDL (91). Gli effetti di queste due adipocitochine sono indubbiamente dannosi per i vasi arteriosi.

L'adiponectina manifesta effetti contrari a quelli delle due citochine descritte. Gli effetti pleiotropici dell'adiponectina sono essenzialmente insulino-sensibilizzanti e anti-infiammatori (Fig. 9). Nella patogenesi dell'aterosclerosi l'adiponectina induce la riduzione di molecole d'adesione nelle cellule endoteliali e ne riduce lo stress ossidativo; sopprime la produzione di chemochine, e l'espressione del recettore scavenger, impedendo l'accumulo di lipidi; riduce la proliferazione delle SMC (92).

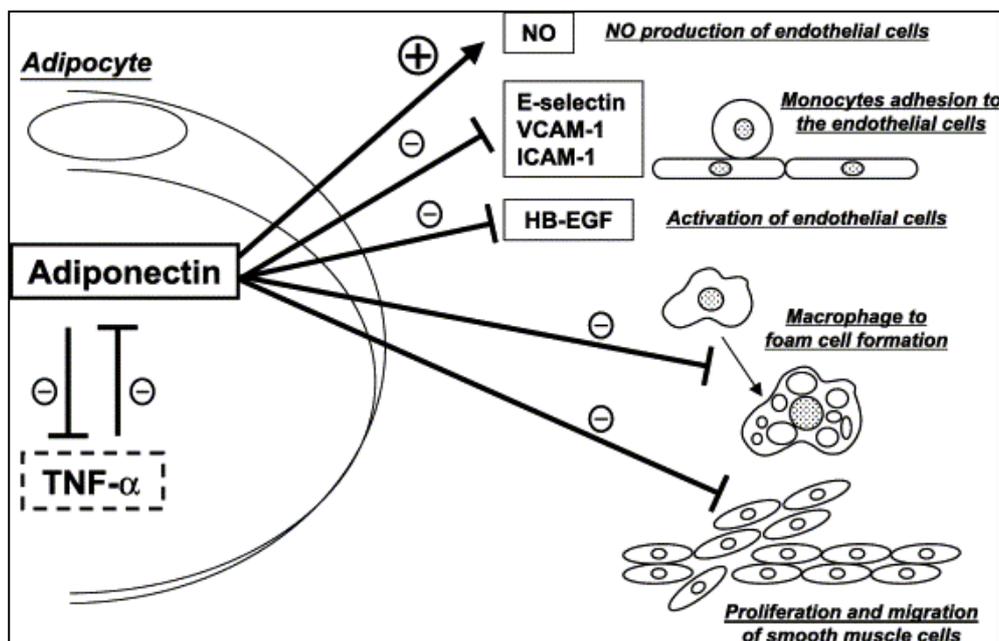


Figura 9 Schema degli effetti dell'adiponectina (93)

L'adiponectina circola nel plasma in tre diverse forme oligomeriche: come trimero (a basso peso molecolare - LMW), come esamero, cioè due trimeri (a

medio peso molecolare - MMW) e come oligomero di 12 o 18 subunità (ad alto peso molecolare - HMW) (Fig. 10). Recentemente è stato osservato che la forma ad alto peso molecolare è la più attiva ed è maggiormente coinvolta nella sensibilità all'insulina e nella patogenesi del diabete di tipo II (93). Gli effetti dell'adiponectina si manifestano attraverso 2 recettori, AdipoR1, espresso ubiquitariamente, e AdipoR2, espresso prevalentemente nel fegato (94, 95). In soggetti obesi è stata dimostrata la riduzione dei livelli di entrambi i recettori ed è stata ipotizzata la condizione di resistenza all'adiponectina.

L'espressione di adiponectina nell'aorta addominale tramite adenovirus è in grado di svolgere effetti benefici sullo sviluppo di lesioni aterosclerotiche. I conigli infettati da adenovirus esprime il gene dell'adiponectina hanno sviluppato placche di dimensioni ridotte e con un'espressione minore di VCAM-1 rispetto ai controlli (96). Questo studio ha evidenziato gli effetti benefici dell'adiponectina sulla patogenesi dell'aterosclerosi *in vivo*.

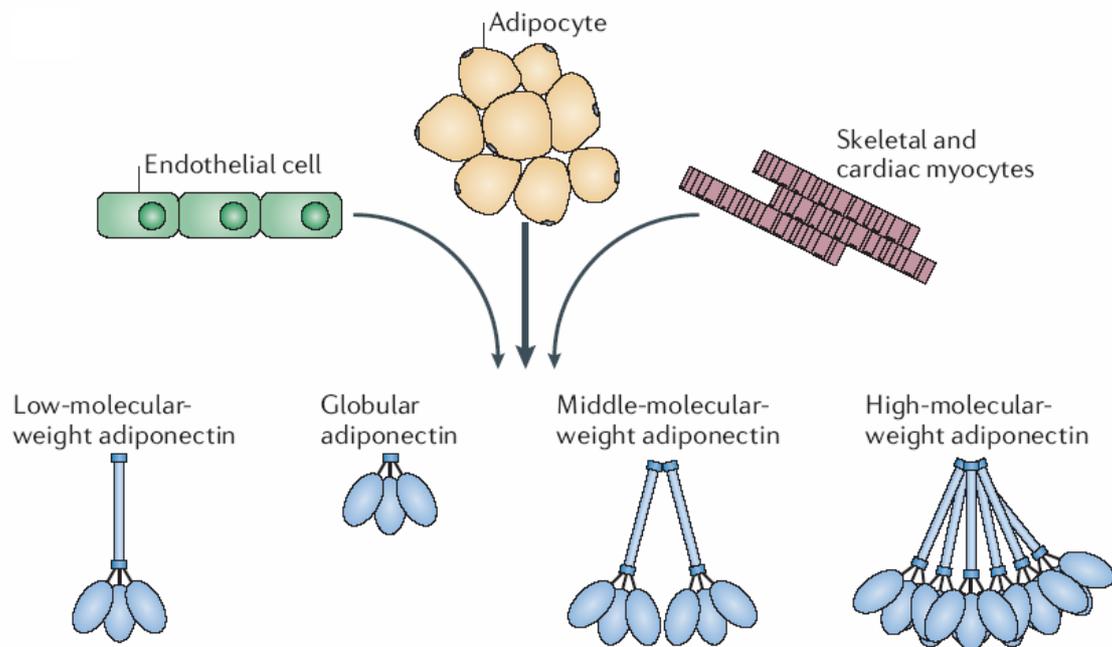


Figura 10 Tessuti che secernono adiponectina e forme oligomeriche (94)

L'interesse sull'adiponectina è crescente, non solo per i suoi effetti benefici, ma anche perché è stata ritrovata all'interno di placche aterosclerotiche. Mediante studi di immunistochemica l'adiponectina è stata evidenziata in arterie aterosclerotiche di ratto, mentre nessuna reattività veniva osservata nei vasi sani (97). Inoltre, mediante saggio ELISA, l'adiponectina è stata misurata anche in lesioni coronariche umane (98). Fino ad ora alcune ipotesi indicano che l'adiponectina si accumula in placche attraverso l'interazione con proteine della matrice extracellulare esposte dopo il danno endoteliale.

E' stato ipotizzato che l'accumulo di adiponectina nelle placche sia il responsabile della diminuzione dei livelli circolanti (97, 92).

Recentemente è stato dimostrato che le cellule endoteliali esprimono adiponectina (99), quindi elevati livelli di proteine trovate nelle lesioni aterosclerotiche potrebbero essere associati anche ad un incremento dell'espressione genica.

2. Scopo della tesi

Lo sviluppo di placche aterosclerotiche è la conseguenza dell'alterazione di equilibrio ossidativo, stato infiammatorio e stato metabolico. Allo scopo di fornire un contributo alla comprensione dello sviluppo dell'aterosclerosi è stato valutato se in placche aterosclerotiche di pazienti sottoposti ad endoarteriectomia carotidea si verificano alterazioni dell'espressione di geni coinvolti nei suddetti processi rispetto a tessuti non ateromatosi.

Per l'ossidazione ci si è proposti di studiare l'espressione della paraoxonasi 2, un enzima con funzione antiossidante, espresso ubiquitariamente, che potrebbe quindi svolgere un importante ruolo nella protezione delle pareti arteriose dall'aterosclerosi. Un altro obiettivo è stato lo studio della regolazione dell'espressione di PON2 in seguito a stress ossidativo.

Per la valutazione dello stato infiammatorio è stata misurata l'espressione di proteine coinvolte nella sintesi di leucotrieni, la 5-lipossigenasi e la sua proteina attivante (FLAP).

In modelli animali è stato dimostrato l'effetto atero-protettivo di una citochina secreta dal tessuto adiposo, l'adiponectina. Il terzo obiettivo è stato la quantizzazione dei livelli di mRNA dell'adiponectina per verificare se l'espressione a livello endoteliale sia responsabile degli elevati livelli di proteina nelle arterie ateromatose. Inoltre, per verificare se nella placca esiste un fenomeno di adiponectina-resistenza è stato effettuato il dosaggio dell'mRNA dei due recettori dell'adiponectina.

3. Materiali e metodi

3.1 Popolazione in studio e raccolta dei campioni

Campioni di carotide e sangue periferico sono stati prelevati da 54 pazienti consecutivi sottoposti a endoarterectomia carotidea per stenosi $\geq 70\%$ o per stenosi variabile dal 50 al 70% associata a sintomi clinici, in accordo alle linee guida dell'American Heart Association (AHA) (100). I pazienti sono stati arruolati presso il Dipartimento di Scienze Chirurgiche, Anestesiologiche - Rianimatorie e dell'Emergenza dell'Università degli Studi di Napoli Federico II. Sono stati definiti sintomatici i pazienti con una storia clinica di attacco transiente ischemico, ictus o *amaurosis fugax*. Lo studio è stato effettuato in accordo con la corrente versione della Dichiarazione di Helsinki e per ogni soggetto è stato raccolto un consenso informato. Le caratteristiche demografiche e biochimiche della popolazione studiata sono riportate in tabella 1.

Insieme alla placca è stata raccolta anche la regione immediatamente adiacente ad essa (Fig. 11). Durante l'intervento di endoarteriectomia sono state staccate dal vaso le tuniche intima e media, che costituivano il campione di partenza per le analisi. L'assenza di contaminazione da tunica avventizia è stata verificata tramite immunoistochimica. Ciascun campione è stato diviso in tre sezioni: 1) analisi istologica, 2) estrazione dell'RNA, 3) valutazione dello stato ossidativo e dosaggio di proteine. La sezione per l'analisi istologica è stata congelata immediatamente a -80°C . Le altre sezioni sono state omogenate rispettivamente in soluzione guanidinica contenente β -mercaptoetanolo (GTC/ β -mercaptoethanol) per l'estrazione di RNA e in PBS con probucolo come antiossidante per la valutazione dello stato ossidativo e i saggi ELISA.

Tabella 1 Caratteristiche generali della popolazione studiata (n=54)

Parametri	Totale	Maschi n=36	Femmine n =18
Età (<i>anni</i>)	67.5 ± 7.8	68.8 ± 7.4	64.8 ± 8.0
BMI (<i>kg/m²</i>)	26.2 ± 3.0	25.9 ± 3.0	26.7 ± 3.2
Fumatori % *	50.9	25 (62.5)	6 (31.6)
Terapia con statine %	14.6	17.9	7.7
Sintomatici %	70.6	77.1	56.3
Placche in altro sito %*	76.0	82.9	60.0
Colesterolo (<i>mmol/L</i>) *	4.81 ± 1.11	4.59 ± 1.09	5.27 ± 1.03
LDL (<i>mmol/L</i>)	2.90 ± 0.94	2.73 ± 0.89	3.23 ± 0.99
HDL (<i>mmol/L</i>)	1.23 ± 0.31	1.20 ± 0.30	1.30 ± 0.31
Trigliceridi (<i>mmol/L</i>) †	1.28 (1.07-2.00)	1.23 (1.06-1.53)	1.64 (1.11-2.28)
Glucosio (<i>mmol/L</i>)	6.47 ± 2.10	6.28 ± 1.86	6.88 ± 2.55
Proteina C-reattiva (<i>mg/L</i>) †	2.62 (2.6-8.5)	2.50 (1.30-5.86)	7.40 (1.47-9.18)
MDA (<i>μM</i>)	1.78 ± 0.43	1.81 ± 0.42	1.71 ± 0.45

I valori sono riportati come media SD.

* Differenze significative tra maschi e femmine ($p < 0.005$);

† Valori medi e distanza interquartile (distribuzione non parametrica).

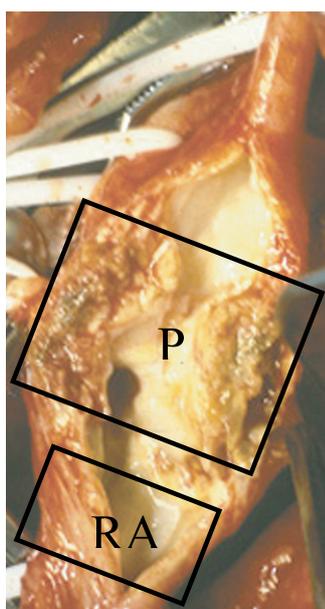


Figura 11 Campione di endoarteriectomia. I riquadri indicano la placca stenotica (P) e la regione adiacente (RA) utilizzate negli esperimenti.

Campioni di carotide sono stati prelevati da 23 feti provenienti da aborti terapeutici legalmente approvati pervenuti al Dipartimento di Scienze Biomorfologiche e Funzionali – Sezione Anatomia Patologica e Citopatologica dell'Università degli Studi di Napoli Federico II. L'età dei feti variava da 18 a 23 settimane gestazionali. I campioni sono stati prelevati secondo il “Perinatal Autopsy Protocol” pubblicato da “Armed Forces Institute of Pathology” in cooperazione con “American Registry of Pathology”. Le carotidi sono state prelevate entro 5 ore dall'espulsione del feto e le tuniche intima-media sono state separate manualmente sotto osservazione microscopica per ottenere un tessuto di controllo quanto più simile ai campioni di endarteriectomia. Delle 23 carotidi prelevate, 12 sono state usate per l'estrazione di RNA e 11 per la valutazione dello stress ossidativo o la colorazione immunoistochimica. Per l'analisi dell'espressione di PON2 (mRNA e immunoistochimica), come controllo di tessuto vascolare adulto sono state utilizzate arterie mammarie prelevate da soggetti sottoposti ad intervento di mastectomia.

3.2 Caratterizzazione della lesione

Le lesioni aterosclerotiche delle placche e le regioni adiacenti sono state classificate in base all'analisi istologica secondo i criteri stabiliti dall'AHA (4, 5) (Tabella 2). Le carotidi fetali e le arterie mammarie sono risultate prive di lesioni. La figura 12 mostra un esempio di colorazione ematossilina-eosina dei tessuti analizzati.

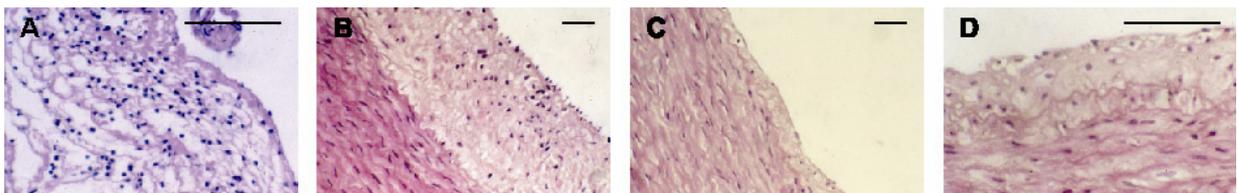


Figura 12 Sezioni istologiche dei tessuti esaminati colorati con ematossilina-eosina. pannello A: placca; pannello B: regione adiacente alla placca; pannello C: carotide fetale; pannello D: arteria mammaria. Le barre indicano 10 μ m.

Tabella 2 Numero e tipo delle 41 lesioni utilizzate per lo studio di PON2, 5-LO e FLAP.

Tipizzazione secondo la classificazione dell' American Heart Association.

<u>Placca</u>	$\frac{n=41}{n (\%)}$
Lesione tipo V	5 (12.2)
Lesione tipo VI (complicata)	7 (17.1)
Lesione tipo VII	14 (34.1)
Lesione tipo VIII	15 (36.6)

<u>Regione adiacente alla placca</u>	$\frac{n=41}{n (\%)}$
Lesione tipo II	5 (12.2)
Lesione tipo III	24 (58.5)
Lesione tipo IV	12 (29.3)

3.3 Analisi immunoistochimica

La procedura utilizzata per l'analisi immunoistochimica per i residui di lisina modificati da malondialdeide (MDA) o 4-idrossinonenale è stata effettuata come descritto nella ref. 101. Prima della colorazione per PON2 le sezioni seriali di 3-5 μm sono state pretrattate con 10 mM citrato per 2 minuti con microonde a 750 W per lo smascheramento dell'antigene. Per la rilevazione di PON2 è stato usato un anticorpo policlonale generato in coniglio utilizzando come immunogeno il frammento peptidico corrispondente agli aminoacidi 89-105 della sequenza umana (Orbigen). La concentrazione di lavoro ottimale (1:50) è stata determinata sperimentalmente testando diluizioni seriali fino ad ottenere una forte colorazione specifica riducendo il segnale aspecifico di fondo. Per effettuare il controllo negativo i vetrini sono stati colorati solo con un siero non immunizzato e l'anticorpo secondario. Non è stata riscontrata reattività nelle regioni extracellulari. Come indice dei livelli di PON2 è stata calcolata la percentuale delle cellule positive (numero di cellule reattive/numero di cellule

totali) in cinque differenti campi microscopici.

La doppia colorazione in immunofluorescenza per determinare quali cellule esprimono PON2 è stata effettuata utilizzando anticorpi diretti contro marcatori specifici per i differenti tipi cellulari presenti nelle lesioni. Gli anticorpi utilizzati per i marcatori erano tutti generati in pecora e diretti contro: il fattore VIII (DAKO) per le cellule endoteliali; CD68 (DAKO) per i monociti/macrofagi; l'actina (DAKO) per le cellule muscolari lisce; il CD3 (DAKO) per i linfociti T. I tessuti sono stati incubati: 1) con l'anticorpo diretto contro PON2 in combinazione con uno degli anticorpi primari elencati sopra; 2) con un anticorpo secondario fluoresceinato anti-coniglio (Sigma); 3) con un anticorpo secondario rodaminato anti-pecora (Sigma); e 4) con propidio iodato. Le immagini sono state ottenute mediante microscopia confocale (LSM 510, Zeiss) e valutate da tre indipendenti osservatori.

3.4 Quantizzazione dei livelli di mRNA

Estrazione dell'RNA e sintesi del cDNA

L'RNA totale è stato isolato da omogenati in GTC/ β -mercaptoetanololo utilizzando il metodo classico di estrazione con fenolo acido/cloroformio (102) preceduto da 2 passaggi di estrazione con cloroformio per rimuovere i lipidi. I leucociti periferici sono stati isolati dal sangue e l'RNA totale è stato estratto con TriPure Isolation Reagent (Roche) secondo le istruzioni d'uso. L'integrità dell'RNA è stata verificata mediante corsa elettroforetica su gel d'agarosio.

Il cDNA è stato sintetizzato da 1 μ g di RNA totale usando esameri random come primer (Amersham Bioscience), trascrittasi inversa M-MLV (Invitrogen) e inibitori delle ribonucleasi (Amersham Biosciences).

PCR quantitativa

Il cDNA è stato amplificato con lo strumento ABI Prism 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems) utilizzando dei saggi pre-sviluppati contenenti i primer e la sonda (Assay Mix) che riconosce una giunzione esone-esone dei geni target di cui quantizzare i livelli di mRNA (PON2, numero di saggio Hs00165563_m1; 5-LO, numero di saggio Hs00167536_m1; FLAP, numero di saggio Hs00233463_m1; adiponectina, numero di saggio Hs00605917_m1; AdipoR1, numero di saggio Hs00360422_m1; AdipoR2, numero di saggio Hs00226105_m1 - Applied Biosystems).

La sonda TaqMan è costituita da 20-30 nucleotidi e ha un fluoroforo legato all'estremità 5' e un quencer non fluorescente legato all'estremità 3'. Il fluoroforo è una molecola che, in seguito all'eccitazione da parte di una fonte luminosa, è in grado di emettere luce (fluorescenza) ad una lunghezza d'onda più lunga rispetto alla luce che l'ha eccitato. Il quencer è una molecola in grado di assorbire la fluorescenza emessa da un'altra molecola posta nelle immediate vicinanze. Se la sonda TaqMan è integra, le due molecole sono sufficientemente vicine affinché la fluorescenza emessa dal fluoroforo sia assorbita dal quencer.

La quantizzazione di un acido nucleico con tecnologia TaqMan si basa sull'attività 5' esonucleasica della Taq Polimerasi che, durante la fase di elongazione, degrada la sonda ibridata alla sequenza target. Una volta degradata la sonda, il quencer non si trova più sufficientemente vicino al fluoroforo da assorbire la fluorescenza, la quale viene rilevata dallo strumento. Rappresentando graficamente la fluorescenza rilevata ad ogni ciclo si ottiene una curva sigmoide tipica dell'amplificazione mediante PCR, con una fase iniziale in cui il prodotto non è rilevabile, una fase esponenziale e una fase di plateau in cui l'amplificazione diventa meno efficiente. La misurazione della quantità di template di partenza viene effettuata valutando la fase esponenziale di amplificazione. Si stabilisce una soglia di intensità di fluorescenza che interseca la curva di amplificazione nella fase esponenziale e il ciclo in cui viene

raggiunto tale valore soglia viene chiamato Ct (ciclo soglia, threshold cycle). Dal confronto dei Ct del gene target e del controllo endogeno sia per il campione che per un campione di riferimento (calibrator) si calcola l'espressione relativa. E' stato quindi fondamentale scegliere un buon controllo endogeno.

La scelta del controllo endogeno per la normalizzazione dei dati è stata effettuata in base all'analisi della variabilità d'espressione di 11 geni su diversi tessuti utilizzando la TaqMan Human Endogenous Control Plate (Applied Biosystems) secondo la procedura suggerita. Il gene della Beta-glucuronidase (GUSB-Applied Biosystems) ha mostrato differenze di espressione minime, risultando un buon controllo.

Attraverso dei test di validazione è stato accertato che l'efficienza di amplificazione di GUSB fosse simile a quella di tutti i geni target, in modo da permettere l'utilizzo del metodo di analisi del "Comparative C_t", ovvero del confronto dei cicli soglia (C_t). La reazione di amplificazione è stata condotta in duplicato in piastre da 384 pozzetti con un volume finale di reazione di 15 µl contenenti 0,8 ng/µl di cDNA, Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) 1X e Assay Mix (specificata per ogni gene) 1X.

Analisi dei dati

L'espressione di mRNA è stata misurata attraverso il confronto dei Ct dei geni target con i Ct del gene GUSB (controllo endogeno) effettuato con il metodo di quantizzazione relativa detto "Comparative C_t" utilizzando in software SDS 2.2.1 (Applied Biosystems). Secondo la procedura, i dati delle varie piastre sono stati confrontati normalizzando per un campione di RNA "Calibrator", retro-trascritto e amplificato in ogni piastra.

Dal confronto di Ct del target e del controllo endogeno si ricava il ΔC_t ($\Delta C_t = C_{t_{target}} - C_{t_{controllo}}$), sia per il campione in esame che per un campione di riferimento (calibrator) e poi si ricava il $\Delta\Delta C_t$ ($\Delta\Delta C_t = \Delta C_{t_{campione}} - \Delta C_{t_{calibrator}}$).

L'espressione relativa (ER) viene calcolata con la formula: $ER = 2^{-\Delta\Delta Ct}$.

L'RNA calibrator è stato generato da un pool di leucociti periferici per PON2, 5-LO e FLAP e da un pool di placche per adiponectina, AdipoR1 e AdipoR2. I livelli di mRNA sono indicati come espressione relativa al controllo endogeno e al campione calibrator usati.

3.5 Malondialdeide

La MDA è stata misurata nel plasma e negli omogenati di tessuto utilizzando un saggio colorimetrico commerciale (Bioxytech MDA-586, Oxis Research) basato sulla reazione della molecola da dosare con il reagente N-metil-2-fenilindolo. Per l'esecuzione è stata seguita la procedura suggerita dalla ditta produttrice. L'imprecisione del metodo, valutata a basse ed alte concentrazioni, è risultata <10%.

3.6 Marcatori biochimici

I marcatori biochimici sono stati misurati su siero prelevato dopo una notte di digiuno. I livelli di colesterolo totale, trigliceridi e glucosio sono stati valutati secondo metodi standard utilizzando un analizzatore automatico (Modular P3, Roche). Le concentrazioni di colesterolo HDL e LDL sono state determinate con un saggio enzimatico omogeneo colorimetrico con l'analizzatore automatico. La proteina C-reattiva è stata misurata con il metodo ultra-sensibile (Dade-Behring).

3.7 Esperimenti *ex vivo*

Per 5 pazienti sottoposti ad endoarteriectomia, le regioni adiacenti alla placca sono state raccolte in soluzione fisiologica contenente penicillina e streptomina, lavate varie volte e sminuzzate in pezzi molto piccoli. I frammenti di tessuto sono stati risospesi in Dulbecco Modified Eagle Medium

(DMEM; Euroclone) con 10% FBS e 1% glutammina e quindi sono stati divisi in varie aliquote in pozzetti di piastre da 6 pozzetti e trattati come segue: 1) incubati solo con mezzo di coltura (campione di riferimento, controllo negativo, C-); 2) esposti a 2 mM H₂O₂ per 5 ore; 3) pre-incubati con 10 mM N-Acetyl-L-cysteine (NAC; Sigma-Aldrich) per 18 ore e quindi esposti a 2 mM H₂O₂ per 5 ore. Come ulteriore controllo, due campioni sono stati esposti al solo NAC. Tutti i trattamenti sono stati effettuati a 37°C in presenza di 5% CO₂. Dopo i trattamenti indicati, un'aliquota di mezzo di coltura è stata prelevata per il dosaggio della MDA e i frammenti di tessuto sono stati lisati in GTC/β-mercaptoetanololo per estrarre l'RNA.

3.8 Quantizzazione dell'adiponectina mediante ELISA

Il campione di partenza è costituito da omogenati di tessuto in PBS di cui è stata determinata la concentrazione delle proteine totali attraverso il saggio di Bradford (Bio-Rad). Il saggio ELISA (Adiponectin ELISA assay, Linco) è stato condotto secondo le indicazioni della ditta produttrice; come campione sono stati utilizzati 20 µl di omogenato diluito a 0,025 µg/µl di proteine totali. I valori di adiponectina nel tessuto è stato normalizzato per il contenuto di proteine totali.

3.9 Analisi statistica

Le variabili continue sono state espresse come media ± SD. Le variabili che non mostravano una distribuzione normale sono state espresse come valori mediani e distanza interquartilica. Il confronto delle variabili continue è stato effettuato mediante il T-test. Per il confronto dei dati relativi a placche, regioni adiacenti e leucociti periferici dello stesso soggetto è stato utilizzato il T-test per campioni appaiati. Le correlazioni tra le differenti variabili sono state valutate attraverso la correlazione di Spearman. La correlazione tra i livelli di mRNA di PON2 e 5-

LO o FLAP è stata valutata con un modello non lineare (logaritmico). Un valore di $p < 0,050$ è stato considerato statisticamente significativo. Tutte le analisi statistiche sono state effettuate con il software Statistical Package for the Social Sciences version 14.0 (SPSS Inc. Chicago, Ill).

4. Risultati

4.1 Espressione di PON2

L'espressione di PON2 è stata valutata in 41 placche, nelle rispettive regioni adiacenti, in 11 carotidi fetali e in 6 arterie mammarie. I livelli di mRNA di PON2 sono risultati significativamente più bassi nelle placche che nelle rispettive regioni adiacenti ($p < 0,005$), nelle carotidi fetali ($p < 0,001$) e nelle arterie mammarie ($p < 0,031$) (Fig. 13). Non è stata osservata nessuna differenza significativa tra le regioni adiacenti alla placca, le carotidi fetali e le mammarie (Fig. 13).

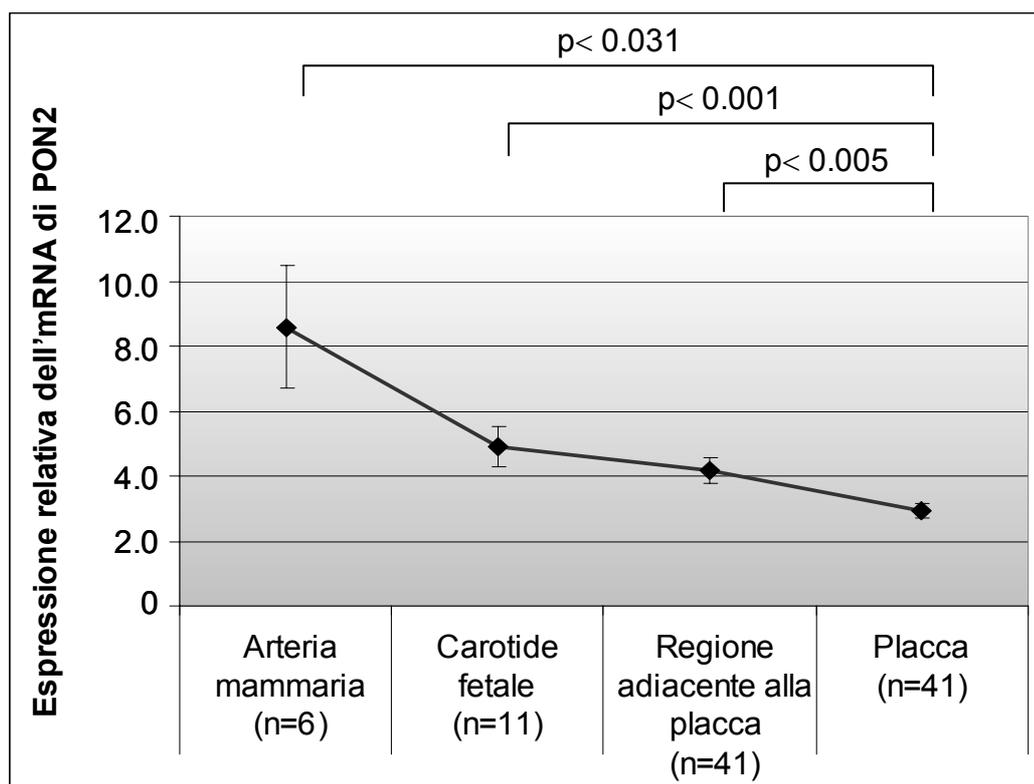


Figura 13 Espressione relativa dell'mRNA (media \pm SEM) di paraoxonasi 2 (PON2) nelle placche, nelle rispettive regioni adiacenti, nelle carotidi fetali e nelle arterie mammarie. n=numero di campioni esaminati

I livelli dell'mRNA di PON2 sono risultati significativamente più bassi nei leucociti periferici (media \pm SEM = $1,01 \pm 0,04$) che nelle placche (media \pm SEM = $2,94 \pm 0,23$, $p < 0,001$) e nelle rispettive regioni adiacenti (media \pm SEM = $4,16 \pm 0,38$, $p < 0,001$). Per verificare se le grandi quantità di leucociti periferici, intrappolati nelle lesioni complicate in seguito ad emorragia o trombosi, potessero essere la causa dei bassi livelli di PON2 riscontrati nelle placche, l'analisi è stata ripetuta escludendo tali campioni. In seguito all'esclusione delle placche complicate (tipo VI), la differenza nell'espressione dell'mRNA di PON2 tra le placche (media \pm SEM = $3,01 \pm 0,26$) e le rispettive regioni adiacenti (media \pm SEM = $4,34 \pm 0,44$) è rimasta statisticamente significativa ($p < 0,008$).

Negli stessi tessuti è stata valutata l'espressione di PON2 a livello della proteina mediante rilevazione immunostochimica (Fig. 14).

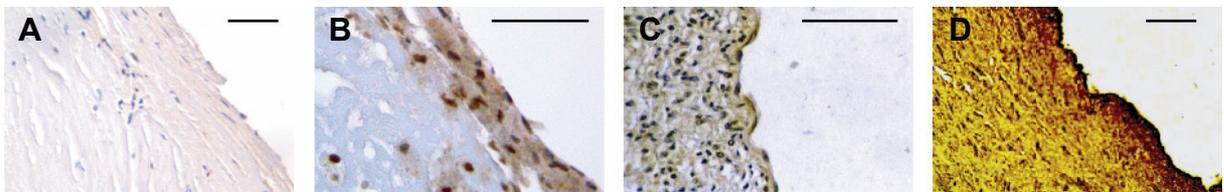


Figura 14 Colorazione immunostochimica per paraoxonasi 2 (PON2) in placche (pannello A), regioni adiacenti (pannello B), carotidi fetali (pannello C) e arterie mammarie (pannello D). La barra indica 10 μ m

La percentuale di cellule positive per PON2, calcolata nelle placche, nelle rispettive regioni adiacenti, nelle carotidi fetali e nelle arterie mammarie, ha mostrato lo stesso profilo dell'mRNA (Fig. 15).

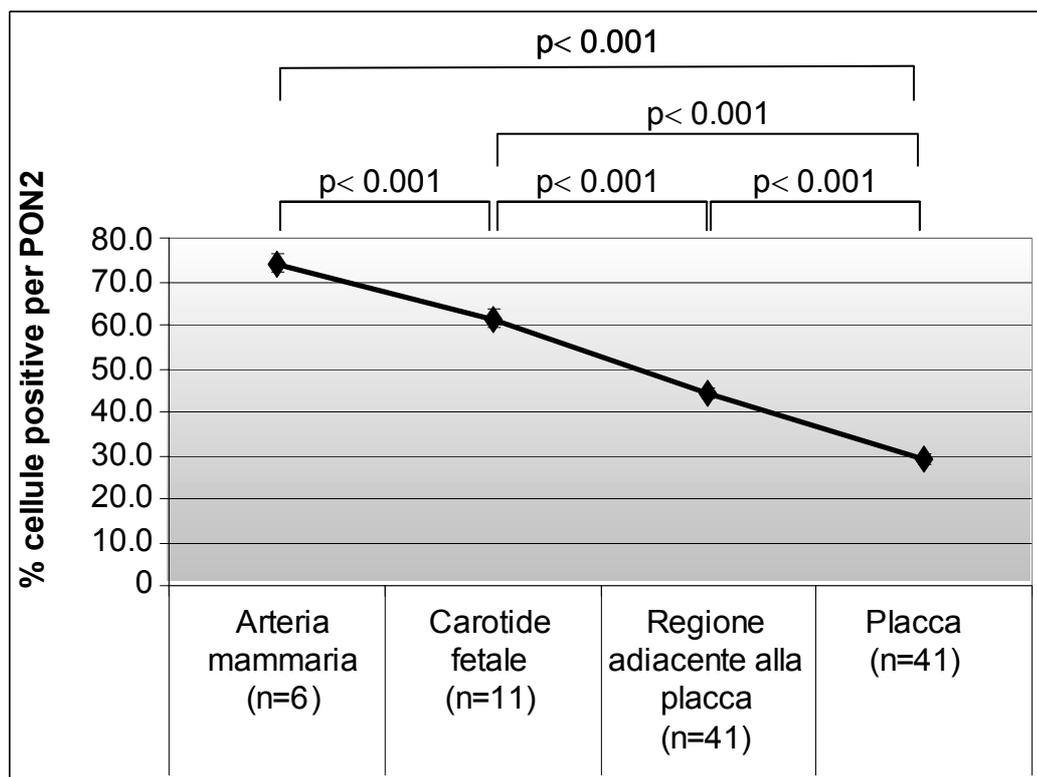


Figura 15 Percentuale di cellule positive per paraoxonasi 2 (PON2) (media ± SEM) nelle placche, nelle rispettive regioni adiacenti, nelle carotidi fetali e nelle arterie mammarie. n=numero di campioni esaminati.

L'espressione di PON2, sia a livello di mRNA che di proteina, è risultata diminuita dall'arteria mammaria alla placca. In particolare, il numero di cellule PON2-positivo nella placca è risultato significativamente più basso rispetto alle regioni adiacenti ($p < 0,001$), alle carotidi fetali ($p < 0,001$) e alle arterie mammarie ($p < 0,001$). Inoltre, sono risultate significative le differenze del numero di cellule positive per PON2 nelle carotidi fetali ($p < 0,001$) e nelle arterie mammarie ($p < 0,001$) rispetto alle regioni adiacenti alla placca.

Non sono state osservate differenze nell'espressione di PON2 nella placca tra i differenti tipi di lesioni, sia relativamente all'mRNA che alla proteina.

Per determinare quali sono i tipi cellulari che esprimono PON2, è stata effettuata la doppia colorazione in immunofluorescenza, rilevando sulla stessa sezione PON2 e i marcatori specifici delle cellule della lesione. Nei tessuti sani, carotidi

fetali e arterie mammarie, l'espressione di PON2 è stata osservata ad alti livelli nelle cellule endoteliali e poco nei macrofagi, mentre è quasi assente nelle cellule muscolari lisce (Fig 16C, D, G, H, K, L). In questi tessuti non sono stati evidenziati linfociti T (Fig. 16O, P). Anche nelle regioni adiacenti alla placca è stata osservata reattività per PON2 in cellule endoteliali e macrofagi (Fig. 16B, F). I linfociti, presenti in basso numero in questo tipo di tessuto, e le cellule muscolari lisce sono quasi totalmente prive di PON2 (Fig. 16J, N). Nella placca PON2 è espressa da cellule endoteliali, macrofagi, cellule muscolari lisce e linfociti T, benché il numero totale di cellule esprimenti PON2 è risultato estremamente ridotto (Fig. 16A, E, I, M). Infatti, lo strato endoteliale è totalmente disgregato e le cellule endoteliali, che maggiormente esprimono PON2 negli altri tessuti, sono quasi assenti. Nessuna reattività è stata riscontrata nelle regioni extracellulari, indicando che PON2 è una proteina intracellulare.

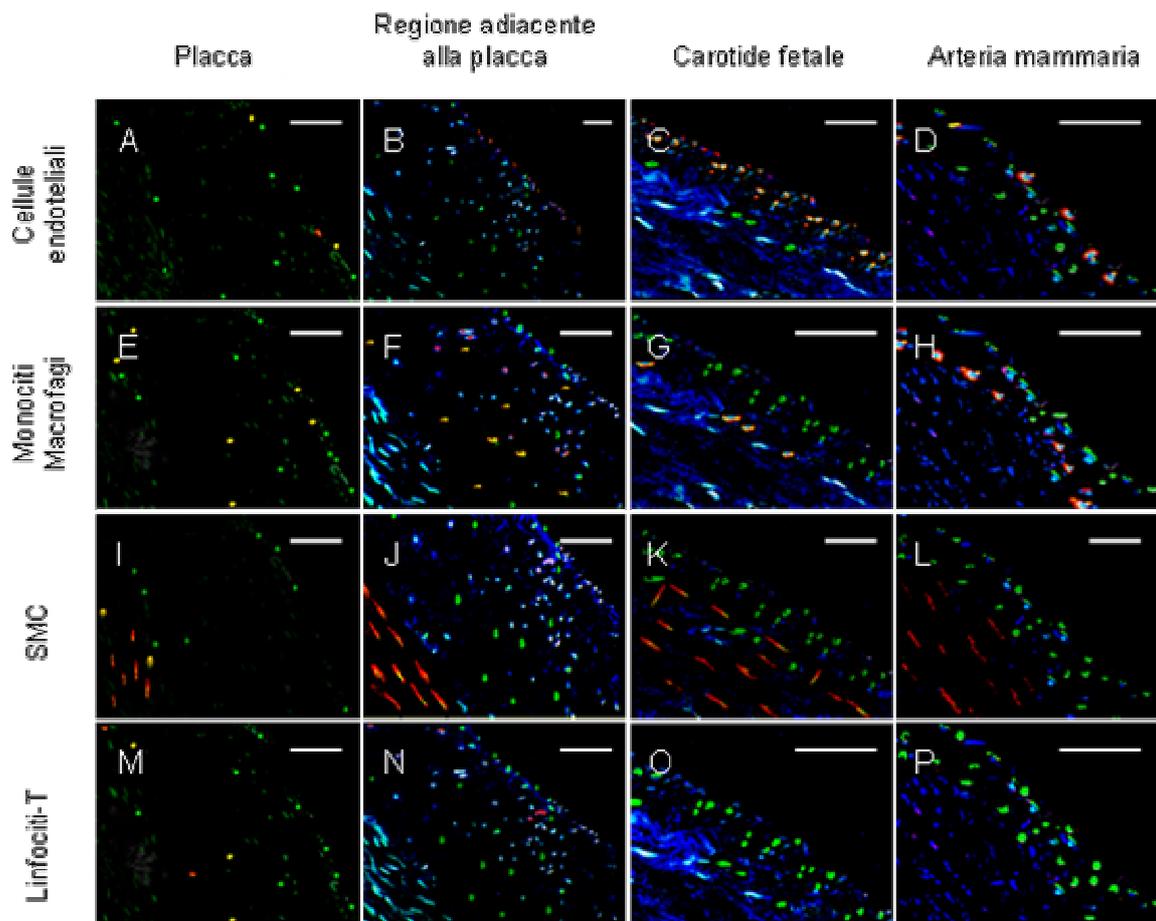


Figura 16 Doppia colorazione in immunofluorescenza per paraoxonasi 2 (PON2) e marker cellula-specifici nelle placche, regioni adiacenti, carotidi fetali e arterie mammarie. Pannelli A-D: doppia colorazione per PON2 (verde) e fattore VIII (rosso) per le cellule endoteliali. Pannelli E-H: doppia colorazione per PON2 (verde) e CD68 (rosso) per i monociti-macrofagi. Pannelli I-L: doppia colorazione per PON2 (verde) e actina (rosso) per cellule muscolari lisce (SMC). Pannelli M-P: doppia colorazione per PON2 (verde) e CD3 (rosso) per i linfociti T. La barra indica 10 μ m.

4.2 Valutazione dello stato ossidativo

Come indice dello stato ossidativo, sono stati dosati i livelli di un prodotto finale della perossidazione lipidica, la MDA. I livelli di MDA sono risultati significativamente più elevati nelle placche rispetto alle regioni adiacenti di 1,6 volte ($p < 0,032$) e rispetto alle carotidi fetali di 3,2 volte ($p < 0,002$). La differenza nelle concentrazioni di MDA tra le regioni adiacenti alla placca e le carotidi fetali non è risultata statisticamente significativa (Fig. 17).

I dati sono stati confermati dall'analisi immunocistochimica con anticorpi diretti contro i residui di lisina modificati dalla coniugazione con MDA o 4-idrossinonenale, di cui un esempio è riportato in figura 18.

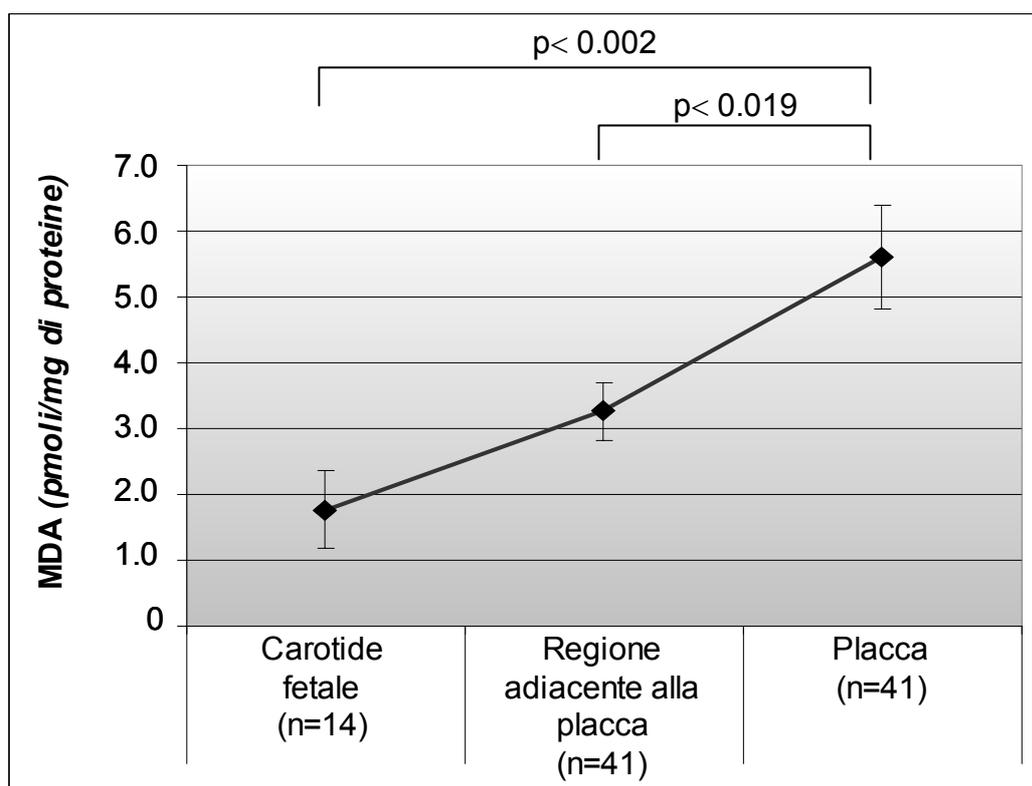


Figura 17 Livelli di malondialdeide (MDA) (media \pm SEM) nelle placche, nelle rispettive regioni adiacenti e nelle carotidi fetali. n=numero di campioni esaminati.

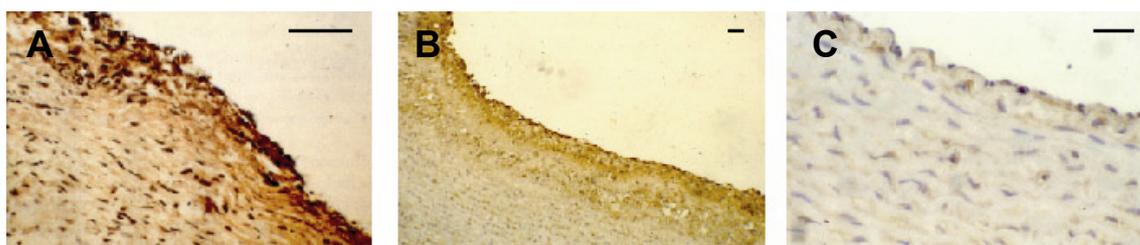


Figura 18 Colorazione immunoistochimica per la malondialdeide (MDA). **Pannello A:** placca; **pannello B:** regione adiacente alla placca; **pannello C:** carotide fetale. Le barre indicano 10 µm.

4.3 Modulazione dell'espressione dell'mRNA di PON2 da parte dello stress ossidativo in campioni *ex-vivo*

Nei tessuti esaminati, è stato osservato un andamento opposto tra i livelli di espressione di PON2 e i livelli di MDA, suggerendo un rapporto di causa-effetto tra i due fenomeni. È noto che la carenza di PON2 induce stress ossidativo, ma si può ipotizzare un meccanismo inverso secondo il quale lo stress ossidativo può influire sull'espressione di PON2. Per verificare questa ipotesi, la regione adiacente alla placca è stata incubata con perossido d'idrogeno (H_2O_2) in modo da indurre stress ossidativo. È stato scelto questo tipo di tessuto perché include tutti i tipi cellulari coinvolti nell'aterosclerosi e perché è un tessuto affetto da modifiche ateromatose precoci, come l'accumulo di lipidi, i quali possono essere ossidati nelle nostre condizioni sperimentali.

Un'aliquota di tessuto è stata incubata solo con il mezzo di coltura in modo da essere utilizzata come riferimento (controllo negativo). L'incubazione con 2 mM di H_2O_2 ha indotto un aumento significativo di MDA nel mezzo di coltura (+36,0%; $p < 0,048$) e un corrispondente decremento dei livelli dell'mRNA di PON2 (-26,0%; $p < 0,036$) rispetto al controllo (Fig. 19). Il pre-trattamento con un agente anti-ossidante come il NAC è stato in grado di annullare gli effetti osservati in seguito all'ossidazione indotta da H_2O_2 (nessuna differenza

significativa con il controllo). Come ulteriore controllo, su due campioni è stato eseguito il trattamento con il solo NAC ed è stato osservato che questo non influisce sui livelli di espressione dell'mRNA di PON2 (espressione media 103,5%, differenza non significativa rispetto al controllo). Questi due controlli hanno permesso di attribuire la riduzione dell'espressione di PON2 all'aumento di stress ossidativo.

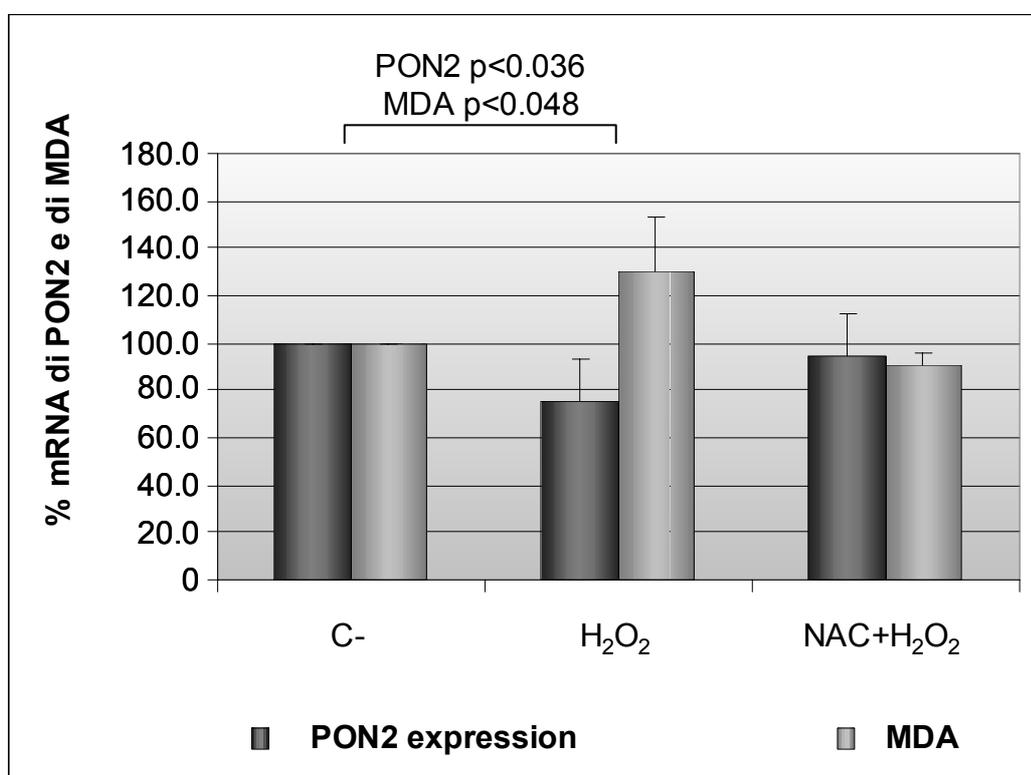


Figura 19 Effetto del trattamento con H₂O₂ sull'espressione di mRNA di paraoxonase 2 (PON2) in regioni adiacenti alla placca di 5 pazienti. Le regioni adiacenti alla placca sono state sminuzzate, risospese in mezzo di coltura e incubate a 37°C con 10 mM N-acetyl-L-cysteine (NAC) per 18 ore e poi con 2 mM H₂O₂ per 5 ore o solo con questo ultimo trattamento. Il controllo negativo (C-) è stato incubato solo con mezzo di coltura. L'espressione dell'mRNA di PON2 (percentuale media ± SEM) e la malondialdeide (MDA) nel mezzo di coltura (percentuale media ± SEM) sono stati quantizzati come descritto nei materiali e metodi.

4.4 Espressione di 5-LO e FLAP

I livelli di mRNA di 5-LO e FLAP sono risultati quasi nulli nella carotide fetale, e significativamente aumentati nelle placche (rispettivamente di 22,2 e di 9,0 volte) e nelle regioni adiacenti (rispettivamente di 18,0 e 8,5 volte) (Fig. 20). Non sono state osservate differenze tra le placche e le rispettive regioni adiacenti, con lesioni di grado inferiore. Questo dato è in linea con precedenti studi in cui è stato osservato che nelle lesioni aterosclerotiche sono presenti elevati livelli di espressione dei geni del pathway enzimatico della 5-LO.

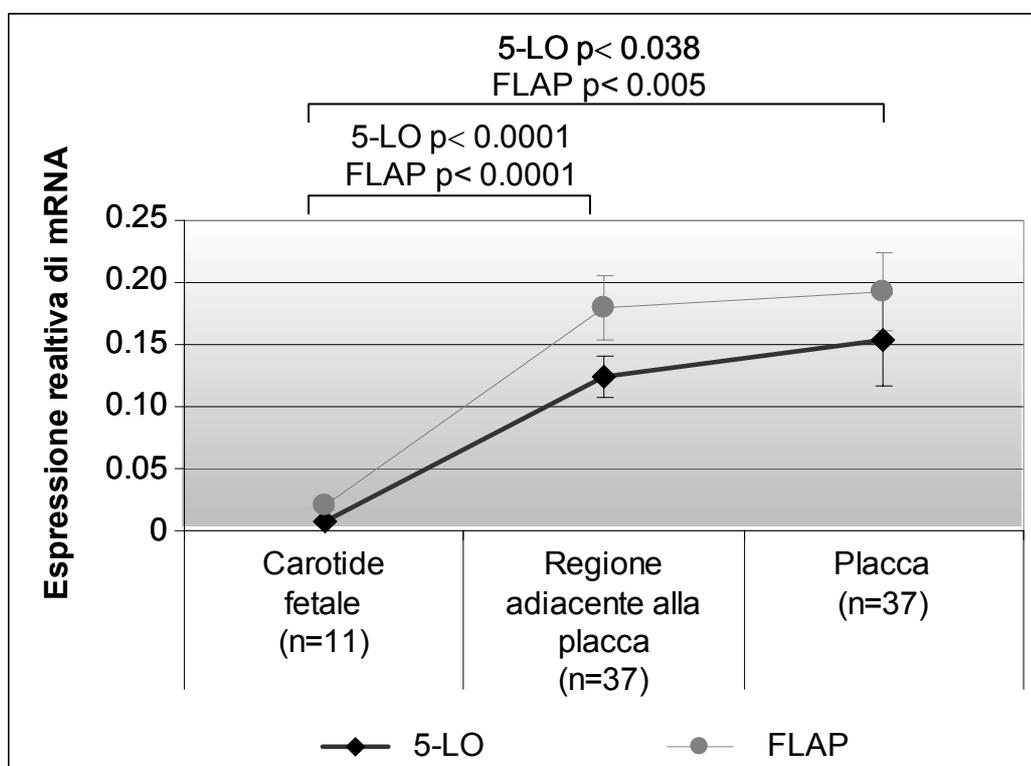


Figura 20 Espressione relativa dell'mRNA (media ± SEM) di 5-lipossigenasi (5-LO) e della sua proteina attivante (FLAP) nelle placche, nelle rispettive regioni adiacenti e nelle carotidi fetali. n=numero di campioni esaminati

Poiché i livelli di mRNA di 5-LO e FLAP sono risultati più alti nei leucociti periferici rispetto alle placche (entrambi di circa 8 volte; $p < 0,0001$) e alle regioni adiacenti (entrambi di circa 8 volte; $p < 0,0001$), l'analisi è stata ripetuta escludendo le lesioni complicate con leucociti periferici intrappolati. Anche

dopo l'esclusione delle lesioni di tipo VI, non è stata osservata nessuna differenza significativa tra le placche e le regioni adiacenti.

In ogni tessuto esaminato è stata osservata una forte correlazione lineare tra i livelli di mRNA di 5-LO e FLAP: nelle placche con un coefficiente di correlazione = 0,95 e $p < 0,0001$; nelle regioni adiacenti con un coefficiente di correlazione = 0,90 e $p < 0,0001$; nei leucociti periferici con un coefficiente di correlazione = 0,60 e $p < 0,0001$. Questo dato indica che i due geni sono regolati simultaneamente.

Una correlazione non lineare secondo un modello logaritmico è stata osservata tra i livelli di mRNA di PON2 e i livelli di mRNA di 5-LO ($F = 18,4$; $p = 0,00005$) e di FLAP ($F = 9,7$; $p = 0,003$). Questo dato conferma statisticamente l'andamento opposto osservato tra i livelli di espressione di PON2 e di 5-LO/FLAP.

4.5 Valutazione dei livelli di adiponectina

L'adiponectina è stata quantizzata nel tessuto tramite un saggio ELISA che rileva tutte le forme oligomeriche. I valori di adiponectina ottenuti sono stati normalizzati per le quantità totali di proteine presenti negli omogenati. I livelli di adiponectina sono risultati più alti nelle placche ($p < 0,002$) e nelle regioni adiacenti ($p < 0,012$) rispetto alle carotidi fetali (Fig. 21). Inoltre, nelle regioni adiacenti, con lesioni di basso grado, sono stati rilevati livelli di adiponectina più elevati rispetto alle placche corrispondenti (Fig. 21), inoltre, tali livelli sono correlati tra loro in maniera lineare (coefficiente di Pearson = 0,330; $p < 0,017$). Non sono state osservate differenze dei livelli di adiponectina tra placche di diverso tipo.

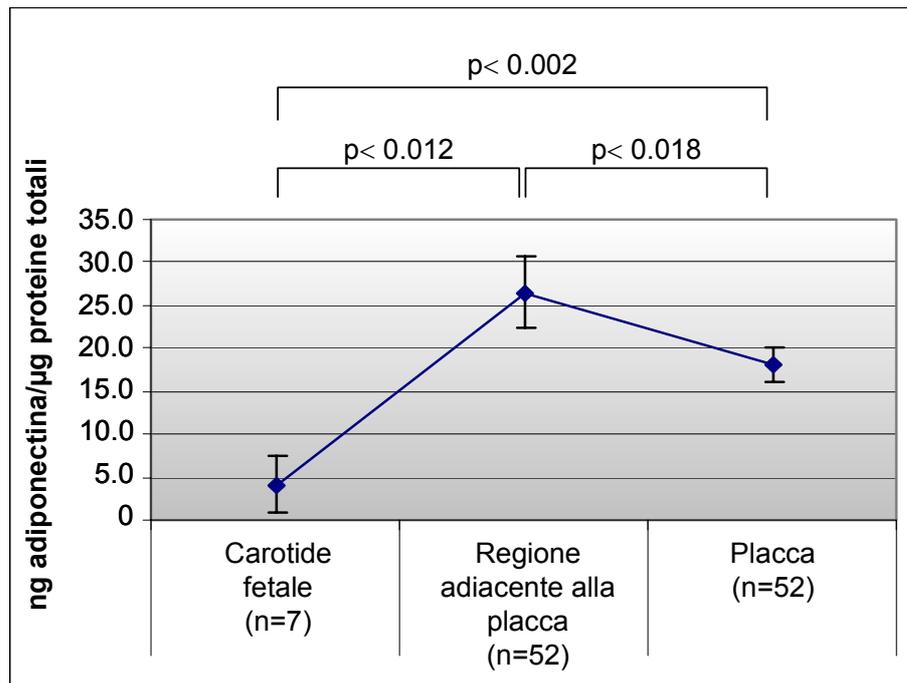


Figura 21 Livelli di adiponectina nelle placche, nelle rispettive regioni adiacenti e nelle carotidi fetali. I valori di adiponectina ottenuti con saggio ELISA sono stati normalizzati per il contenuto totale di proteine nell'omogenato.

I livelli di mRNA dell'adiponectina sono stati valutati su 34 dei 52 campioni analizzati per la proteina. Sono stati considerati solo i 34 pazienti completi di quantizzazione dell'mRNA non solo per l'adiponectina, ma anche per i due recettori (vedi paragrafo successivo).

Non sono state osservate differenze nei livelli di mRNA dell'adiponectina tra le placche, le regioni adiacenti e le carotidi fetali, indicando che l'elevata quantità di proteina presente nelle lesioni non è la conseguenza dell'iper-espressione del gene nella parete vasale.

4.6 Espressione dei recettori dell'adiponectina

L'mRNA dei recettori dell'adiponectina (AdipoR1 e AdipoR2) è stato quantizzato nelle placche, nelle regioni adiacenti e nelle carotidi fetali. I livelli di mRNA di AdipoR1 sono risultati significativamente più bassi nella carotide fetale che nella regione adiacente ($p < 0,036$) (Fig. 22). I livelli riscontrati nelle placche sono intermedi tra quelli delle regioni adiacenti e quelli delle carotidi fetali e non differiscono da questi in maniera significativa. Al contrario i livelli di mRNA di AdipoR2 nelle placche sono risultati significativamente più bassi rispetto a quelli delle regioni adiacenti ($p < 0,001$) e delle carotidi fetali ($p < 0,030$) (Fig. 22). E' da notare che nelle carotidi fetali e nelle regioni adiacenti alla placca, i livelli di mRNA di AdipoR2 sono superiori a quelli di AdipoR1 (rispettivamente $p < 0,021$ e $p < 0,001$), mentre nella placca non si osservano differenze.

I livelli di mRNA di AdipoR1 e AdipoR2 sono risultati correlati tra loro in maniera lineare sia nelle placche (coefficiente di correlazione = 0,531; $p = 0,001$) che nelle regioni adiacenti (coefficiente di correlazione = 0,688; $p < 0,001$).

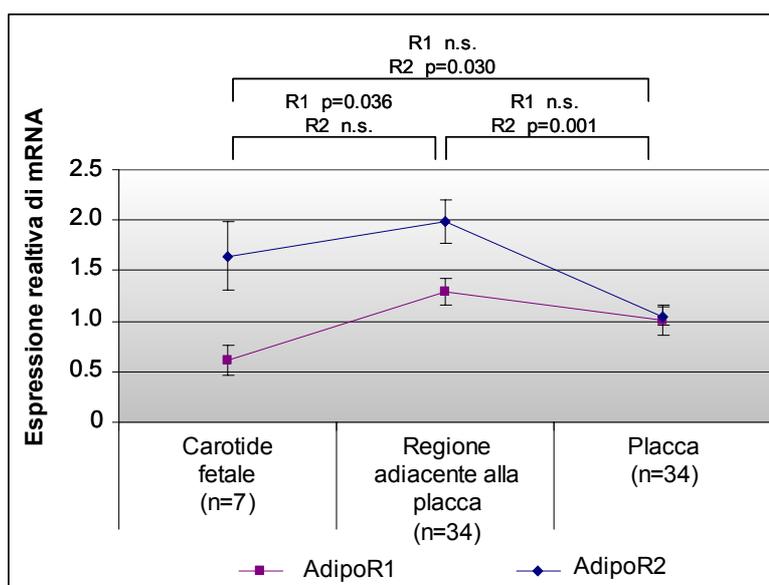


Figura 22 Espressione relativa dell'mRNA (media \pm SEM) dei recettori dell'adiponectina (AdipoR1 e AdipoR2) nelle placche, nelle rispettive regioni adiacenti e nelle carotidi fetali. n=numero di campioni esaminati

Nelle placche è stata evidenziata un'associazione tra i livelli proteici di adiponectina e i livelli di mRNA dei due recettori. Placche con livelli di adiponectina superiori alla mediana (16,02 ng/ μ g proteine totali) hanno mostrato livelli di AdipoR1 (1,31 unità) e AdipoR2 (1,29 unità) più alti rispetto a placche con livelli di adiponectina inferiori alla mediana (rispettivamente 0,70 unità con $p < 0,046$ e 0,81 unità con $p < 0,015$) (Fig 23).

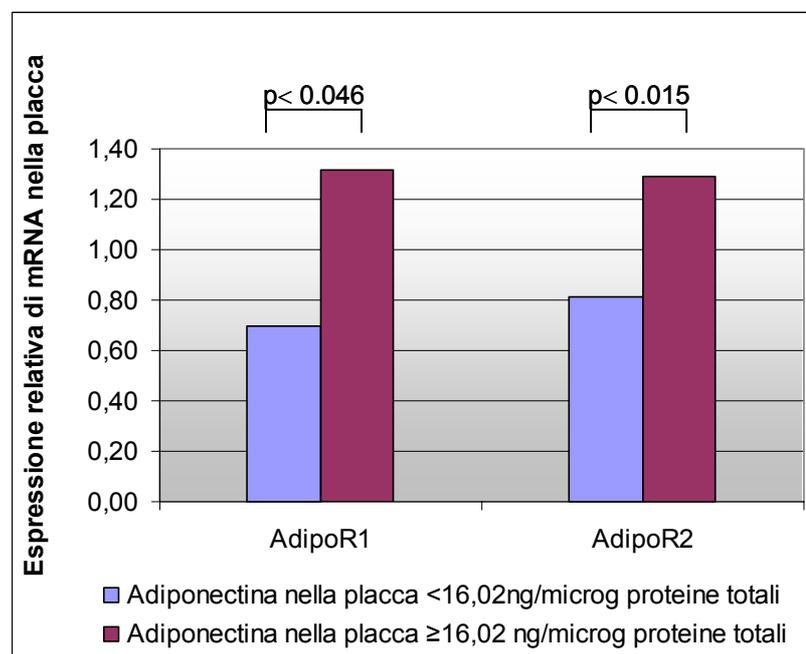


Figura 23 Espressione relativa dell'mRNA (media \pm SEM) dei recettori dell'adiponectina (AdipoR1 e AdipoR2) nelle placche, nei campioni con adiponectina superiore o inferiore alla mediana (16,02 ng/microg). n=numero di campioni esaminati

5. Discussione

La paraoxonasi 2 (PON) è un enzima con proprietà antiossidanti (66), che, grazie all'espressione ubiquitaria, potrebbe svolgere un ruolo di primo piano nella protezione della parete arteriosa da modifiche ossidative che inducono lo sviluppo di placche aterosclerotiche. In diversi tipi cellulari di derivazione vascolare è stato dimostrato che PON2 riduce la produzione di specie reattive dell'ossigeno (103). Il ruolo di PON2 *in vivo* è stato dimostrato in topi deficitari di PON2 che mostravano un aumento dello stress ossidativo e della risposta infiammatoria associati allo sviluppo di placche aterosclerotiche di dimensioni maggiori rispetto ai controlli (69). D'altra parte topi suscettibili all'aterosclerosi nella cui aorta è stata indotta iper-espressione di PON2 mostravano lesioni aterosclerotiche di dimensioni inferiori rispetto ai controlli (104). Quindi, fino ad ora, in modelli animali geneticamente modificati, è stato chiarito che PON2 rappresenta una protezione dallo sviluppo di aterosclerosi, ma nell'uomo non è mai stato verificato, in condizioni fisiopatologiche, se nella placca questa protezione sia ancora presente o se si verificano alterazioni nell'espressione. In questo studio, per la prima volta, è stato dimostrato che man mano che la lesione aterosclerotica progredisce, i livelli di espressione di PON2 diminuiscono e quindi viene a mancare la protezione anti-ossidante che essa esercita. Dai dati è emerso che la riduzione di PON2 è particolarmente accentuata nelle placche di stadio avanzato rispetto alle regioni adiacenti con lesioni di grado inferiore, suggerendo che nelle lesioni precoci la protezione anti-ossidante è ancora presente, diminuendo significativamente con la progressione della lesione. L'andamento riscontrato per PON2 è opposto a quello del marker di ossidazione MDA, che è aumentato nelle placche e meno aumentato nelle regioni adiacenti, rinforzando l'idea che l'ossidazione sia associata allo sviluppo e alla progressione di lesioni aterosclerotiche. Questo andamento inverso fa anche pensare che esista un rapporto di causa-effetto tra i due fenomeni. Sia *in vitro*

che *in vivo*, è stato accertato che la carenza di PON2 è in grado di aumentare lo stress ossidativo, ma non è chiaro cosa induca la riduzione di PON2 nelle placche. Abbiamo ipotizzato che lo stress ossidativo potesse regolare l'espressione di PON2, inducendone la riduzione. Per verificare tale ipotesi, sono stati effettuati degli esperimenti *ex vivo* su campioni di carotidi corrispondenti alle regioni adiacenti alla placca, quindi tessuti che, non solo contenevano tutte le cellule coinvolte nello sviluppo di aterosclerosi, ma presentavano anche l'accumulo di lipidi tipico delle lesioni iniziali. L'induzione di stress ossidativo nei tessuti ha causato la riduzione dell'espressione dell'mRNA di PON2. Questo dato è in linea con quello di un altro studio, in cui l'induzione di stress ossidativo in tessuti intestinali ha prodotto una riduzione di PON2 (105). È stato dimostrato che anche il litio, inducendo stress ossidativo, è in grado di ridurre i livelli di espressione di PON2 in una linea cellulare derivata da adenocarcinoma polmonare (106). I risultati su tessuti intestinali e su cellule di derivazione polmonare, insieme ai questi risultati sulla carotide, mostrano che l'ossidazione è in grado di ridurre l'espressione di PON2 in diversi tipi di tessuti. D'altra parte studi sulla regolazione dell'espressione di PON2 in macrofagi erano discordanti. Infatti, in alcuni lavori gli autori hanno dimostrato che, in macrofagi di topi deficienti di ApoE e in una linea cellulare di macrofagi (J774A.1), lo stress ossidativo è in grado di aumentare i livelli di PON2 (107, 108) inducendo un meccanismo anti-ossidante compensatorio. Altri esperimenti di ossidazione condotti dagli stessi autori su macrofagi di soggetti ipercolesterolemici trattati in modo da accumulare grosse quantità di colesterolo, hanno rivelato la down-regolazione di PON2 (109). L'opposta regolazione osservata nei macrofagi nell'ultimo lavoro è stata spiegata attribuendo la riduzione di PON2 all'accumulo di colesterolo e non all'ossidazione. Da questo punto di vista il nostro risultato potrebbe essere spiegato sulla base dell'accumulo di lipidi presente nelle lesioni aterosclerotiche iniziali, oggetto del nostro studio. D'altra parte, la down-regolazione

dell'espressione di PON2 osservata nella regione adiacente alla placca è dovuta alla risposta all'ossidazione dei diversi tipi cellulari presenti nella parete vascolare e che potrebbe essere diversa da quella dei soli macrofagi. L'osservazione che PON2 è espressa prevalentemente nelle cellule endoteliali, come dimostrato dagli esperimenti di doppia immunofluorescenza, supporta ulteriormente questa ipotesi.

La riduzione di PON2 in seguito all'induzione di stress ossidativo mette in luce il circolo vizioso che si crea durante lo sviluppo di lesioni aterosclerotiche tra aumento di fenomeni ossidativi e decremento della protezione anti-ossidante.

Lo studio dei geni 5-LO e FLAP, codificanti proteine coinvolte nella sintesi dei leucotrieni, potenti mediatori pro-infiammatori, ha rivelato un incremento della loro espressione nelle lesioni, consistente con il ruolo predominante attribuito all'infiammazione nello sviluppo dell'aterosclerosi. I nostri risultati non hanno messo in evidenza differenze nell'espressione di 5-LO e FLAP tra le placche di stadio avanzato e le rispettive regioni adiacenti con lesioni di grado inferiore. Questo risultato, in apparenza, sembra in disaccordo con un precedente studio in cui è stato dimostrato che l'espressione di tali geni aumenta gradualmente con la progressione della lesione (89). In realtà, il confronto non è possibile perché i gruppi di lesioni paragonati nei due lavori sono parzialmente sovrapposti. Infatti, mentre il nostro studio confronta lesioni di grado intermedio-avanzato di stadio II-IV (regioni adiacenti alla placca) con lesioni di grado avanzato di stadio V-VI (placche), lo studio citato confronta lesioni iniziali di stadio II-III con lesioni avanzate di stadio IV-V non complicate. Quindi i livelli medi di espressione di 5-LO e FLAP nelle regioni adiacenti risultano elevati perché in questo gruppo sono presenti lesioni intermedie ed avanzate.

Un dato interessante è la correlazione inversa di tipo logaritmico riscontrata tra i livelli di mRNA di PON2 e i livelli di mRNA di 5-LO e FLAP, che dimostra come al diminuire della protezione anti-ossidante, si aggravi lo stato infiammatorio. Sebbene questo studio non evidenzia un rapporto diretto di causa-

effetto, altri lavori hanno dimostrato che lo stimolo con oxLDL induce un aumento nell'espressione di FLAP e quindi contribuisce ad instaurare uno stato pro-infiammatorio (110).

L'adiponectina, la citochina più abbondante prodotta dal tessuto adiposo, ha proprietà anti-infiammatorie e anti-aterogene. Nel siero di soggetti con aterosclerosi i livelli di adiponectina sono sensibilmente più bassi rispetto ad individui sani (111) e poiché la presenza di adiponectina è stata riscontrata in lesioni aterosclerotiche, è stata formulata l'ipotesi che i livelli di adiponectina diminuiscano in circolo in seguito all'accumulo nella placca. Uno studio, condotto mediante immunoistochimica su lesioni murine, si è limitato a rilevare la presenza di adiponectina nelle lesioni aterosclerotiche (e l'assenza nei vasi sani), senza quantizzarne i livelli presenti (97). Un altro studio ha quantizzato i livelli di adiponectina presenti in lesioni aterosclerotiche correlandoli a quelli di altre proteine ma senza effettuare il confronto con i livelli in tessuti sani (98). Nello studio presentato in questa tesi è stato osservato che i livelli di adiponectina presenti nelle lesioni sono notevolmente più elevati rispetto alle carotidi fetali. Inoltre, non sono state riscontrate differenze significative nei livelli di mRNA dell'adiponectina tra le placche, le regioni adiacenti e le carotidi fetali. Questo dato indica che gli elevati livelli di adiponectina presenti nelle lesioni non sono dovuti all'up-regolazione del gene, ma rendono plausibile l'ipotesi dell'accumulo dal circolo periferico. In effetti l'adiponectina interagisce con le strutture della matrice extracellulare essendo strutturalmente simile al collagene (97, 112). Il legame dell'adiponectina alle lesioni potrebbe essere un meccanismo di difesa dell'arteria. Per verificare se l'adiponectina, in seguito all'accumulo, possa mediare i suoi effetti nella lesione aterosclerotica, è stato quantizzato l'mRNA dei due recettori, AdipoR1 e AdipoR2. Nella carotide fetale e nella regione adiacente alla placca è stato osservato che i livelli di espressione dell'mRNA di AdipoR2 sono maggiori rispetto ad AdipoR1. Questo dato contribuisce a definire il pattern di espressione di tali recettori. In un precedente

studio è stata osservata un'espressione basale ubiquitaria e che AdipoR1 è espresso prevalentemente nel muscolo scheletrico mentre AdipoR2 è espresso prevalentemente nel fegato (95). I livelli di AdipoR2 sono risultati significativamente ridotti nelle placche rispetto alle regioni adiacenti e alle carotidi fetali, suggerendo che in presenza di danno aterosclerotico, possa instaurarsi un meccanismo di adiponectino-resistenza.

In conclusione, questo studio evidenzia che nello sviluppo della placca aterosclerotica si viene a creare una situazione di aumento di fattori pro-aterosclerotici, come lo stress ossidativo e l'infiammazione, associati alla riduzione degli effetti benefici mediati dall'enzima antiossidante PON2 e dall'adiponectina.

6. Considerazioni conclusive

- L'espressione di PON2 è stata valutata in placche aterosclerotiche umane per la prima volta;
- PON2 è meno espressa nelle lesioni aterosclerotiche che nei tessuti sani inducendo una riduzione della protezione anti-ossidante;
- PON2 è prevalentemente espressa nelle cellule endoteliali che vengono perse nelle placche avanzate;
- lo stress ossidativo induce la riduzione dell'espressione di PON2 originando un circolo vizioso in cui le ridotte difese anti-ossidanti causano a loro volta l'aumento dei fenomeni ossidativi;
- gli alti livelli di ossidazione nelle lesioni avanzate potrebbero essere responsabili dei bassi livelli di espressione di PON2;
- i geni di 5-LO e FLAP, codificanti proteine responsabili della sintesi dei leucotrieni, sono iper-espressi già nelle lesioni di grado intermedio indicando il coinvolgimento dei fenomeni infiammatori nello sviluppo di placche aterosclerotiche;
- i livelli di mRNA di 5-LO e FLAP sono direttamente correlati, indicando la regolazione simultanea dei due geni;
- i livelli di espressione di PON2 sono inversamente correlati ai livelli di espressione di 5-LO e FLAP evidenziando il legame tra bilancio ossidativo e stato infiammatorio;
- l'adiponectina è presente ad alti livelli nelle lesioni aterosclerotiche mentre è quasi assente nei tessuti sani;

- gli alti livelli di adiponectina presenti nelle placche non sono dovuti ad aumento dell'espressione del gene;
- alti livelli di adiponectina presenti nella placca sono associati ad alti livelli di mRNA dei recettori AdipoR1 e AdipoR2;
- AdipoR2 è il recettore dell'adiponectina maggiormente espresso nelle lesioni e nelle carotidi fetali;
- i livelli di AdipoR2 sono ridotti nelle placche aterosclerotiche suggerendo l'instaurarsi di un meccanismo di adiponectino-resistenza.

7. Bibliografia

1. R Rosamond W, Flegal K, Friday G, Furie K, Go A, Greenlund K, Haase N, Ho M, Howard V, Kissela B, Kittner S, Lloyd-Jones D, McDermott M, Meigs J, Moy C, Nichol G, O'Donnell CJ, Roger V, Rumsfeld J, Sorlie P, Steinberger J, Thom T, Wasserthiel-Smoller S, Hong Y; American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart disease and stroke statistics--2007 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation*. 2007;115:e69-171.
2. Hollander M, Bots ML, Del Sol AI, Koudstaal PJ, Wittteman JC, Grobbee DE, Hofman A, Breteler MM. Carotid plaques increase the risk of stroke and subtypes of cerebral infarction in asymptomatic elderly: the Rotterdam study. *Circulation*. 2002;105:2872-7
3. Glass CK, Witztum JL. Atherosclerosis. *Cell*. 2001; 104: 503-516.
4. Stary HC, Chandler AB, Glagov S, Guyton JR, Insull W Jr, Rosenfeld ME, Schaffer A, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis: a report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. Special report. *Arterioscler Thromb*. 1994;14:840-856.
5. Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W Jr, Rosenfeld ME, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1995;15:1512-31
6. Giannotti G, Landmesser U. Endothelial Dysfunction as an Early Sign of Atherosclerosis. *Herz*. 2007;32:568-572.
7. Virchow R. Phlogose und thrombose in getissystem, gesammelte unhandlungen zur wissenschaftlichen medlein. Frankfurt-am-Main, Germany: Meidinger Sohn; 1856.
8. von Rokitansky C. A Manual of Pathological Anatomy, Vol 4 [in orig lang]. London, UK: Sydenham Society; 1852.
9. Duguid JB. Thrombosis as a factor in the pathogenesis of coronary atherosclerosis. *J Pathol Bacteriol*. 1946;58:207-212.
10. Ross. R. and Glomset: The pathogenesis of atherosclerosis. *N. Engl. J. Med*. 1976;295: 369.
11. Yang Z, Ming XF. Recent advances in understanding endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Clin Med Res* 2006; 4:53-65.
12. K. J. Williams, I Tabas The response to retention Hypothesis of early atherogenesis *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*. 1995;15:551-561

13. Stoll G, Bendszus M. Inflammation and atherosclerosis: novel insights into plaque formation and destabilization. *Stroke*. 2006;37:1923-32.
14. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*. 2002; 420: 868-874.
15. Madamanchi NR, Vendrov A, Runge MS. Oxidative stress and vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25:29-38.
16. Fortunato G, Di Taranto MD. Polymorphisms and the expression of genes encoding enzymes involved in cardiovascular diseases. *Clin Chim Acta*. 2007;381:21-5.
17. Lusis AJ, Fogelman AM, Fonarow GC. Genetic basis of atherosclerosis: part I: new genes and pathways. *Circulation* 2004; 110:1868-73.
18. Stein O, Stein Y. Atheroprotective mechanisms of HDL. *Atherosclerosis* 1999; 144: 285-301.
19. Nakajima K, Nakano T, Tanaka A. The oxidative modification hypothesis of atherosclerosis: the comparison of atherogenic effects on oxidized LDL and remnant lipoproteins in plasma. *Clin Chim Acta*. 2006;367:36-47.
20. Witztum JL, Berliner JA. Oxidized phospholipids and isoprostanes in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 1998;9: 441-448.
21. Lehoux S, Castier Y, Tedgui A. Molecular mechanisms of the vascular responses to haemodynamic forces. *J Intern Med*. 2006;259:381-92.
22. Mertens A, Holvoet P. Oxidized LDL and HDL: antagonists in atherothrombosis. *FASEB J*. 2001;15:2073-84.
23. Charo IF, Taubman MB. Chemokines in the pathogenesis of vascular disease. *Circ Res*. 2004;95:858-66
24. Galkina E, Ley K. Vascular adhesion molecules in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27:2292-301.
25. Dhaliwal BS, Steinbrecher UP. Scavenger receptors and oxidized low density lipoproteins. *Clin Chim Acta*. 1999;286:191-205.
26. Ross R. Atherosclerosis: an inflammatory disease. *N. Engl J Med*. 1999; 340: 115-126.
27. Shah PK. Mechanisms of plaque vulnerability and rupture. *J Am Coll Cardiol* 2003; 41: 15-22.
28. Libby P. Current concepts of the pathogenesis of the acute coronary syndromes. *Circulation*. 2001; 104: 365-372.
29. Kavey RE, Allada V, Daniels SR, Hayman LL, McCrindle BW, Newburger JW, Parekh RS, Steinberger J. Cardiovascular Risk Reduction in High-Risk Pediatric Patients: A Statement From the American Heart Association Expert Panel on Population and Prevention Science. *Circulation*. 2006;114:2710-38

30. Mazzolai L, Hayoz D. The renin-angiotensin system and atherosclerosis. *Curr Hypertens Rep.* 2006;8:47-53.
31. Kadoglou NP, Iliadis F, Liapis CD. Exercise and Carotid Atherosclerosis. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2007 Nov 5
32. Schmidt AM, Yan SD, Wautier JL, Stern D. Activation of receptor for advanced glycation end products: a mechanism for chronic vascular dysfunction in diabetic vasculopathy and atherosclerosis. *Circ Res.* 1999;84:489-97.
33. Poirier P, Giles TD, Bray GA, Hong Y, Stern JS, Pi-Sunyer FX, Eckel RH. Obesity and cardiovascular disease: pathophysiology, evaluation, and effect of weight loss. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26:968–976.
34. Klein S, Burke LE, Bray GA, Blair S, Allison DB, Pi-Sunyer X, Hong Y, Eckel RH. Clinical implications of obesity with specific focus on cardiovascular disease: a statement for professionals from the American Heart Association Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism. *Circulation.* 2004;110:2952–2967.
35. McGill HC Jr, McMahan CA, Herderick EE, Zieske AW, Malcom GT, Tracy RE, Strong JP; Pathobiological Determinants of Atherosclerosis in Youth (PDAY) Research Group. Obesity accelerates the progression of coronary atherosclerosis in young men. *Circulation.* 2002;105:2712-8.
36. Willams MS. Genetics of arterial prothrombotic risk states. *Exp Biol Med* 2001; 226: 409-19.
37. Wu AHB. Correlation of polymorphisms to coagulation and biochemical risk factors for cardiovascular diseases. *Am J Cardiol* 2001; 87: 1361-6.
38. Humphries SE, Morgan L. Genetic risk factors for stroke and carotid atherosclerosis: insights into pathophysiology from candidate gene approaches. *Lancet Neurol* 2004; 3:227–235.
39. Iacoviello L, Burzotta F, Di Castelnuovo A, Zito F, Marchioli R, Donati MB. The 4G/5G polymorphism of PAI-1 promoter gene and the risk of myocardial infarction: a meta-analysis. *Thromb Haemost.* 1998;80:1029-30
40. Lentz SR. Mechanisms of homocysteine-induced atherothrombosis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2007;3: 1646–1654
41. Kluijtmans LA, Whitehead AS. Methylene tetrahydrofolate reductase genotypes and predisposition to atherothrombotic disease; evidence that all three MTHFR C677T genotypes confer different levels of risk. *Eur Heart J.* 2001;22:294-9.
42. Morgan L, Humphries S. The genetics of stroke. *Curr Opin Lipidol* 2005 16:193–199
43. Boerwinkle E, Leffert CC, Lin J, Lackner C, Chiesa G, Hobbs HH. Apolipoprotein(a) gene accounts for greater than 90% of the variation in plasma lipoprotein(a) concentrations. *J Clin Invest.* 1992;90:52-60.
44. Stary HC. Natural history and histological classification of atherosclerotic lesions: an update. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20:1177-8.

45. Jialal I, Fuller CJ. Effect of vitamin E, vitamin C and beta-carotene on LDL oxidation and atherosclerosis. *Can J Cardiol.* 1995;11 Suppl G:97G-103G.
46. Furlong CE, Richter RJ, Seidel SL, Costa LG, Motulsky AG. Spectrophotometric assays for the enzymatic hydrolysis of the active metabolites of chlorpyrifos and parathion by plasma paraoxonase/arylesterase. *Anal Biochem.* 1989;180:242-7.
47. Costa LG, Li WF, Richter RJ, Shih DM, Lusic A, Furlong CE. The role of paraoxonase (PON1) in the detoxication of organophosphates and its human polymorphism. *Chem Biol Interact.* 1999;119-120:429-38.
48. Ng CJ, Shih DM, Hama SY, Villa N, Navab M, Reddy ST. The paraoxonase gene family and atherosclerosis. *Free Radic Biol Med.* 2005;38:153-63.
49. Mackness, M. I.; Arrol, S. Abbott, C.; Durrington. Protection of low-density lipoprotein against oxidative modification by high-density lipoprotein associated paraoxonase, *Atherosclerosis* 1993;104: 129-135.
50. Harel M, Aharoni A, Gaidukov L, Brumshtein B, Khersonsky O, Meged R, Dvir H, Ravelli RB, McCarthy A, Toker L, Silman I, Sussman JL, Tawfik DS. Structure and evolution of the serum paraoxonase family of detoxifying and anti-atherosclerotic enzymes. *Nat Struct Mol Biol.* 2004;11:412-9.
51. Primo-Parmo SL, Sorenson RC, Teiber J, La Du BN. The human serum paraoxonase/arylesterase gene (PON1) is one member of a multigene family. *Genomics.* 1996;33:498-507.
52. Robertson KS, Hawe E, Miller GJ, Talmud PJ, Humphries SE. Human paraoxonase gene cluster polymorphisms as predictors of coronary heart disease risk in the prospective Northwick Park Heart Study II. *Biochimica et Biophysica Acta* 2003; 1639:203– 212
53. Mackness B, Durrington PN, Abuashia B, Boulton AJ, Mackness MI. Low paraoxonase activity in type II diabetes mellitus complicated by retinopathy. *Clin Sci.* 2000;98:355– 63.
54. Fortunato G, Rubba P, Panico S, Trono D, Tinto N, Mazzaccara C, De Michele M, Iannuzzi A, Vitale DF, Salvatore F, Sacchetti L. A paraoxonase gene polymorphism, PON1 (55) as an independent risk factor for increased carotid intima-media thickness in middle-aged women. *Atherosclerosis.* 2003;167:141–8.
55. Marchesani M, Hakkarainen A, Tuomainen TP, Kaikkonen J, Pukkala E, Uimari P, Seppala E, Matikainen M, Kallioniemi OP, Schleutker J, Lehtimaki T, Salonen JT. New paraoxonase 1 polymorphism I102V and the risk of prostate cancer in Finnish men. *J Natl Cancer Inst.* 2003;95:812-8.
56. Brophy VH, Hastings MD, Clendenning JB, Richter RJ, Jarvik GP, Furlong CE. Polymorphisms in the human paraoxonase (PON1) promoter. *Pharmacogenetics.* 2001;11:77-84.
57. Kumon Y, Suehiro T, Ikeda Y, Hashimoto K. Human paraoxonase-1 gene expression by HepG2 cells is downregulated by interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha, but is upregulated by interleukin-6. *Life Sci.* 2003;73:2807-15.

58. de Roos NM, Schouten EG, Scheek LM, van Tol A, Katan MB. Replacement of dietary saturated fat with trans fat reduces serum paraoxonase activity in healthy men and women. *Metabolism*. 2002;51:1534-7.
59. Senti M, Tomás M, Anglada R, Elosua R, Marrugat J, Covas MI, Fitó M. Interrelationship of smoking, paraoxonase activity, and leisure time physical activity: a population-based study. *Eur J Intern Med*. 2003;14:178-184.
60. Jarvik GP, Tsai NT, McKinsty LA, Wani R, Brophy VH, Richter RJ, Schellenberg GD, Heagerty PJ, Hatsukami TS, Furlong CE. Vitamin C and E intake is associated with increased paraoxonase activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22:1329-33
61. Costa LG, Vitalone A, Cole TB, Furlon CE. Modulation of paraoxonase (PON1) activity. *Biochemical Pharmacology* 2005; 69:541–550
62. Durrington PN, Mackness B, Mackness MI. Paraoxonase and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001;21:473-80.
63. Shih DM, Xia YR, Wang XP, Miller E, Castellani LW, Subbanagounder G, Cheroutre H, Faull KF, Berliner JA, Witztum JL, Luscis AJ. Combined serum paraoxonase knockout/apolipoprotein E knockout mice exhibit increased lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *J Biol Chem*. 2000;275:17527-35.
64. Tward A, Xia YR, Wang XP, Shi YS, Park C, Castellani LW, Luscis AJ, Shih DM. Decreased atherosclerotic lesion formation in human serum paraoxonase transgenic mice. *Circulation*. 2002;106:484-90.
65. Oda MN, Bielicki JK, Ho TT, Berger T, Rubin EM, Forte TM. Paraoxonase 1 overexpression in mice and its effect on high-density lipoproteins. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002;290:921-7
66. Ng CJ, Wadleigh DJ, Gangopadhyay A, Hama S, Grijalva VR, Navab M, Fogelman AM, Reddy ST. Paraoxonase-2 is a ubiquitously expressed protein with antioxidant properties and is capable of preventing cell-mediated oxidative modification of low density lipoprotein. *J Biol Chem*. 2001;276:44444–9.
67. Hegele RA, Connelly PW, Scherer SW, Hanley AJ, Harris SB, Tsui LC, Zinman B. Paraoxonase-2 gene (PON2) G148 variant associated with elevated fasting plasma glucose in noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997;82:3373-7.
68. Shi J, Zhang S, Tang M, Liu X, Li T, Han H, Wang Y, Guo Y, Zhao J, Li H, Ma C. Possible association between Cys311Ser polymorphism of paraoxonase 2 gene and late-onset Alzheimer's disease in Chinese. *Brain Res Mol Brain Res*. 2004;120:201-4.
69. Ng CJ, Bourquard N, Grijalva V, Hama S, Shih DM, Navab M, Fogelman AM, Luscis AJ, Young S, Reddy ST. Paraoxonase-2 deficiency aggravates atherosclerosis in mice despite lower apolipoprotein-B-containing lipoproteins: anti-atherogenic role for paraoxonase-2. *J Biol Chem*. 2006;281:29491-500.
70. Draganov DI, Stetson PL, Watson CE, Billecke SS, La Du BN. Rabbit serum paraoxonase 3 (PON3) is a high density lipoprotein-associated lactonase and protects low density lipoprotein against oxidation. *J Biol Chem*. 2000;275:33435-42.

71. Campo S, Sardo AM, Campo GM, Avenoso A, Castaldo M, D'Ascola A, Giunta E, Calatroni A, Saitta A. Identification of paraoxonase 3 gene (PON3) missense mutations in a population of southern Italy. *Mutat Res.* 2004;546:75-80.
72. Reddy ST, Wadleigh DJ, Grijalva V, Ng C, Hama S, Gangopadhyay A, Shih DM, Lulis AJ, Navab M, Fogelman AM. Human paraoxonase-3 is an HDL-associated enzyme with biological activity similar to paraoxonase-1 protein but is not regulated by oxidized lipids. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21:542-7.
73. Zhou Z, Connell MC, MacEwan DJ. TNFR1-induced NF-kappaB, but not ERK, p38MAPK or JNK activation, mediates TNF-induced ICAM-1 and VCAM-1 expression on endothelial cells. *Cell Signal.* 2007;19:1238-48.
74. Cybulsky MI, Iiyama K, Li H, Zhu S, Chen M, Iiyama M, Davis V, Gutierrez-Ramos JC, Connelly PW, Milstone DS. A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis. *J Clin Invest.* 2001;107:1255-62.
75. Gu L, Okada Y, Clinton SK, Gerard C, Sukhova GK, Libby P, Rollins BJ. Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Mol Cell.* 1998;2:275-81.
76. Boring, L., Gosling, J., Cleary, M. & Charo, I. F. Decreased lesion formation in CCR2^{-/-} mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature* 1998; 394: 894-897
77. Clinton, S., Underwood, R., Sherman, M., Kufe, D. & Libby, P. Macrophage-colony stimulating factor gene expression in vascular cells and in experimental and human atherosclerosis. *Am. J. Pathol.* 1992;140:301-316
78. Smith JD, Trogan E, Ginsberg M, Grigaux C, Tian J, Miyata M. Decreased atherosclerosis in mice deficient in both macrophage colony-stimulating factor (op) and apolipoprotein E. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92:8264-8.
79. Saren, P., Welgus, H. G. & Kovanen, P. T. TNF- and IL-1 selectively induce expression of 92-kDa gelatinase by human macrophages. *J. Immunol.* 1996;157:4159-4165
80. Galis, Z., Sukhova, G., Lark, M. & Libby, P. Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J. Clin. Invest.* 1994;94:2493-2503
81. Herman MP, Sukhova GK, Libby P, Gerdes N, Tang N, Horton DB, Kilbride M, Breitbart RE, Chun M, Schönbeck U. Expression of neutrophil collagenase (matrix metalloproteinase-8) in human atheroma: a novel collagenolytic pathway suggested by transcriptional profiling. *Circulation.* 2001;104:1899-904.
82. Vila L. Cyclooxygenase and 5-lipoxygenase Pathways in the vessel wall: Role in atherosclerosis. *Medical Research Review* 2004; 24:399-424
83. Denzlinger C. Biology and pathophysiology of leukotrienes. *Crit Rev Oncol Hematol* 1996; 23: 167-223

84. Datta YH, Romano M, Jacobson BC, Golan DE, Serhan CN, Ewenstein BM. Peptido-leukotrienes are potent agonists of von Willebrand factor secretion and P-selectin surface expression in human umbilical vein endothelial cells. *Circulation* 1995; 92: 3304-3311
85. Porreca E, Di Febbo C, Di Sciullo A, Angelucci D, Nasuti M, Vitullo P, Reale M, Conti P, Cuccurullo F, Poggi A. Cysteinyl leukotriene D4 induced vascular smooth muscle cell proliferation: A possible role in myointimal hyperplasia. *Thromb Haemost* 1996; 76: 99-104.
86. Helgadóttir A, Manolescu A, Thorleifsson G, Gretarsdóttir S, Jonsdóttir H, Thorsteinsdóttir U, Samani NJ, Gudmundsson G, Grant SF, Thorgeirsson G, Sveinbjornsdóttir S, Valdimarsson EM, Matthiasson SE, Johannsson H, Gudmundsdóttir O, Gurney ME, Sainz J, Thorhallsdóttir M, Andresdóttir M, Frigge ML, Topol EJ, Kong A, Gudnason V, Hakonarson H, Gulcher JR, Stefansson K. The gene encoding 5-lipoxygenase activating protein confers risk of myocardial infarction and stroke. *Nat Genet.* 2004;36:233–239.
87. Dwyer JH, Allayee H, Dwyer KM, Fan J, Wu H, Mar R, Lusis AJ, Mehrabian M. Arachidonate 5-lipoxygenase promoter genotype, dietary arachidonic acid, and atherosclerosis. *N Engl J Med.* 2004;350:29 –37.
88. Mehrabian M, Allayee H, Wong J, Shi W, Wang XP, Shaposhnik Z, Funk CD, Lusis AJ. Identification of 5-lipoxygenase as a major gene contributing to atherosclerosis susceptibility in mice. *Circ Res.* 2002;91:120-6. Erratum in: *Circ Res.* 2002;91:e27.
89. Spanbroek R, Grabner R, Lotzer K, Hildner M, Urbach A, Ruhling K, Moos MP, Kaiser B, Cohnert TU, Wahlers T, Zieske A, Plenz G, Robenek H, Salbach P, Kuhn H, Radmark O, Samuelsson B, Habenicht AJ. Expanding expression of the 5-lipoxygenase pathway within the arterial wall during human atherogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:1238-43.
90. Cipollone F, Mezzetti A, Fazia ML, Cuccurullo C, Iezzi A, Uchino S, Spigonardo F, Bucci M, Cuccurullo F, Prescott SM, Stafforini DM. Association between 5-lipoxygenase expression and plaque instability in humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:1665-70.
91. Fantuzzi G, Mazzone T. Adipose tissue and Atherosclerosis: exploring the connection. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27:996-1003
92. Shimada K, Miyazaki T, Daida H. Adiponectin and atherosclerotic disease. *Clin Chim Acta.* 2004;344:1-12.
93. Tilg H, Moschen AR. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nature Review Immunology* 2006;6:772-783
94. Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Tsuchida A, Yokomizo T, Kita S, Sugiyama T, Miyagishi M, Hara, K, Tsunoda M, Murakami K, Ohteki T, Uchida S, Takekawa S, Waki H, Tsuno NH, Shibata Y, Terauchi Y, Froguel P, Tobe K, Koyasu S, Taira K, Kitamura T, Shimizu T, Nagai R, Kadowaki T 2003 Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature* [Erratum (2004) 431:1123] 423:762–769

95. Kadowaki T, Yamauchi T. Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocr Rev.* 2005;26:439-51.
96. Li CJ, Sun HW, Zhu FL, Chen L, Rong YY, Zhang Y, Zhang M. Local adiponectin treatment reduces atherosclerotic plaque size in rabbits. *J Endocrinol.* 2007;193:137-45.
97. Okamoto Y, Arita Y, Nishida M, Muraguchi M, Ouchi N, Takahashi M, Igura T, Inui Y, Kihara S, Nakamura T, Yamashita S, Miyagawa J, Funahashi T, Matsuzawa Y. An adipocyte-derived plasma protein, adiponectin, adheres to injured vascular walls. *Horm Metab Res.* 2000;32:47-50.
98. Karaduman M, Sengul A, Oktenli C, Pekel A, Yesilova Z, Musabak U, Sanisoglu SY, Gunay C, Baysan O, Kocar IH, Tatar H, Ozata M. Tissue levels of adiponectin, tumour necrosis factor-alpha, soluble intercellular adhesion molecule-1 and heart-type fatty acid-binding protein in human coronary atherosclerotic plaques. *Clin Endocrinol.* 2006;64:196-202
99. Wolf AM, Wolf D, Avila MA, Moschen AR, Berasain C, Enrich B, Rumpold H, Tilg H. Up-regulation of the anti-inflammatory adipokine adiponectin in acute liver failure in mice. *J Hepatol.* 2006;44:537-43.
100. Biller J, Feinberg WM, Castaldo JE, Whittemore AD, Harbaugh RE, Dempsey RJ, Caplan LR, Kresowik TF, Matchar DB, Toole JF, Easton JD, Adams HP Jr, Brass LM, Hobson RW 2nd, Brott TG, Sternau L. Guidelines for carotid endarterectomy: a statement for healthcare professionals from a Special Writing Group of the Stroke Council, American Heart Association. *Circulation.* 1998;97:501-9.
101. Napoli C, Glass CK, Witztum JL, Deutsch R, D'Armiento FP, Palinski W. Influence of maternal hypercholesterolaemia during pregnancy on progression of early atherosclerotic lesions in childhood: Fate of Early Lesions in Children (FELIC) study. *Lancet.* 1999;354:1234-41.
102. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987;162:156-9.
103. Horke S, Witte I, Wilgenbus P, Kruger M, Strand D, Forstermann U. Paraonase-2 reduces oxidative stress in vascular cells and decreases endoplasmic reticulum stress-induced caspase activation. *Circulation.* 2007;115:2055-64.
104. Ng CJ, Hama SY, Bourquard N, Navab M, Reddy ST. Adenovirus mediated expression of human paraonase 2 protects against the development of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Mol Genet Metab.* 2006;89:368-73.
105. Levy E, Trudel K, Bendayan M, Seidman EG, Delvin E, Lavoie JC, Precourt LP, Amre D, Sinnott D. Biological role, Protein Expression, Subcellular Localization and Oxidative Stress Response of Paraonase2 in the Intestine of Humans and Rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2007 Oct 4
106. Allagui MS, Vincent C, El Feki A, Gaubin Y, Croute F. Lithium toxicity and expression of stress-related genes or proteins in A549 cells. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1773:1107-1115

107. Rosenblat M, Draganov D, Watson CE, Bisgaier CL, La Du BN, Aviram M. Mouse macrophage paraoxonase 2 activity is increased whereas cellular paraoxonase 3 activity is decreased under oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:468-74.
108. Shiner M, Fuhrman B, Aviram M. A biphasic U-shape effect of cellular oxidative stress on the macrophage anti-oxidant paraoxonase 2 (PON2) enzymatic activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;349:1094-9.
109. Rosenblat M, Hayek T, Hussein K, Aviram M. Decreased macrophage paraoxonase 2 expression in patients with hypercholesterolemia is the result of their increased cellular cholesterol content: effect of atorvastatin therapy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24:175-80.
110. Fair, K. Pritchard, Oxidized low density lipoprotein increases U937 cell 5-lipoxygenase activity: induction of 5-lipoxygenase activating protein, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1994;201:1014–1020.
111. Behre CJ. Adiponectin, obesity and atherosclerosis. *Scand J Clin Lab Invest.* 2007;67:449-58.
112. Maeda K, Okubo K, Shimomura I, Funahashi T, Matsuzawa Y, Matsubara K. cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1). *Biochem Biophys Res Commun* 1996;221:286–9.

8. Lista delle abbreviazioni

5-LO	5-Lipossigenasi
AdipoR1	Recettore per l'adiponectina 1
AdipoR2	Recettore per l'adiponectina 2
AGE	Prodotti di Glicosilazione Avanzata
AHA	American Heart Association
apo(a)	Apolipoproteina (a)
apoA	Apolipoproteina A
apoB	Apolipoproteina B
apoB100	Apolipoproteina B100
apoE	Apolipoproteina E
BMI	Indice di Massa Corporea
Ct	Ciclo Soglia
ELISA	Enzyme Linked Immunoassay
ER	Espressione Relativa
FGF	Fattore di Crescita dei Fibroblasti
FLAP	5-Lipossigenasi Activating Protein
GTC	Soluzione di Guanidino-Tiocianato
GUSB	B-Glucuronidasi
HDL	Lipoproteine ad Alta Densità
HMW	High Molecular Weight
ICAM-1	Inercellular adhesion Molecule-1
IL-1	Interleuchina-1
IL-1B	Interleuchina-1b
IMT	Spessore Medio-Intimale
LDL	Lipoproteine a Bassa Densità
LDL-R	Recettore per Le Lipoproteine a Bassa Densità
LMW	Low Molecular Weight
Lp(a)	Lipoproteina (a)
LT	Leucotrieni
LTA4-H	Leucotriene A4 Idrolasi
LTC4-S	Leucotriene C4 Sintasi
MCP-1	Proteina Chemoattrattante per i Monociti-1

M-CSF	Fattore Colonie-Stimolante per i Macrofagi
MDA	Malondialdeide
MM-LDL	Lipoproteine a Bassa Densità Mediamente Ossidate
MMP	Metalloproteinasi
MMW	Medium Molecular Weight
mRNA	RNA Messaggero
MTHFR	Metilentetraidrofolato Reduttasi
NAC	N-Acetilcisteina
NO	Ossido Nitrico
oxLDL	Lipoproteine a Bassa Densità Ossidate
PAI-1	Inibitore Dell'attivatore del Plasminogeno
PCR	Reazione a Catena della Polimerasi
PDGF	Fattore di Crescita Derivato dalle Piastrine
PON1	Paraoxonase 1
PON2	Paraoxonase 2
PON3	Paraoxonase 3
RAGE	Recettori per i Prodotti di Glicosilazione Avanzata
RNasi	Ribonucleasi
ROS	Specie Reattive dell'ossigeno
RT	Retrotrascrizione
SEM	Errore Standard della Media
SMC	Cellule Muscolari Lisce
SN	Sovranatante
SR	Recettore Scavenger (Spazzino)
TGF-B	Fattore di Crescita Trasformante-B
TIA	Attacco Ischemico Transiente
TNF-a	Fattore di Necrosi Tumorale-a
t-PA	Attivatore Tissutale Del Plasminogeno
VCAM-1	Vascular Cell adhesion Molecule-1
VLDL	Lipoproteine a Bassissima Densità
WHO	Organizzazione Mondiale per la Salute

Molti dei dati sperimentali riportati in questa tesi di dottorato sono stati accettati per la pubblicazione su “Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology”.