



UNIVERSITÀ DI PISA

Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale
Direttore Prof. Mario Petrini

Dipartimento di Patologia Chirurgica, Medica, Molecolare e
dell'Area Critica
Direttore Prof. Paolo Miccoli

Dipartimento di Ricerca Traslazionale e delle Nuove Tecnologie in
Medicina e Chirurgia
Direttore Prof. Giulio Guido

Corso di Laurea Magistrale in Medicina e Chirurgia

Tesi di Laurea

**ANGIOGENESI, INFIAMMAZIONE E FUNZIONE ENDOTELIALE IN
DONNE IN POST MENOPAUSA AFFETTE DA SINDROME
METABOLICA**

RELATORE

Prof. TOMMASO SIMONCINI

CANDIDATO

ELENA CECCHI

Anno Accademico 2012/2013

“Be great in act, as you have been in thought”

William Shakespeare

INDICE

	SINTESI	5
1	INTRODUZIONE	9
2	LA MENOPAUSA: IL RISCHIO CARDIOVASCOLARE NEL SESSO FEMMINILE	11
	2.1 LA TRANSIZIONE MENOPAUSALE	11
	2.1.1 DEFINIZIONE	11
	2.1.2 ASPETTI CLINICI	13
	2.2 EPIDEMIOLOGIA DELLE MALATTIE CARDIO-VASCOLARI	14
	2.3 LA MENOPAUSA E IL SUO IMPATTO SUL RISCHIO CARDIOVASCOLARE	16
	2.4 PREVENZIONE: STILE DI VITA E TERAPIA ORMONALE SOSTITUTIVA	18
3	LA SINDROME METABOLICA	21
	3.1 INTRODUZIONE	21
	3.2 CRITERI DIAGNOSTICI	21
	3.3 LA SINDROME METABOLICA NEL SESSO FEMMINILE	25
4	ELEMENTI FISIOPATOLOGICI DELLA SINDROME METABOLICA	26
	4.1 INTRODUZIONE	26
	4.2 INSULINO-RESISTENZA	28
	4.3 OBESITA' VISCERALE	31
	4.4 DISLIPIDEMIA ATEROGENA	31
	4.5 LA DISFUNZIONE ENDOTELIALE	32

5	IL TESSUTO ADIPOSO COME ORGANO ENDOCRINO	35
5.1	INTRODUZIONE	35
5.2	CITOCINE PROINFIAMMATORIE	38
5.2.1	TUMOR NECROSIS FACTOR- α (TNF- α)	38
5.2.2	INTERLEUCHINA-6 (IL-6)	41
5.3	MEDIATORI COINVOLTI NELLA FUNZIONE ENDOTELIALE	43
5.3.1	L'ATTIVATORE UROCHINASI DEL PLASMINOGENO (uPA)	43
5.3.2	PLASMINOGEN ACTIVATOR INHIBITOR-1 (PAI-1)	45
5.3.3	LIGANDO SOLUBILE DEL CD40 (sCD40L)	46
5.4	ANGIOGENESI	47
5.4.1	INTERLEUCHINA-8 (IL-8)	47
5.4.2	ANGIOPOIETINA-2	48
5.4.3	LIGANDO SOLUBILE DI FAS (sFASL)	48
5.5	ADIPOCHINE E METABOLISMO	49
5.5.1	LEPTINA	49
5.5.2	ADIPONECTINA (ApN)	51
5.5.1	RESISTINA E VISFATINA	52
6	ANGIOGENESI, INFIAMMAZIONE E FUNZIONE ENDOTELIALE IN DONNE IN POST MENOPAUSA AFFETTE DA SINDROME METABOLICA	54
6.1	ABSTRACT	54
6.2	SCOPO DELLA TESI	55
6.3	INTRODUZIONE	55
6.4	MATERIALI E METODI	57
6.4.1	PARTECIPANTI E DISEGNO DELLO STUDIO	57
6.4.2	CRITERI DIAGNOSTICI DELLA SINDROME METABOLICA	58
6.4.3	ANALISI DEL SIERO	58

6.4.4	MISURAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE DEI DIVERSI ANALITI	58
6.4.5	CARATTERISTICHE DEL SAGGIO: BIO-PLEX SYSTEM	59
6.4.6	ANALISI STATISTICA	60
6.5	RISULTATI	61
6.6	DISCUSSIONE	66
6.7	CONCLUSIONI	71
7	BIBLIOGRAFIA	72

SINTESI

In Italia il peso complessivo delle malattie cardiovascolari, sul totale dei decessi, è pari al 44%, di cui la maggior parte è attribuibile a infarto del miocardio e ictus. Ogni anno circa 36 mila persone muoiono a causa di infarto acuto del miocardio. Valori così elevati sono dovuti principalmente all'invecchiamento della popolazione, causa di morbilità e mortalità per patologie di tipo degenerativo.

L'incidenza della patologia cardiovascolare aumenta progressivamente con l'età in entrambi i sessi. Tuttavia il sesso femminile presenta un incremento di incidenza relativamente rapido in corrispondenza della menopausa perché, in questa fase, si ha una diminuzione della protezione specifica che comporta un'aumentata suscettibilità agli effetti negativi dei fattori di rischio cardiovascolari. Il periodo di transizione menopausale rappresenta un momento critico di cambiamento del profilo lipidico, che conduce a un progressivo aumento dei fattori di rischio cardiovascolari durante gli anni post-menopausali. Sebbene la principale causa di questo maggior rischio sia la modificazione dell'assetto lipidico, secondario alla deficienza estrogenica, molti altri fattori ormonali e cambiamenti fisiologici concorrono a determinare tale aumento. Con la menopausa, ad esempio, si ha una redistribuzione del tessuto adiposo e un generale aumento di peso. I deleteri cambiamenti nella distribuzione del grasso corporeo si manifestano con un aumento dell'adiposità addominale (passaggio da un pattern ginoide a uno androide), che si verifica indipendentemente dall'età e dalla massa grassa totale¹. In definitiva, le modificazioni fisiologiche che avvengono durante la transizione menopausale, possono dar luogo allo sviluppo di una serie di fattori di rischio cardiovascolari (sovrappeso/obesità, disglucemia, dislipidemia) che in concomitanza determinano lo sviluppo della Sindrome Metabolica (MetS). Sono numerosi i criteri diagnostici utilizzati per definire questa sindrome.

Secondo l'ATP III parliamo di Sindrome metabolica quando sussistono almeno 3 delle seguenti condizioni: Circonferenza vita > 88cm, Dislipidemia (Trigliceridi > 150mg/dl e HDL < 50 mg/dl), Ipertensione arteriosa ($\geq 130/85$ mmHg), Iperglicemia (> 110 mg/dl).

La Sindrome metabolica è associata allo sviluppo di un processo infiammatorio, di disfunzione endoteliale, stress ossidativo e alterazioni del microcircolo che aumentano il rischio di sviluppare una patologia cardiovascolare e neoplastica. Appare quindi di notevole interesse comprendere il ruolo della menopausa e, soprattutto, della Sindrome metabolica nella genesi dei processi infiammatori e della disfunzione endoteliale.

L'obiettivo del presente studio è quello di valutare come la presenza della Sindrome metabolica determini delle alterazioni che favoriscono lo sviluppo di patologie cardiovascolari in donne, che a causa della condizione menopausale, sono maggiormente esposte a tale rischio.

Pertanto è stata misurata l'espressione di marker specifici relativi all'angiogenesi, all'infiammazione e alla funzione endoteliale in donne in post-menopausa affette o meno dalla Sindrome metabolica.

In collaborazione con l'Istituto di Biomedicina della Facoltà di Medicina dell'Universidad Católica de Santiago De Guayaquil in Ecuador sono state selezionate un totale di 204 donne in fisiologica post-menopausa che sono state valutate per il peso(BMI), per l'altezza, per la circonferenza vita (Waist Hip Ratio, WHR), per la pressione arteriosa. Inoltre, è stato effettuato un prelievo di un campione di sangue venoso periferico.

Fra queste sono state scelte 100 pazienti simili per età e per tempo dall'inizio della menopausa. Tra loro, 57 erano affette da Sindrome metabolica (definita secondo i criteri ATP III) mentre le rimanenti 43, sane, hanno costituito il gruppo di controllo. Sul siero di queste pazienti è stata valutata la concentrazione di mediatori relativa a:

- ❖ Angiogenesi: Angiopietina-2, Interleuchina-8 (IL-8) e il Ligando solubile di FAS (sFASL);
- ❖ Infiammazione: Interleuchina-6 (IL-6), Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α)
- ❖ Funzione endoteliale: Ligando solubile del CD40 (sCD40L), Inibitore-1 dell'attivatore del Plasminogeno (PAI-1), Attivatore urochinasi del plasminogeno (uPA)

I risultati di queste rilevazioni hanno evidenziato come le donne in post menopausa, affette da Sindrome Metabolica, presentino livelli più elevati di IL-6 (marker di infiammazione) e livelli più ridotti di uPA (marker di disfunzione endoteliale) rispetto al gruppo di controllo. Queste modificazioni potrebbero contribuire allo sviluppo e alla progressione di aterosclerosi clinicamente silente. Tali risultati sono coerenti con quelli di altri studi presenti in Letteratura.

Quando le concentrazioni degli analiti sono state confrontate con i singoli componenti diagnostici della Sindrome Metabolica, i più elevati livelli di IL-6 sono stati registrati fra le donne con obesità addominale, bassi livelli di HDL-C e ipertrigliceridemia. Appare quindi interessante la scoperta della correlazione tra la Sindrome metabolica, piuttosto che la menopausa stessa, e gli elevati livelli di questo fattore infiammatorio.

Per quanto concerne la funzione endoteliale, sono stati rilevati bassi valori di uPA e un trend non significativo di elevati livelli di PAI-1. Dall'analisi della fisiologica attività di queste proteine, possiamo dedurre che bassi livelli di uPA embricati, con tendenti elevati livelli di PAI-1, potrebbero favorire la maggiore incidenza di eventi tromboembolici nelle donne in post-menopausa affette da Sindrome metabolica. In questa ottica, i nostri risultati evidenziano la necessità di ulteriori studi per valutare la possibilità di utilizzare il sistema PAI-1/uPA come marker di rischio cardiovascolare nelle donne in post-menopausa.

Infine, è stata misurata l'espressione del ligando solubile di CD40 (sCD40L) che è coinvolto nella genesi del processo aterosclerotico, contribuendo allo sviluppo di un quadro infiammatorio e pro-trombotico. Sebbene, nelle nostre pazienti con Sindrome metabolica sia presente una tendenza, non statisticamente significativa, di elevati livelli di sCD40L, questo trend diventa significativo nelle donne con iperglicemia e bassi livelli di HDL-C. Lo stato pro-infiammatorio associato con la Sindrome metabolica induce un'alterazione delle proprietà antiinfiammatorie e ateroprotettive delle HDL, aumentando il rischio di sviluppare diabete e patologie cardiovascolari. Infatti, elevati livelli di IL-6, registrati nella popolazione affetta da Sindrome metabolica, conducono sia ad un profilo lipidico alterato (bassi livelli di HDL-C e

alti livelli di Trigliceridi) sia ad una condizione di disfunzione endoteliale (bassi livelli di uPA).

In conclusione se, come emerge dal nostro studio, la Sindrome metabolica contribuisce allo sviluppo di aterosclerosi e di patologia cardiovascolare, la promozione di programmi educativi, alimentari e motori rappresenta un possibile strumento di prevenzione delle complicanze della Sindrome metabolica, soprattutto fra le giovani donne in post menopausa. Inoltre, considerando che dal nostro studio emerge che le alterazioni correlano principalmente con la presenza di specifiche componenti della Sindrome metabolica (obesità viscerale, bassi livelli di HDL e ipertrigliceridemia) risulta fondamentale promuovere una serie di misure volte al miglioramento di questi aspetti. Ad esempio, è opportuno promuovere un'attività fisica costante (30 minuti di esercizi per 4 volte alla settimana) associata ad un'alimentazione adeguata (riduzione dell'introito di carboidrati e di grassi saturi). Al fine di ottenere la massima compliance delle pazienti in questa fascia d'età è sicuramente necessaria una personalizzazione del programma che si adegui allo stile di vita della paziente e alle sue eventuali comorbidità.

Tale programma educativo mirato potrebbe quindi risultare una valida arma terapeutica per ridurre la morbilità e la mortalità cardiovascolare in donne in post-menopausa con la Sindrome metabolica.

1 INTRODUZIONE

In Italia più del 30 per cento della popolazione femminile ossia oltre 10 milioni donne, è in menopausa e il fenomeno è destinato ad ampliarsi nel tempo sia a causa dell'aumento della popolazione femminile, sia per il prolungamento dell'attesa di vita (dai 50 anni che segnavano l'età media della donna agli inizi del 900, si è attualmente passati agli 80 anni).

Questo straordinario traguardo, determinato dai rapidi progressi nel campo della ricerca medico-scientifica e dalle migliori condizioni di vita, induce ad una seria riflessione. La donna si trova oggi a gestire almeno 30 anni della propria esistenza dopo la menopausa, che, da evento riservato a poche persone, e spesso per un arco di tempo limitato, è diventata una vera e propria stagione della vita da affrontare con lucida consapevolezza, mantenendo le migliori condizioni di salute psicofisica.

In questa ottica si situa il presente lavoro.

E' ormai noto da anni come i cambiamenti fisiologici che accompagnano la transizione menopausale esitano in un aumento del rischio cardiovascolare. La ricerca scientifica si è a lungo impegnata sullo studio degli aspetti fisiopatologici caratteristici della fase menopausale, del loro impatto sulla qualità di vita della donna, e sulla mortalità. Appare chiaro come il progressivo sviluppo di ipoestrogenismo e di riduzione nel numero dei follicoli ovarici sia alla base della modificazione del peso corporeo e della distribuzione dei tessuti adiposi, nonché delle alterazioni del profilo lipidico e della sensibilità all'insulina che concorrono ad aumentare il rischio di patologia coronarica nelle donne in post menopausa.

La presenza di questi molteplici fattori se variabilmente associati possono determinare lo sviluppo della Sindrome metabolica condizione definita dalla presenza di un cluster di fattori di rischio cardiovascolare che possono riconoscere come denominatore comune l'obesità e l'insulino-resistenza. La Sindrome metabolica si associa ad alterazioni della

funzione endoteliale, del processo coagulativo dello stato infiammatorio che concorrono allo sviluppo di un quadro patologico. Appare evidente come sia sempre più necessario comprendere i meccanismi molecolari che sono alla base delle patologie cardiovascolari e di identificare le varie condizioni sia fisiologiche, come la menopausa, sia patologiche, come la Sindrome metabolica che possono interferire con la qualità di vita di un individuo e soprattutto con la sua mortalità. L'obiettivo della ricerca scientifica deve essere quindi quello di approfondire quanto sopra detto per contribuire alla creazione di programmi di prevenzione e di cura sempre più mirati.

I risultati del presente lavoro sono stati inoltre ottenuti attraverso l'utilizzo di tecniche di biologia molecolare estremamente innovative. Ciò suggerisce come questo campo della medicina non sia poi così lontano dalla pratica clinica e che ricerche in questo settore possano essere alla base dell'avanzamento delle strategie diagnostiche e terapeutiche future.

2 LA MENOPAUSA: IL RISCHIO CARDIOVASCOLARE NEL SESSO FEMMINILE

2.1 LA TRANSIZIONE MENOPAUSALE

Il climaterio rappresenta una fase di transizione della vita femminile, durante la quale cessa progressivamente la capacità riproduttiva, in quanto l'attività secretoria dell'ovaio si riduce, a causa dell'esaurirsi del suo patrimonio follicolare e dell'insensibilità alla stimolazione gonadotropinica da parte dei follicoli residui. Il declino della funzione ovarica si ripercuote inoltre su tutta una vasta serie di funzioni di carattere metabolico, psicologico, sessuale che contribuiscono a rendere complesso ed, al tempo stesso, estremamente variabile il quadro soggettivamente vissuto da ogni donna in questa condizione.

2.1.1 DEFINIZIONE

Dal 1980 l'Organizzazione Mondiale Della Sanità (WHO) ha organizzato due gruppi di lavoro con l'obiettivo di stabilire e chiarire la nomenclatura per il periodo riproduttivo femminile e proporre una stadiazione delle varie fasi.

Nella prima definizione proposta dalla WHO, il termine Menopausa descriveva lo stadio che cominciava dopo 12 mesi dopo il Periodo Mestruale Finale (*Final Mestrual Period*, FMP) anche definito post-menopausa. Mentre con perimenopausa veniva inteso tutto il periodo compreso dall'inizio della comparsa dei sintomi tipici della condizione menopausale fino a un anno successivo il FMP.

La classificazione della WHO è stata revisionata, nel 2001, dal *Stages Of Reproductive Aging Workshop* (STRAW) e nuovamente 10 anni dopo dal *STRAW+10 ReSTAGE Collaboration*².

Come definitivo dal sistema di stadiazione STRAW, la Transizione Menopausale (MT) comincia con la comparsa di alterazioni della lunghezza del ciclo mestruale associato a diminuzione della concentrazione dell'inibina B e dell'Ormone Anti-Mulleriano (AMH) e

un aumento dell'ormone follicolo stimolante (FSH). Termina con l'FMP, classicamente confermato dopo 12 mesi di amenorrea³. Tipicamente la transizione menopausale inizia alla fine della quarta decade inizio della quinta e dura circa quattro/sette anni.

La stadiazione STRAW è considerata il gold standard per definire l'età riproduttiva di una donna. Esso si basa sulla valutazione delle caratteristiche del ciclo mestruale, su markers endocrinologici e sull'imaging delle ovaie. Lo STRAW+10, rifacendosi ai criteri STRAW, ha migliorato la definizione dei parametri da valutare del ciclo mestruale, ha aggiunto la durata delle varie fasi e i vari stadi (Figura1).

Questo sistema classificativo divide la vita riproduttiva e post-riproduttiva in 7 stadi dove la transizione menopausale ne occupa due. L'evento principale è rappresentato dall'FMP (stadio 0) che è preceduto da 5 stadi e seguito da 2.

	Menarche				FMP (0)					
Stage	-5	-4	-3b	-3a	-2	-1	+1 a	+1b	+1c	+2
Terminology	REPRODUCTIVE				MENOPAUSAL TRANSITION		POSTMENOPAUSE			
	Early	Peak	Late		Early	Late	Early			Late
Duration	variable				variable	1-3 years	2 years (1+1)	3-6 years		Remaining lifespan
PRINCIPAL CRITERIA										
Menstrual Cycle	Variable to regular	Regular	Regular	Subtle changes in Flow/ Length	Variable Length Persistent ≥7- day difference in length of consecutive cycles	Interval of amenorrhea of >-60 days				
SUPPORTIVE CRITERIA										
Endocrine FSH AMH Inhibin B			Low Low	Variable* Low Low	↑ Variable* Low Low	↑ >25 IU/L** Low Low	↑ Variable Low Low	Stabilizes Very Low Very Low		
Antral Follicle Count			Low	Low	Low	Low	Very Low	Very Low		
DESCRIPTIVE CHARACTERISTICS										
Symptoms						Vasomotor symptoms Likely	Vasomotor symptoms Most Likely			Increasing symptoms of urogenital atrophy

* Blood draw on cycle days 2-5 ↑ = elevated
 **Approximate expected level based on assays using current international pituitary standard⁶⁷⁻⁶⁹

Figura 1: Il sistema classificativo STRAW+10 (adattato da Siobán D. Harlow J Clin Endocrinol Metab. 2012³.)

2.1.2 ASPETTI CLINICI

La transizione menopausale è un evento fisiologico nella vita della donna, nonostante questo è in grado di modificare profondamente la qualità della vita. Infatti in questo periodo le donne sperimentano inaspettati e fastidiosi sintomi e il loro corpo si modifica sotto l'influenza delle variazioni ormonali e fisiche. Le manifestazioni cliniche associate a questo periodo comprendono sintomi vasomotori, alterazioni del sonno, cambiamenti dell'umore, disturbi urogenitali e disfunzione sessuale. Fra questi, sicuramente, i più frequenti sono i sintomi vasomotori che interessano circa il 75% delle donne e in genere si risolvono in 1-5 anni.

Con la menopausa, si ha una redistribuzione del tessuto adiposo e un generale aumento di peso. Il tasso annuale di aumento di peso, stimato intorno a 0,5 kg/anno, è indipendente dallo stato menopausale mentre è fortemente correlato a l'età⁴. In antitesi, la redistribuzione del grasso corporeo è notevolmente influenzata dai cambiamenti ormonali che avvengono durante la transizione menopausale⁵. I deleteri cambiamenti nella distribuzione del grasso corporeo consistono in un aumento dell'adiposità addominale (passaggio da un pattern ginoide a uno androide) determinato da un selettivo accumulo di tessuto adiposo nel compartimento addominale⁶ che avviene indipendentemente dall'età e dalla massa grassa totale¹.

Dalla misurazione TC dell'estensione dei depositi adiposi viscerali è emerso che donne in post-menopausa presentano, rispetto a quelle in premenopausa, un aumento del grasso intraddominale. Le stesse considerazioni possono essere fatte anche valutando il rapporto vita-fianchi (*Waist to hip ratio*, WHR).

Nelle donne in menopausa l'aumento dell'adiposità viscerale si associa a deleteri cambiamenti nell'espressione di marker di infiammazione e di adipochine⁷. Inoltre le proteine plasmatiche di trasporto, *sex hormone binding globuline* (SHBG) sono degli

importanti marker indipendenti di rischio di sviluppo di insulino resistenza^{8,9}, di diabete mellito tipo 2 e di malattie cardiovascolari¹⁰⁻¹². Le concentrazioni di SHBG nelle donne in post-menopausa sono negativamente correlate con l'estensione dei depositi viscerali^{13,14}. Quindi in donne in post-menopausa l'accumulo eccessivo di grasso viscerale e bassi livelli di SHBG sono fattori predittivi indipendenti di rischio di sviluppare una patologia metabolica.

In definitiva gli anni intorno alla menopausa sono associati a profondi cambiamenti del peso corporeo, dell'assetto ormonale, del profilo lipidico (aumento delle LDL e dei Trigliceridi) che possono favorire lo sviluppo di malattie cardiovascolari.

Inoltre tutte queste alterazioni possono comportare lo sviluppo della Sindrome Metabolica e quindi rappresentare una ulteriore opportunità di sviluppo di patologie coronariche.

2.2 EPIDEMIOLOGIA DELLE MALATTIE CARDIO-VASCOLARI

In Italia il peso complessivo delle malattie cardiovascolari sul totale dei decessi è pari al 44%, di cui il 30% è dovuto all'infarto del miocardio e il 31% all'ictus. Ogni anno circa 36 mila persone muoiono a causa di infarto acuto del miocardio. Valori così elevati sono dovuti principalmente all'invecchiamento della popolazione, causa di morbilità e mortalità per patologie di tipo degenerativo.

Negli uomini la stima dei casi prevalenti nel 2000 è stata di 220.000 casi nella fascia di età compresa fra 25 e 74 anni. Si stima che ogni giorno si verifichino circa 90 nuovi casi, 1 caso ogni 16 minuti; nelle donne, le ammalate sono 39.000 l'anno, e si stima che ogni giorno si verifichino 30 nuovi casi, quindi 1 caso ogni 48 minuti¹⁵.

L'incidenza della patologia cardiovascolare aumenta progressivamente con l'età in entrambi i sessi, ma il sesso femminile presenta un incremento di incidenza relativamente rapido in corrispondenza della menopausa.

Le donne presentano le malattie cardiovascolari con un ritardo di almeno 10 anni rispetto agli uomini: complessivamente hanno quindi meno eventi, ma di tipo più grave.

Il quadro clinico non è così evidente come quello del sesso maschile: spesso il dolore manca, è localizzato in altra sede ed è confuso con quello derivato da altre patologie. Per questo, generalmente le donne si recano in ospedale più tardi rispetto agli uomini.

I dati epidemiologici raccolti dall'Osservatorio Epidemiologico Cardiovascolare (OEC), su una popolazione italiana afferente ai 51 centri nazionali costituenti l'OEC, mostrano che in media la distribuzione dei fattori di rischio è la seguente:

- ❖ il 30 % degli uomini fuma in media 17 sigarette al giorno, contro il 21% delle donne che ne fuma 13;
- ❖ il 34% degli uomini e il 46% delle donne non svolge alcuna attività fisica durante il tempo libero;
- ❖ il 20% degli uomini e il 24% delle donne ha una colesterolemia totale uguale o superiore a 240 mg/dl;
- ❖ il 33% degli uomini e il 30% delle donne ha pressione arteriosa uguale o superiore a 160/95 mmHg oppure è sotto trattamento farmacologico specifico;
- ❖ il 18% degli uomini e il 22% delle donne sono obesi;
- ❖ l'8% degli uomini e il 6% delle donne è diabetico.

Le malattie cardiovascolari presentano una morbosità molto elevata. In media in Italia la familiarità per le malattie cardiovascolari riguarda il 24% degli uomini e il 30% delle donne.

I dati delle singole malattie cardiovascolari (infarto, ictus, angina pectoris, claudicatio intermittens, TIA, fibrillazione atriale) derivano dall'Osservatorio Epidemiologico Cardiovascolare (OEC).

La prevalenza nelle diverse malattie nella fascia di età compresa fra 35 e 74 anni, è:

- ❖ infarto: 1,5% negli uomini e 0,4% nelle donne;
- ❖ ictus: 1,1% negli uomini e 0,8% nelle donne;
- ❖ fibrillazione atriale: 0,8% negli uomini e 0,7% nelle donne;
- ❖ angina pectoris: 3,3% negli uomini e 3,9% nelle donne;
- ❖ claudicatio intermittens: 1,9% negli uomini e 2,5% nelle donne;
- ❖ TIA: 0,8% negli uomini e 0,6% nelle donne.

I dati relativi agli eventi coronarici, evidenziano che negli uomini, con una fascia di età compresa tra 25 e 84 anni, il Tasso di incidenza Standardizzato (TSE) è pari a 141,9 casi per 10.000 abitanti, mentre, nelle donne di pari età, il Tasso Standardizzato è pari a 36,9 casi per 10.000 abitanti.

2.3 LA MENOPAUSA E IL SUO IMPATTO SUL RISCHIO CARDIOVASCOLARE

Il tasso di mortalità e morbilità per malattie cardiovascolari è più alto nel sesso maschile piuttosto che nel sesso femminile. Nonostante ciò, la differenza nei due sessi si attenua dopo la menopausa suggerendo un ruolo importante degli ormoni sessuali e dell'età. Infatti nelle donne l'incidenza di malattie cardiovascolari aumenta sostanzialmente con l'età, probabilmente perché la menopausa diminuisce la protezione specifica determinata dal genere e espone la donna al impatto negativo dei fattori di rischio cardiovascolari¹⁶. Ciò nonostante è stato a lungo discusso in letteratura. Se questo più alto rischio cardiovascolare dipenda dall'età o sia piuttosto una conseguenza della progressiva

riduzione dei livelli di estrogeni che avviene durante la transizione menopausale, o dipenda infine da entrambi

A questo proposito è importante menzionare i risultati dello studio “Study Of Women’s Health Across The Nation” (SWAN).

SWAN è uno studio longitudinale multi centrico e multi-etnico disegnato per definire i cambiamenti fisiologici e psicologici che avvengono durante la transizione menopausale e per osservare i loro effetti sulla salute e sui fattori di rischio delle patologie età-correlate. Fra il 1996-1997, in sette differenti cliniche, sono state arruolate un totale di 3,302 donne. Al momento dell’arruolamento le donne erano in transizione menopausale, non assumevano ormoni e avevano un’età compresa fra i 42 e i 52 anni. Le partecipanti appartenevano a diverse etnie: Afro-Americana (28%), Caucasica (47%), Cinese (8%), Ispanica (8%), Giapponese (9%). SWAN avendo un approccio multidisciplinare ha ripetuto valutazioni circa la salute ossea, i fattori di rischio cardiovascolari, aspetti psicologici, e ormoni sessuali¹⁷.

In questo contesto, Matthews *et al.*¹⁸ hanno valutato i cambiamenti dei fattori di rischio di patologia coronarica in un periodo critico della vita della donna quale la transizione menopausale. Le donne che hanno avuto una menopausa naturale (1054 del totale) sono state valutate indipendentemente dall’età e da altri fattori confondenti. I risultati hanno mostrato un significativo aumento del colesterolo totale, LDL-C e Apo-B nell’arco di un anno. Importante sottolineare che il tasso di cambiamenti avvenuti in questo periodo non varia in funzione dell’etnia, suggerendo che la menopausa abbia una uniforme influenza sui livelli lipidici. Gli altri fattori di rischio si modificano linearmente rispetto all’età con un aumento progressivo dei livelli di trigliceridi, lipoproteine (a), insulina, fattore VIIc, e valori sistolici di pressione arteriosa. Invece non sono stati registrati cambiamenti circa i valori diastolici e i livelli di fibrinogeno e proteina C reattiva.

In definitiva il periodo di transizione menopausale può essere identificato come un momento critico di cambiamento del profilo lipidico che conduce a un progressivo aumento dei fattori di rischio cardiovascolari durante gli anni post-menopausali. Sebbene la maggior parte di questo incrementato rischio sia dovuto alla modificazione del assetto lipidico, secondario alla deficienza estrogenica, molti altri fattori ormonali e cambiamenti fisiologici possono essere chiamati in causa.

2.4 PREVENZIONE: STILE DI VITA E TERAPIA ORMONALE SOSTITUTIVA

L'aumento del grasso addominale aumenta il rischio di sviluppare malattie cardiovascolari. Risultati provenienti dal "*Women's Healthy Lifestyle Project*" mostrano chiaramente che l'aumento di peso e l'incremento della circonferenza vita, insieme all'aumento dei livelli plasmatici di lipidi e di altri fattori di rischio per patologie coronariche, possono essere preventivamente evitati con interventi sullo stile di vita da attuare durante gli anni di transizione menopausale. Infatti, sebbene questi cambiamenti siano inevitabili, col progredire dell'età e l'inizio della menopausa l'attività fisica potrebbe attenuare l'impatto che questi due elementi hanno sui vari cambiamenti sopracitati. Esiste una significativa correlazione inversa fra l'attività fisica e la circonferenza vita, BMI, insulinemia, livelli di leptina e di proteina C reattiva. L'attività fisica determina un minor rischio di sviluppare patologie croniche come malattie cardiovascolari, diabete mellito tipo 2 e obesità¹⁹. Trenta minuti di attività fisica quotidiana riduce i livelli di colesterolo LDL del 9,3% dopo sei mesi^{20, 21}. Quindi la prevenzione del sovrappeso dovrebbe essere riconosciuto come un importante obiettivo da perseguire nelle donne prima dell'inizio della menopausa promuovendo, in definitiva, una regolare attività fisica²².

Da più di 60 anni è disponibile per le donne in post-menopausa la Terapia Ormonale Sostitutiva (HRT). Dalla sua introduzione nella pratica clinica, l'HRT è stata oggetto di dibattito e discussione. All'inizio degli anni '90 diversi studi esaltavano i suoi effetti benefici grazie alla sua capacità di ridurre del 30-50% il rischio di patologia cardiovascolare e osteoporosi²³. Tutto questo entusiasmo è stato mitigato da diversi studi clinici, di cui il più importante è *The Women's Health Initiative (WHI)*, che ha rilevato un incremento di patologia cardiovascolare e neoplastica fra le utilizzatrici della HRT²⁴. Analisi più recenti hanno, però, suggerito che la mancanza di effetti positivi dell'HRT nel trial WHI fosse dovuto all'utilizzo della stessa in donne anziane temporalmente lontane dalla transizione menopausale. Questi risultati sottolineano quindi, come i benefici dell'HRT possano dipendere non solo dall'età della donna ma anche dal tempo trascorso dall'inizio della menopausa. Non solo, ma anche dal tipo di ormoni utilizzati e dal loro dosaggio.

Un nuovo studio, da poco pubblicato dal *British Medical Journal* sta apportando al presente dibattito nuove evidenze. Schierneck *et al.*²⁵ riportano i risultati di un follow-up di una coorte di donne in post-menopausa, valutate per lo sviluppo di fratture osteoporotiche. Le pazienti, originariamente arruolate nel *Danish Osteoporosis Prevention Study (DOPS)*, hanno assunto o Estradiolo o una combinazione di Estradiolo con un Progestinico sintetico. Lo studio ha arruolato, dal 1990 al 19993, 1006 pazienti di età fra i 45 e i 48 anni da poco in menopausa o con i sintomi della transizione menopausale e le ha seguite per 20 anni. 502 di queste hanno assunto l'HRT mentre 504 non hanno assunto nessun farmaco.

I risultati di questa analisi riportano che le donne che hanno ricevuto la terapia ormonale sostitutiva hanno avuto meno eventi cardiovascolari rispetto all'altro gruppo. La magnitudo di questa riduzione era di circa del 50% e interessava sia il periodo di attivo utilizzo del farmaco sia la fase successiva. Inoltre non sono state notate differenze nell'incidenza di ictus, tromboembolismo e cancro mammario fra i due gruppi. Vi sono due

differenze principali fra questo studio e quelli disponibili fino ad ora: l'età delle donne arruolate e le caratteristiche del farmaco utilizzato. Infatti questo trials si è focalizzato su donne che hanno cominciato l'HRT veramente a ridosso della transizione menopausale, invece nell'WHI circa il 75% delle pazienti aveva più di 60 anni. Inoltre le donne venivano trattate con 17- β estradiolo e Noretisterone acetato invece degli estrogeni coniugati equini e Medrossiprogesterone acetato enfatizzando che l'uso dei progestinici durante l'HRT, in particolare del Medrossiprogesterone acetato, è associato con un maggior rischio cardiovascolare rispetto alla terapia con solo estrogeni. In definitiva nonostante 20 anni di dibattito ancora sussiste la contraddizione fra studi che dimostrano i benefici dell'HRT e le linee guida che non raccomandano l'utilizzo dell'HRT nella prevenzione delle patologie croniche.

3 LA SINDROME METABOLICA

3.1 INTRODUZIONE

Il termine Sindrome metabolica è di introduzione relativamente recente, avendo meno di 20 anni, e viene utilizzato per definire la contemporanea presenza nello stesso individuo di alterazioni del metabolismo energetico, glucidico, lipidico, purinico e dei meccanismi di controllo della pressione arteriosa, con conseguente aumento del rischio di sviluppo di diabete tipo 2 e malattie cardiovascolari.

Nel corso degli ultimi 20 anni sono stati coniati e impiegati diversi nomi per definire la variabile combinazione di obesità, disglucemia, dislipidemia, iperuricemia e ipertensione. Una di queste combinazioni (ipertensione, iperuricemia, iperglicemia) è stata descritta nella Letteratura medica già negli anni '20 del secolo scorso. Poi ci sono state descrizioni negli anni '50, quando per la prima volta fu notato che diverse alterazioni metaboliche aggregavano intorno all'obesità androide, e negli anni '60, quando per la prima volta fu usato in Italia il termine della sindrome Plurimetabolica. Un contributo decisivo venne alla fine degli anni '80 quando fu coniato il termine sindrome x, poi abbandonato, e fu indicata l'insulino-resistenza come fattore patogenetico comune a varie alterazioni metaboliche e dell'ipertensione. Per questo motivo fu suggerito anche il nome sindrome dell'insulino-resistenza prima di arrivare al consenso e alla diffusione del termine sindrome metabolica.

3.2 CRITERI DIAGNOSTICI

Il termine Sindrome metabolica è stato identificato da un gruppo di esperti riuniti dall'Organizzazione Mondiale Della Sanità (OMS o World Health Organization, WHO) nel 1998 ²⁶. Tali esperti ne hanno anche definito i criteri diagnostici (Tabella 1), sottolineando

il ruolo centrale della disglycemia, dell'insulino-resistenza e ponendo le altre alterazioni come contorno.²⁷

In base a tali criteri, per la diagnosi, è indispensabile il riscontro di disglycemia definibile come una delle seguenti 4 condizioni:

- ❖ Alterata glicemia a digiuno (*impaired fasting glucose* o IFG, intesa come glicemia a digiuno compresa fra 100 mg/dl e 125 mg/dl)
- ❖ Ridotta tolleranza glucidica (*impaired glucose tolerance* o IGT, definita quando la glicemia è compresa tra 140 e 199 mg/dl 2 ore dopo un OGTT)
- ❖ Diabete mellito tipo 2
- ❖ Insulino-resistenza, identificata con il metodo standard (clamp euglicemico iperinsulinemico).

In aggiunta alla disglycemia o all'insulino-resistenza, per la diagnosi di sindrome metabolica devono essere presenti almeno due ulteriori alterazioni (dislipidemia, ipertensione arteriosa, obesità centrale o microalbuminuria). I criteri dell'Organizzazione mondiale della Sanità furono i primi a connettere i componenti chiave della sindrome quali insulino-resistenza, obesità, dislipidemia, e ipertensione²⁸.

Nel 1999 i criteri definiti dalla WHO vennero criticati dal gruppo di studio europeo dell'insulino-resistenza (EGIR) il quale suggerì sia di non includere il diabete mellito di tipo 2 nei criteri necessari per definire la sindrome poiché già ben caratterizzata come malattia a se stante, sia di non considerare la microalbuminuria fra i criteri diagnostici, in quanto parametro di laboratorio di difficile standardizzazione, e sia di basare la valutazione dell'insulino-resistenza su un metodo meno complesso e più fruibile nella pratica clinica quale insulinemia a digiuno²⁷. Come la WHO anche l'EGIR definì il ruolo centrale dell'insulino-resistenza nella fisiopatologia della sindrome. Inoltre, analogamente alla WHO, la definizione EGIR richiede due criteri aggiuntivi selezionati fra obesità, ipertensione e dislipidemia. La definizione di obesità fu però semplificata passando dal

rapporto circonferenza vita/fianchi o BMI della WHO alla valutazione della circonferenza vita. (Tabella 1)

Nel 2001 il *National Cholesterol Education Program – Third Adult Treatment Panel* (NCEP-ATPIII) sancì definitivamente l'uso del termine "Sindrome Metabolica" e semplificò i criteri diagnostici, individuando quelli di più facile valutazione nella pratica clinica.²⁹

Con i criteri NCEP-ATPIII, largamente utilizzati in letteratura, la diagnosi viene posta in presenza di almeno tre alterazioni dei parametri glico-lipidici standard:

- ❖ Circonferenza vita,
- ❖ Pressione arteriosa >130/85 mmHg,
- ❖ Livelli di trigliceridi >150 mg/dl,
- ❖ Livelli HDL < 40 mg/dl nell'uomo e <50 mg/dl nella donna,
- ❖ Glicemia > 110 mg/dl (Tabella 1).

Tali parametri sono stati leggermente modificati nel 2006 da un gruppo di esperti della *American Heart Association* (AHA) e del *National Heart, Blood and Lung Institute* (NHBLI) del *National Institute of Health* (NIH) americano, che hanno decretato un abbassamento della soglia dell'iperglicemia da 110 mg/dl a 100mg/dl (Tabella 1).

L'obesità centrale, secondo criteri alternativi proposti dall'*International Diabetes Federation* (IDF), viene posta al centro della sindrome metabolica, constatando che, per la diagnosi della sindrome, debbano comunque essere presenti altre due alterazioni: disglycemia, bassi livelli di HDL, elevati trigliceridi e/o ipertensione³⁰.

La presenza di differenti definizioni da parte delle varie società scientifiche è alla base dell'eterogeneità degli studi epidemiologici³¹.

Tabella 1					
Criteri per la diagnosi di Sindrome Metabolica.					
CRITERIO	WHO (1998) INSULINO-RESISTENZA+ 2 CRITERI	ATP III (2001) 3 CRITERI	EGIR (2002) INSULINO-RESISTENZA+ 2 CRITERI	AACE (2003) INSULINO-RESISTENZA+ 1 CRITERIO	IDF(2006)
Obesità centrale	Rapporto circonferenza vita/fianchi >0,90 nel ♂ e >0,85 nella ♀ o BMI>30kg/m ²	Circonferenza vita ≥102cm nel ♂ e ≥88cm nella ♀	Circonferenza vita ≥94cm nel ♂ e ≥80cm nella ♀	BMI>25Kg/m ²	Circonferenza vita ≥94cm nel ♂ e ≥80cm nella ♀
Dislipidemia	TG≥ 150 mg/dl e/o HDL-C < 35 mg/dl nel ♂ e < 39 mg/dl nella ♀	TG≥ 150 mg/dl e/o HDL-C < 40 mg/dl nel ♂ e < 50 mg/dl nella ♀	TG≥ 150 mg/dl e/o HDL-C < 39 mg/dl	TG≥ 150 mg/dl e/o HDL-C <40 mg/dl nel ♂ e < 50 mg/dl nella ♀	TG≥ 150 mg/dl o in trattamento o HDL-C < 40 mg/dl nel ♂ e < 50 mg/dl nella ♀ o in trattamento
Ipertensione arteriosa	≥140/90 mmHg	≥130/85 mmHg	≥140/90 mmHg	≥130/85 mmHg	≥130/85 mmHg o in trattamento
Glicemia	IGT, IFG, DMT2	>110 mg/dl (include diabete)	IGT o IFG ma no DMT2	IGT o IFG ma no DMT2	>110 mg/dl (include diabete)
Insulino-resistenza	IGT, IFG, DMT2 o insulino sensitività nel quartile più basso della popolazione (clamp insulinico)	Nessun marker	Insulina plasmatica > 75° percentile	IGT o IFG	Nessun marker
Altri	Microalbuminuria (escrezione urinaria di albumina > 20 µg/min o rapporto albuminuria/creatinuria >30mg/g)	-	-	Altre caratteristiche fenotipiche	-

TG= trigliceridi, IGT= ridotta tolleranza glucidica, IFG= alterata glicemia a digiuno

3.3 LA SINDROME METABOLICA NEL SESSO FEMMINILE

Diversi studi epidemiologici hanno stimato che più del 20-30% della popolazione di mezza età è affetta dalla sindrome metabolica³²; variando da un 8 a un 24% nel sesso maschile^{33, 34} e da 7 a 46 % nel sesso femminile^{35, 36}. Alcuni studi trasversali riportano un incremento dell'incidenza della sindrome metabolica, da 32,6% a 41,5%, nel periodo post menopausale^{37, 38}.

In uno studio italiano condotto su soggetti di età compresa fra i 35-75 anni osservati per 15 anni è stata osservata una prevalenza della Sindrome Metabolica nel sesso femminile (31,5%) rispetto al sesso maschile (12,4%)³⁹.

Lo studio longitudinale *Study of Women's Health Across the Nation* (SWAN) ha dimostrato che l'incidenza di Sindrome Metabolica aumenta progressivamente nell'arco temporale che va da 6 anni prima a 6 anni dopo l'inizio della menopausa, indipendentemente dall'età e da altri fattori di rischio cardiovascolari noti. A lungo si è ritenuto che questo incremento fosse determinato dalla condizione di ipoestrogenismo che si instaura durante la transizione menopausale. In realtà, i cambiamenti dei livelli estrogenici sono scarsi predittori dello sviluppo di Sindrome Metabolica. Citando i risultati del *National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES II), in cui è stata valutata la prevalenza e il rischio relativo di morte per patologia cardiovascolare in individui con Sindrome Metabolica, è risultato che il rischio relativo (RR) di morte per causa cardiovascolare è maggiore nei soggetti diabetici, ipertesi e con dislipidemia.

4 ELEMENTI FISIOPATOLOGICI DELLA SINDROME METABOLICA

4.1 INTRODUZIONE

La definizione di Sindrome Metabolica comprende diversi elementi quali l'insulino-resistenza, l'ipertensione arteriosa, la dislipidemia, l'obesità viscerale, che risultano tra loro connessi. Nonostante ciò, al momento, sussistono pareri contrastanti circa la definizione della Sindrome Metabolica: se essa debba essere trattata come malattia, o debba essere considerata come un insieme di elementi patologici o piuttosto vada intesa come vera e propria sindrome

Analizzando la fisiopatologia, possiamo avanzare questa considerazione: i soggetti, che presentano componenti isolati ma, che non rispondono ai criteri che definiscono la sindrome metabolica, hanno un rischio minore di sviluppare diabete mellito tipo 2 e malattie cardiovascolari (CVD)⁴⁰. Per esempio, persone con obesità isolata hanno un rischio di sviluppare diabete mellito tipo 2 notevolmente inferiore rispetto a quelli che presentano la sindrome metabolica. Oppure soggetti con ipertensione isolata o dislipidemia hanno un rischio cardiovascolare inferiore rispetto a soggetti che presentano multipli criteri. Sebbene il diabete sia considerato da NCEP ATP III un equivalente di rischio cardiovascolare, la presenza di fattori di rischio aggiuntivi, che conducono alla diagnosi di sindrome metabolica, aumentano il rischio cardiovascolare di questi pazienti.

Gli aspetti centrali della sindrome metabolica risultano essere, quindi:

- ❖ L'insulino-resistenza,
- ❖ Obesità viscerale,
- ❖ La dislipidemia aterogena,
- ❖ La disfunzione endoteliale.

Fra questi, i primi due risultano indispensabili per la definizione della sindrome. Nonostante l'importanza fisiopatologica del tessuto adiposo⁴¹ (confermata dal netto miglioramento di alcuni parametri in quei pazienti con Sindrome Metabolica che hanno avuto una notevole perdita di peso) è d'obbligo sottolineare come siano necessarie, per l'espressione fenotipica della Sindrome Metabolica sia la predisposizione metabolica all'insulino-resistenza sia l'obesità. A questi due elementi si aggiunge, di conseguenza, la dislipidemia aterogena definita come elevati livelli plasmatici di trigliceridi o bassi livelli ematici di lipoproteina HDL. Inoltre, la disfunzione endoteliale consegue all'insulino-resistenza e alla liberazione di acidi grassi liberi e adipochine da parte del tessuto adiposo viscerale.

La disfunzione endoteliale gioca un ruolo rilevante nello sviluppo dell'ipertensione arteriosa. Sia la dislipidemia aterogena sia la disfunzione endoteliale contribuiscono meccanicamente allo sviluppo dell'aterosclerosi e della patologia cardiovascolare.

La più semplice definizione di Sindrome Metabolica passa, quindi, attraverso questi quattro elementi centrali: insulino-resistenza, adiposità viscerale, dislipidemia aterogena, e disfunzione endoteliale

Al momento non possono essere compresi nella definizione altri elementi aggiuntivi (come l'infiammazione sistemica, ipercoagulabilità o la microalbuminuria), poiché questi non possono essere considerati in maniera indipendente.

4.2 INSULINO-RESISTENZA

L'infiammazione cronica associata all'obesità viscerale induce una condizione di insulino-resistenza. In risposta all'iperglicemia, le cellule beta pancreatiche producono l'insulina che stimola l'utilizzo del glucosio nei vari tessuti bersaglio: muscolo scheletrico, tessuto adiposo e fegato. Gli effetti della stimolazione insulinica sono diversificati nei vari tessuti bersaglio. Infatti, nel tessuto adiposo e nel muscolo scheletrico l'insulina stimola l'uptake di glucosio attraverso il trasportatore di membrana GLUT4. Nel muscolo scheletrico e nel fegato, l'insulina stimola sia la sintesi di glicogeno a partire da glucosio sia inibisce la glicogenolisi, mentre nel fegato diminuisce la gluconeogenesi, prevenendo così un aumento della glicemia. L'effetto netto di tutti questi processi è una riduzione della glicemia e un aumento della conversione del glucosio in molecole di stoccaggio, glicogeno o grassi. Un quadro patologico si determina quando, in presenza di insulino-resistenza, il tessuto adiposo, i muscoli e il fegato non rispondono in modo appropriato alla stimolazione insulinica, determinando una condizione di iperglicemia. Tutto ciò viene esacerbato dalla deregolazione dei meccanismi di feedback.

L'insulino-resistenza è il risultato di una diminuzione nella responsività dei tessuti periferici (tessuto adiposo, fegato, muscolo scheletrico) agli effetti dell'insulina.

L'insulino-resistenza è il principale fattore predittivo di sviluppo di diabete mellito di tipo 2 e l'iperinsulinemia è il principale marker di insulino-resistenza.

Fisiologicamente il segnale dell'insulina dipende dal legame della stessa col suo specifico recettore. Quest'ultimo è formato da quattro catene polipeptidiche, due α e due β . Le catene derivano da un peptide precursore, che viene poi scisso nelle diverse catene che formano tra loro ponti disolfuro (SH). La catena α è extracellulare, mentre la catena β è intracellulare e possiede attività tirosinchinasica. Il legame dell'insulina con il recettore stimola l'attività chinasi della catena β , dando luogo all'autofosforilazione della catena.

Una catena β fosforila l'altra su un residuo di tirosina, determinando una cascata di reazioni intracellulari. Si può determinare la stimolazione dell'associazione intermolecolare di molecole di segnale, come Shc (SH2- *containing sequence*, trascritto del gene Shc) e Grb (*growth factor receptor binding protein*) che sono membri della famiglia delle proteine substrato per l'insulina IRS-1, IRS-2, IRS-3, IRS-4 (*insulin receptor substrate*, IRS). Di conseguenza si avrà sia la stimolazione dei membri della famiglia delle proteine di regolazione del segnale, come GAB-1, Cbl, e CAP, sia l'attivazione della mitogenesi e stimolazione dell'internalizzazione del recettore⁴².

Le IRS fungono da proteine di ancoraggio attivate dall'insulina e presentano molti domini funzionali capaci di attivare altre proteine. La mancanza di IRS-1 nei topi causa ritardo nella crescita e resistenza all'insulina di grado medio, mentre quella di IRS-2 determina insufficienza delle cellule β e resistenza secondaria all'insulina.

Le IRS attivano la fosfatidilinositolo- 3- chinasi (PI3-chinasi), necessaria per l'attivazione del trasportatore del glucosio GLUT4, presente nei tessuti sensibili all'insulina. L'inibizione della PI3-chinasi impedisce l'assorbimento del glucosio, la sintesi di glicogeno, il deposito dei trigliceridi, la sintesi proteica e la modulazione dell'espressione genica.

La PI3-chinasi attraverso la fosfatidilinositolo-3,4,5-trifosfato attiva altre chinasi, tra le quali Akt, la chinasi indotta da glicocorticoidi e la proteinchinasi C.

L'Akt che è anche definita proteinchinasi B e presenta tre isoforme, che sono attivate dalla fosforilazione di residui di serina-treonina. Esse sono capaci di fosforilare e attivare proteine che regolano la sintesi di lipidi, del glicogeno, delle proteine, e l'apoptosi. La mancanza di Akt nei topi causa insulino-resistenza e diabete. Nelle cellule endoteliali, Akt fosforila e attiva endothelial nitric oxide synthase (eNOS).

La traslocazione del trasportatore del glucosio GLUT4, a livello delle membrane delle cellule sensibili, è uno degli effetti dell'insulina. Il meccanismo resta ancora non completamente chiarito. Nei soggetti resistenti all'insulina, comunque, non varia il numero

dei trasportatori anche se l'insulina non è capace di influenzare la traslocazione del recettore.

In definitiva l'insulina, legandosi al proprio recettore, attiva due pathway molecolari intracellulari distinti. Il primo coinvolge le IRS-1 e IRS-2, determinando l'attivazione della PI3-chinasi (IRS/PI3-chinasi pathway) fondamentale per l'espressione degli effetti metabolici e mitogeni dell'insulina; il secondo prevede la fosforilazione di Shc e l'attivazione di Ras, Raf, MEK, e MAP chinasi (mitogen-activated protein) Erk 1 e 2. Al contrario della precedente, questa via è coinvolta unicamente negli effetti mitogeni dell'insulina e non media nessun effetto metabolico della stessa⁴³.

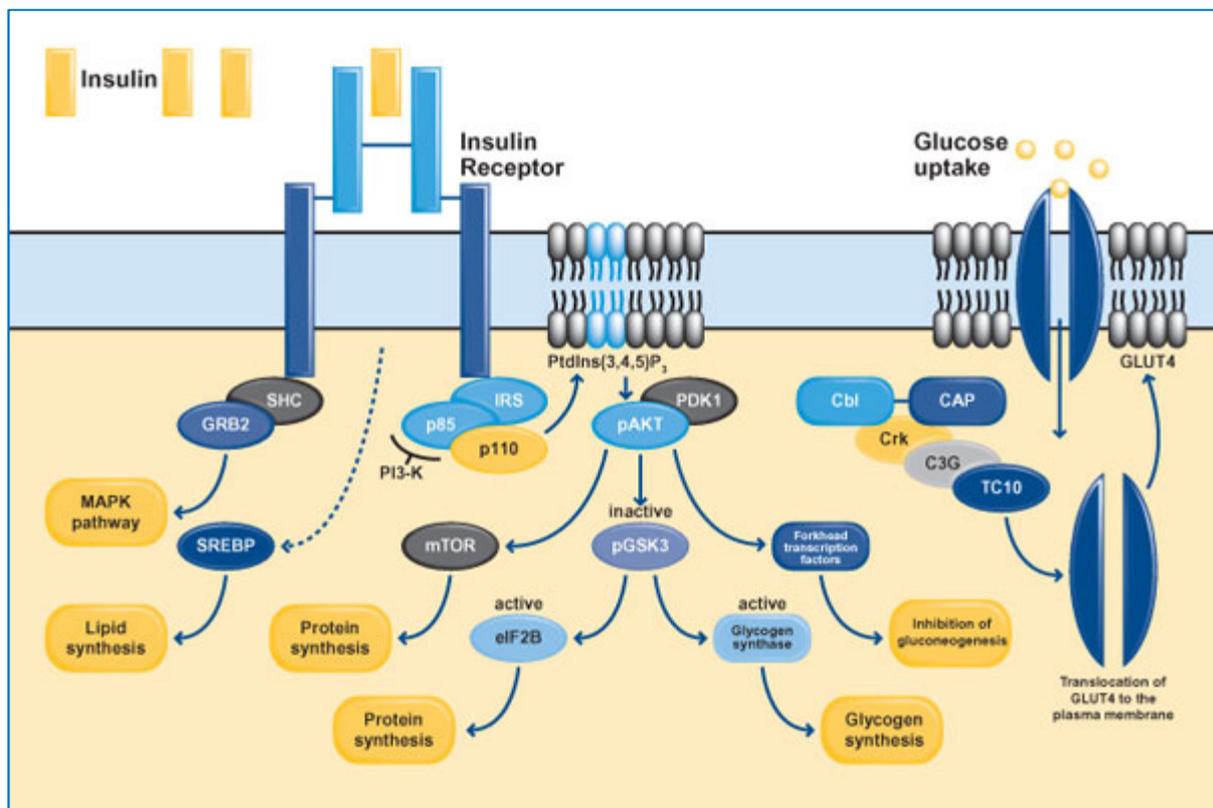


Figura 2: L'attivazione del recettore insulinico determina un'aumento della trascrizione di SREBP e la fosforilazione dei membri della famiglia di IRS, SHC, Cbl. In seguito alla fosforilazione dei residui tirosinici queste proteine interagiscono con molecole trasduttrici del segnale attraverso il loro dominio SH2. Ne deriva l'attivazione di diversi vie del segnale come il signaling di PI3-Kinasi, l'attivazione di MAPK e l'attivazione del complesso Cbl/CAP. questi pathways agiscono in modo coordinato al fine di regolare il metabolismo glucidico, lipidico e proteico.

4.3 OBESITA' VISCERALE

Sebbene molti problemi di salute pubblica (come il diabete mellito, la dislipidemia e l'ipertensione) siano strettamente connessi con un'eccessiva alimentazione (la cui principale conseguenza risulta essere l'obesità), alcune evidenze indicano che la morbilità associata all'obesità non sia tanto connessa all'estensione dell'accumulo di grasso ma piuttosto alla sua distribuzione⁴⁴.

L'obesità viscerale determina una riduzione dell'uptake di glucosio insulino mediato. Il meccanismo alla base di questo processo probabilmente coinvolge le adipochine, secrete dal tessuto adiposo, che modulano le connessioni tra il sistema vascolare e metabolico⁴⁵.

Sebbene molti individui obesi non manifestino la Sindrome Metabolica, esiste una stretta correlazione fra obesità e rischio di sviluppare la Sindrome Metabolica. E' riportato che circa il 50% degli adolescenti obesi sviluppano in età adulta la Sindrome Metabolica⁴⁶.

L'obesità, e in particolare l'obesità viscerale, è considerata un fattore di rischio cardiovascolare indipendente. Una metanalisi comprendente i risultati di 21 studi riguardanti il sovrappeso e le patologie cardiache ha dimostrato che l'obesità, soprattutto quella caratterizzata da una distribuzione adiposa di tipo viscerale, è associata con un'elevata prevalenza e incidenza di patologia cardiovascolare e soprattutto di mortalità ad essa associata. I soggetti moderatamente sovrappeso avevano un incremento del 32% di rischio rispetto ai normopeso mentre i soggetti obesi dell'81%. È stato registrato un incremento del 16% del rischio cardiovascolare per ogni aumento di 5 unità di BMI⁴⁷.

4.4 DISLIPIDEMIA ATEROGENA

Gli aspetti centrali della dislipidemia aterogena sono gli elevati livelli plasmatici di trigliceridi (>150mg/dl), bassi livelli di colesterolo HDL (M<40mg/dl e F<50mg/dl), e aumento delle LDL.

L'insulino-resistenza e l'obesità viscerale sono associate con la dislipidemia aterogena ⁴⁸.

L'insulino-resistenza è responsabile dello sviluppo della dislipidemia aterogena attraverso diversi meccanismi:

1) L'insulina fisiologicamente sopprime negli adipociti la lipolisi. Di conseguenza un signaling insulinico alterato determinerà un aumento della lipolisi con aumento dei livelli di acidi grassi liberi (FFA).

Nel fegato, gli acidi grassi liberi sono necessari per la sintesi di trigliceridi, inoltre, servono per la produzione di apoB, la maggiore lipoproteina delle very-low-density lipoproteine (VLDL).

2) Normalmente l'insulina diminuisce le apoB attraverso una via PI3K-dipendente, quindi l'insulino-resistenza aumenta direttamente la produzione di VLDL.

3) L'insulina regola l'attività della lipoprotein lipasi, il principale fattore che regola la degradazione delle VLDL.

Quindi, ipertrigliceridemia secondaria all'insulino-resistenza è il risultato sia dell'incrementata produzione delle VLDL sia di una riduzione della loro clearance.

Il potenziale aterogeno della particolare dislipidemia che si associa alla Sindrome Metabolica sembra essere correlato sia alle alterazioni quantitative ma anche qualitative delle lipoproteine LDL. L'altra componente aterogena associata alla Sindrome Metabolica è rappresentata da bassi livelli di colesterolo HDL. Molti studi epidemiologici dimostrano una significativa relazione inversa tra i livelli di colesterolo HDL e il rischio cardiovascolare.

4.5 LA DISFUNZIONE ENDOTELIALE

Il tessuto adiposo secerne una serie di fattori che agiscono in modo endocrino e/o paracrino modulando il tono vascolare, l'omeostasi endoteliale e la contrattilità cardiaca. L'anomala secrezione di queste molecole, da parte del tessuto adiposo, è alla base della disfunzione endoteliale che si apprezza in presenza di obesità⁴⁹. La disfunzione endoteliale

non è solo espressione di una maggiore probabilità di sviluppare ipertensione e aterosclerosi ma aggrava anche l'insulino-resistenza e il processo infiammatorio a carico del tessuto adiposo.

In presenza di sindrome metabolica diversi fattori concorrono allo sviluppo di disfunzione endoteliale. Da una parte vediamo il coinvolgimento del tessuto adiposo che, in presenza di obesità accanto a adipociti ipertrofici, presenta elementi infiammatori come macrofagi che determinano la secrezione di fattori vasocostrittori (come superossidi e componenti del sistema renina-angiotensina-aldosterone) e di citochine pro-infiammatorie (come TNF- α , IL-6). Il tutto contribuisce all'attivazione endoteliale, infiammazione vascolare e formazione neointimale. Inoltre, una serie di adipochine influenzano la funzione endoteliale in maniera indiretta, agendo a livello cerebrale determinando l'attivazione del sistema simpatico (azione svolta ad esempio dalla leptina) oppure esercitando la loro azione a livello dei principali organi metabolici alterando la sensibilità insulina delle strutture vascolari.

Infatti l'insulina esercita azioni pro- e anti- aterogeniche a livello vascolare. L'equilibrio fra la vasodilatazione NO- dipendente e la vasocostrizione endotelina-1 dipendente è regolato da una parte dal signaling della fosfatidilinositolo-3 chinasi (PI3K) e dall'altra dalla via intracellulare mediata da mitogen-activate protein kinase (MAPK). In presenza di insulino-resistenza si assiste ad un'alterazione del signaling della PI3K con contemporanea conservazione della funzionalità della via delle MAP-Kinasi. Ne deriva una condizione di vasocostrizione determinata dalla ridotta produzione di Ossido Nitrico (NO) e un aumento della proliferazione cellulare e dell'espressione di molecole di adesione⁵⁰.

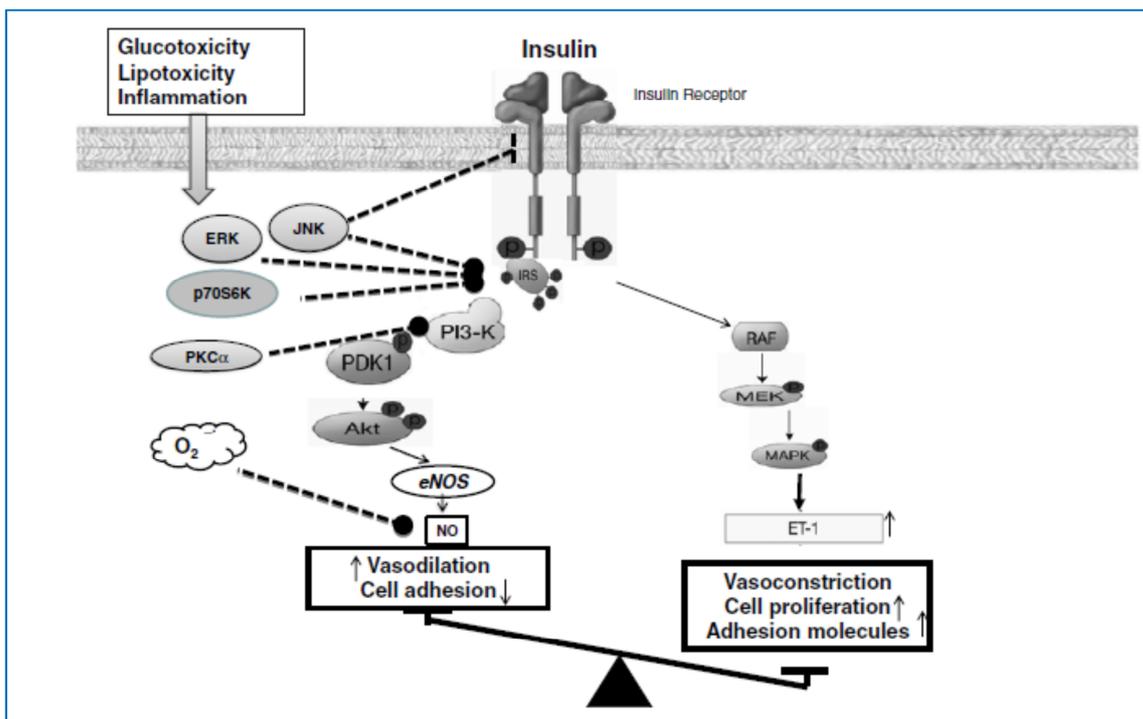


Figura 3: Alterazioni specifiche delle vie di trasduzione del segnale dell'insulina connesse con la disfunzione endoteliale. La via di PI3K insulino-dipendente regola la produzione di NO e, quindi, la vasodilatazione. Invece la via di MAPK controlla la secrezione dell'endotelina-1(ET-1) e l'espressione di molecole di aderenza nell'endotelio vascolare. La glucotossicità, la lipotossicità e varie citochine modulano l'azione di molecole che inibiscono il segnale di PI3K/Akt. eNOS, sintasi endoteliale dell'ossido nitrico; IRS, substrato del recettore dell'insulina; MEK, MAPK chinasi; PKC, Protein chinasi C; ERK, extracellular signal-regulated kinase; JNK, C-jun N-terminal kinase; p70S6K, p70 ribosomal S6 kinase; AP-1, proteina attivatrice-1; NO, ossido nitrico; e ET-1, endotelina-1⁵¹.

5 IL TESSUTO ADIPOSO COME ORGANO ENDOCRINO

5.1 INTRODUZIONE

Alla fine degli anni '80 la visione del tessuto adiposo come organo inerte, deputato a deposito energetico e isolamento termico dell'organismo, è stata sovvertita ed è stato identificato quale sito maggiore di metabolismo degli ormoni steroidei e di produzione di produzione di adiposina, un fattore endocrino marcatamente down-regolato nell'obesità nei roditori.

Verso la metà degli anni novanta, la scoperta dell'espressione e della secrezione di TNF- α , da parte del tessuto adiposo di topi obesi, ha posto le basi per stabilire una connessione tra il processo infiammatorio e l'obesità e l'insulino-resistenza⁵².

Nel 1994 con la scoperta della leptina⁵³, un adipochina che agisce come vero ormone controllando il bilancio energetico, il tessuto adiposo venne riconosciuto come un vero organo endocrino, con funzioni regolatorie importanti nell'omeostasi energetica dell'organismo e in altri processi fisiologici.⁵⁴

Successivi studi hanno evidenziato che il tessuto adiposo è fisiologicamente in grado di secernere una grande varietà di peptidi, globalmente identificati come adipocitochine, con azione locale (autocrina/paracrina) sul tessuto adiposo stesso, ma anche sistemica (endocrina) su diversi organi e tessuti bersagli, quali ipotalamo, pancreas, fegato, muscolo scheletrico, rene, endotelio e sistema immunitario^{45,55}.

Le principali adipocitochine secrete dal tessuto adiposo sono elencate in Tabella 2.

Queste molecole, oltre ad essere coinvolte nella regolazione dell'omeostasi energetica dell'organismo e nella regolazione del metabolismo glucidico e lipidico, sono state implicate anche nel controllo dello stress ossidativo, nel mantenimento dell'integrità della struttura e funzione della parete vascolare, e possiedono importanti effetti pro- e anti-

infiammatori, meccanismo che globalmente sono responsabili delle diverse manifestazioni cliniche della sindrome metabolica^{56,57}.

Anatomicamente il tessuto adiposo è composto da masse cellulari diffuse con localizzazione sottocutanea e viscerale, delimitate da una capsula connettivale e fornite di vascolarizzazione e innervazione proprie, tale da configurare un vero e proprio organo. L'organo adiposo è costituito prevalentemente da tessuto adiposo bianco, la cui componente cellulare, l'adipocita bianco, espleta le principali funzioni⁵⁸. Oltre agli adipociti il tessuto adiposo contiene una matrice connettivale, tessuto nervoso, cellule dello stroma, cellule vascolari e del sistema immunitario; l'insieme di questi componenti costituisce un organo integrato. Sono state evidenziate differenze regionali nella produzione di adipocitochine da parte del tessuto adiposo viscerale e sottocutaneo ed è verosimile che queste differenze possano rivestire un ruolo eziopatogenetico di rilievo in diverse condizioni cliniche⁵⁹. Tuttavia, non è noto se queste differenze siano determinate da caratteristiche intrinseche delle cellule adipose dei due compartimenti o se piuttosto sia la dimensione degli adipociti a influenzare le capacità secretorie indipendentemente dalla sede. E' stato ipotizzato inoltre che la maggior parte delle adipocitochine finora identificate siano prodotte non solo dagli adipociti, ma anche da cellule appartenenti alla matrice o alla componente vasculo-stromale tissutale⁶⁰. Quindi alcune differenze regionali nella secrezione delle adipocitochine potrebbero dipendere da differenze secretorie, esistenti fra tessuto sottocutaneo e viscerale, della componente cellulare non adipocitaria⁶⁰.

Il numero di macrofagi presenti nel tessuto adiposo aumenta infatti all'aumentare del grado di obesità. E' stato dimostrato che la percentuale di macrofagi in un deposito di tessuto adiposo è positivamente correlato con l'indice di massa corporea (BMI) e alle dimensioni dell'adipocita^{61,62}. Alla presenza dei macrofagi è riconducibile la quasi totale espressione di "Tumor Necrosis Factor- α " (TNF- α) presente nel tessuto adiposo, nonché

una significativa quota dell'espressione di Ossido Nitrico Sintasi Inducibile (iNOS) e Interleuchina 6 (IL-6)⁶².

In linea di massima, la secrezione della maggior parte delle adipochine è disregolata in presenza di obesità, diabete mellito tipo2, o Sindrome Metabolica.

Tabella 2
Principali adipocitochine secrete dal tessuto adiposo⁶³
Leptina
Adiponectina
“Tumor necrosis factor” (TNF- α)
Interleuchina 6 (IL-6)
Interleuchina 8 (IL-8)
Interleuchina 10 (IL-10)
Interleuchina 18 (IL-18)
“Tissue Growth Factor- β ” (TGF- β)
Lipoproteinlipasi (LPL)
Angiotensinogeno
Inibitore-1 dell'attivatore del plasminogeno (PAI-1) e fattori del complemento
Fattori chemioattraenti o chemioinibenti la migrazione macrofagica(MCP-1, MIF)
Resistina
Visfatina
“Insulin-like growth fatctor-1”(IGF-1)
Glucocorticoidi
Ormoni steroidei

5.2 CITOCHINE PROINFIAMMATORIE

I precisi eventi fisiopatologici alla base della componente infiammatoria presente nell'obesità rimangono ancora ignoti. E' stato ipotizzato che l'espansione del tessuto adiposo che si verifica con l'obesità conduca a ipertrofia e iperplasia degli adipociti e che le richieste metaboliche di questi, una volta ingranditisi, superino l'apporto locale di ossigeno portando ad ipossia cellulare con attivazione di meccanismi cellulari di stress⁶⁴. Tutto ciò condurrebbe ad infiammazione cellulare e al rilascio di citochine e di segnali proinfiammatori. In modo del tutto analogo ad un processo infiammatorio cronico, le chemochine secrete localmente richiamerebbero macrofagi nel tessuto adiposo dove essi formerebbero dei complessi intorno ai grossi adipociti morti o morenti⁶⁵. Questi macrofagi tissutali rilascerebbero quindi citochine in grado di estendere e amplificare il processo infiammatorio anche agli adipociti vicini, esacerbando la flogosi del tessuto stesso⁶⁶.

5.2.1 TUMOR NECROSIS FACTOR- α (TNF- α)

Numerosi sono gli studi condotti sul ruolo di TNF- α nella risposta infiammatoria correlata all'obesità⁶⁷. Da essi si evince non solo che il TNF- α è prodotto principalmente dai macrofagi del tessuto adiposo, ma che i livelli sia dell'mRNA di TNF- α ⁶², sia del suo prodotto genico, sono notevolmente aumentati negli individui obesi⁶⁸. Inoltre la concentrazione plasmatica di TNF- α aumenta con l'aumentare dell'obesità ed è correlata con l'insulino-resistenza⁶⁹. Sebbene studi condotti *in vitro* hanno dimostrato che il grasso viscerale produce più TNF- α dei depositi sottocutanei⁷⁰, ancora deve essere dimostrata una chiara correlazione fra produzione di TNF- α dai depositi viscerali e livelli circolanti dello stesso. Studi condotti *in vivo* hanno complicato l'interpretazione dei livelli circolanti di TNF- α . Ad esempio due studi condotti su topi, utilizzando, da un lato recettori chimerici di TNF- α ⁵², dall'altro l'iperpressione di frammenti solubili del recettore del TNF- α ⁷¹, hanno dimostrato un aumento dell'insulino-resistenza nei ratti obesi. Altri studi con anticorpi

monoclonali anti-TNF- α non hanno confermato effetti dello stesso sull'azione insulinica in ratti obesi o in individui obesi con diabete mellito di tipo 2⁷². In definitiva, al di là della concentrazione plasmatica della citochina, è chiaro che il TNF- α ha un ruolo predominante come fattore paracrino della risposta infiammatoria correlata all'obesità.

La maggior parte degli effetti del TNF- α sul tessuto adiposo sono mediati dalla sua interazione con il recettore del TNF- α sottotipo 1 (TNFR1) a cui fa seguito l'attivazione di diverse vie di trasduzione del segnale intracellulari. Il TNF- α determina una resistenza all'azione dell'insulina attraverso la fosforilazione di un residuo serinico (inattivazione) sia del recettore insulinico (IR) sia del substrato del recettore stesso (IRS-1). In entrambi i casi ne consegue, una diminuzione dell'attivazione della fosfatidilinositolo-3-chinasi, il secondo messaggero che regola la maggior parte degli effetti metabolici dell'insulina. (Fig.3). La via di trasduzione intracellulare, attivata dal recettore del TNF- α , rimane ancora da definire, anche se sembra coinvolgere NF- κ B e/o il signaling JNK^{73, 74}. Anche nel muscolo scheletrico è stata dimostrata una riduzione dell'attivazione di IR e IRS-1⁷⁵. Sorprendentemente questo meccanismo di insulino-resistenza non è stato ritrovato negli epatociti sebbene il fegato dovrebbe essere il primo target del rilascio del TNF- α dal tessuto adiposo⁷⁶. Uno studio *in vivo* condotto su roditori ha dimostrato una riduzione della responsività epatocitaria all'insulina quando il TNF- α veniva neutralizzato, suggerendo quindi che questa citochina abbia un ruolo critico nel signaling insulinico a livello epatico⁷¹.

Plomgaard *et al.* hanno studiato il ruolo di TNF- α nello sviluppo di insulino-resistenza in soggetti in buona salute⁷⁷. Dal suo lavoro emerge che un'infusione acuta di TNF- α inibisce l'uptake di glucosio insulino-mediato. L'infusione di TNF- α aumenta l'espressione di p70 S6 chinasi, una chinasi regolatrice del segnale, e aumenta c-Jun N-terminal chinasi, determinando la fosforilazione di un residuo serinico e riduzione di fosforilazione di una tirosina di IRS-1. Tutto ciò comporta una riduzione della fosforilazione del substrato 160

di Akt, evento chiave nella cascata di trasduzione del segnale dell'insulina che prevede alla fine la traslocazione di GLUT4 e l'uptake di glucosio.

Un secondo meccanismo attraverso il quale il TNF- α potrebbe contribuire all'insulino-resistenza è attraverso l'aumento dei livelli circolanti di acidi grassi liberi (FFA) determinato dall'induzione della lipolisi e la stimolazione della lipogenesi epatica. Un terzo possibile meccanismo coinvolge la secrezione dell'adiponectina che potrebbe essere ridotta dal signaling del TNF- α ⁷⁸. L'adiponectina sembra essere un mediatore cruciale dell'insulino sensibilità, spiegando come i potenziali effetti paracrini del TNF- α all'interno del tessuto adiposo possano determinare una sistemica insulino-resistenza.

In definitiva, previsioni riguardo il significato di TNF- α nella sindrome metabolica sono state temperate dal fatto che topi obesi con delezione genica o del TNF- α o del suo recettore, hanno dimostrato una modesta protezione rispetto all'aumento di peso, all'iperglicemia, e all'insulino-resistenza^{79,80}.

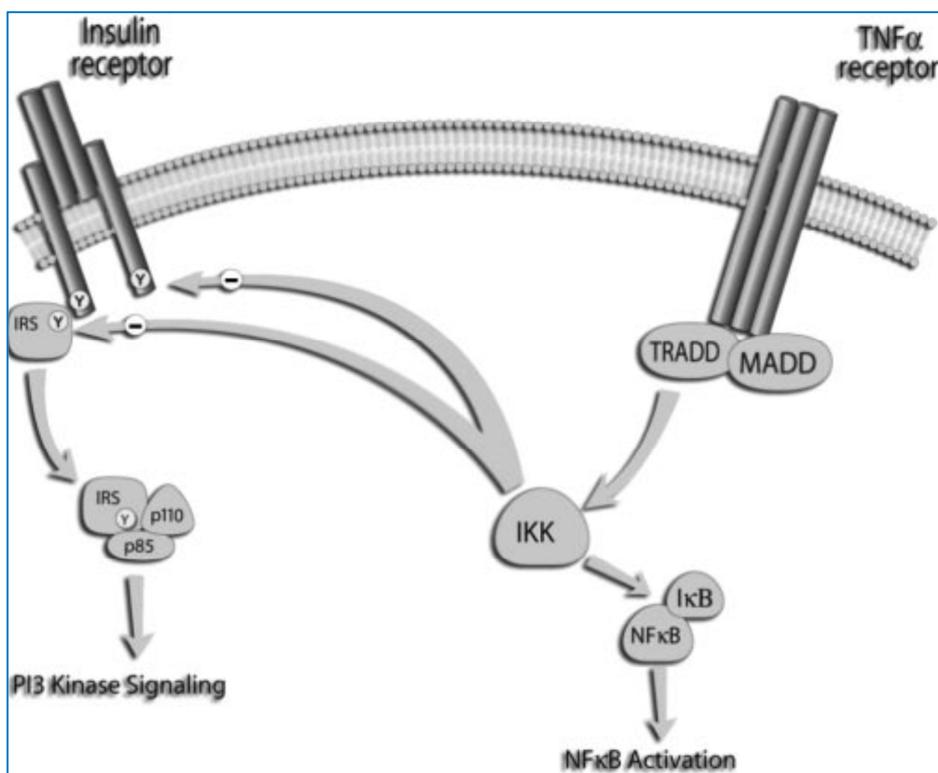


Figura 4: Schema rappresentativo le potenziali interazioni fra i secondi messaggeri attivati dal segnale insulinico e dalla via di TNF- α ⁸¹.

5.2.2 INTERLEUCHINA-6 (IL-6)

IL-6 è un'altra citochina che come il TNF- α risulta iperespressa nel tessuto adiposo in condizioni di obesità e insulino-resistenza e viceversa si riduce con la perdita di peso^{82, 83}.

Nel contesto del tessuto adiposo, IL-6 è espressa sia dagli adipociti sia dalla matrice vascolo-stromale ed è prodotta prevalentemente nel tessuto adiposo viscerale piuttosto che nel sottocutaneo⁶⁰. In circolo, un terzo della concentrazione di IL-6 è determinata dalla produzione del tessuto adiposo⁸⁴.

IL-6 è una molecola con azione principalmente endocrina. Infatti viene secreta dal grasso viscerale nel sistema portale ed è in grado, a livello epatico, di alterare il segnale insulinico, stimolare la secrezione epatica di trigliceridi e la gluconeogenesi con relativa iperinsulinemia compensatoria^{85, 86}.

Tuttavia il ruolo dell'IL-6 nelle alterazioni metaboliche legate all'obesità non è ancora del tutto chiaro. L'espressione di IL-6 e le sue concentrazioni circolanti sono positivamente correlate con la massa adiposa, con la tolleranza glucidica e con l'insulino-resistenza misurata con "clamp"⁸². Le concentrazioni plasmatiche di IL-6 inoltre predicono lo sviluppo diabete mellito tipo 2 e anche di patologia cardiovascolare⁸⁵.

IL-6 circolante è il principale determinante della risposta infiammatoria di fase acuta responsabile di una reazione fisiologica che si attiva in seguito a un danno tissutale o processo infettivo, essendo disegnata per attivare i meccanismi difensivi, eliminare le cellule danneggiate, contenere il processo patologico e iniziare il processo di riparazione⁸⁷.

Uno degli elementi chiave di questa risposta di fase acuta è la proteina C reattiva (PCR), membro di una famiglia di pentraxine che attacca la membrana plasmatica di cellule danneggiate causando la morte cellulare attraverso l'attivazione della cascata del complemento⁸⁷. Diversi risultati epidemiologici collegano la PCR a eventi cardiovascolari, aterosclerosi, e progressione del diabete mellito di tipo 2^{88, 89}. Chiaramente la PCR è uno dei più importanti marker di rischio metabolici, oltre al fatto che potrebbe essere

direttamente coinvolta nelle alterazione delle cellule vascolari, comportando lesioni aterosclerotiche e eventi cardiovascolari⁹⁰. In considerazione del fatto che la produzione epatica di PCR è principalmente regolata dai livelli circolanti di IL-6 e che, nei paesi industrializzati, il principale determinante dei livelli plasmatici di IL-6 è l'entità del grasso corporeo, possiamo concludere che questa citochina, prodotta dal tessuto adiposo, contribuisca in maniera significativa al mantenimento di un processo infiammatorio sistemico cronico associato alla sindrome metabolica.

Nonostante l'aumento della PCR sia il più noto marker dell'azione dell'IL-6, molti altri fattori dipendenti dall'IL-6 possono contribuire al rischio cardiovascolare. Ad esempio incrementi del fibrinogeno, un altro mediatore di fase acuta, sono determinati dall'IL-6 così come l'aumento del numero e dell'attività piastrinica con conseguente aumento del rischio di formazione di un trombo⁹¹

Anche le cellule endoteliali e le cellule della muscolatura liscia vascolare sono target dell'azione dell'IL-6 con conseguente aumento dell'adesione cellulare e attivazione locale del sistema renina-angiotensina: queste modificazioni favoriscono il processo infiammatorio a carico della parete e il relativo danno⁹².

Diversi studi hanno dimostrato che nel sistema nervoso centrale, IL-6 è un importante agente catabolico che determina una riduzione dell'intake calorico e aumento della spesa energetica⁹³. L'espressione e il rilascio di IL-6 da parte dei neuroni e delle cellule gliali sembra essere essenziale per gli effetti della citochina sul bilancio energetico, ma rimane ancora poco chiaro se e come produzione centrale di IL-6 sia influenzata dai suoi livelli circolanti. A questo proposito sembrano esistere meccanismi di trasporto per IL-6 a livello della barriera ematoencefalica. Inoltre topi geneticamente modificati con delezione del gene dell'IL-6 sviluppano obesità. Questo suggerisce che la citochina sia coinvolta nei processi fisiologici che regolano l'equilibrio energetico e una riduzione dei livelli di IL-6 si

associa ad aumento di peso⁹⁴. Quindi, se la secrezione di IL-6 da parte del tessuto adiposo contribuisce all'omeostasi energetica, attraverso un'azione endocrina a livello del SNC, possiamo concludere che l'obesità determina uno stato di IL-6-resistenza come descritto anche per la leptina e l'insulina. Quanto detto suggerisce la possibilità che l'aumento della secrezione adiposa di IL-6 associata all'obesità sia un meccanismo difensivo che ha come l'obiettivo quello di correggere l'aumento di peso e controllare il bilancio energetico, come ipotizzato per gli incrementi obesità-correlati della leptina. L'infiammazione sistemica determinata dagli effetti dell'IL-6 sul fegato e sull'endotelio vascolare potrebbe essere quindi una conseguenza di un appropriato aumento dei livelli della citochina in condizioni di obesità e IL-6 resistenza⁸¹.

5.3 MEDIATORI COINVOLTI NELLA FUNZIONE ENDOTELIALE

5.3.1 L'ATTIVATORE UROCHINASI DEL PLASMINOGENO (uPA)

Il sistema fibrinolitico, oggi meglio definito come sistema del plasminogeno, è costituito da un proenzima inattivo, il plasminogeno, che convertito ad enzima attivo, la plasmina, degrada la fibrina e trasforma le pro-metalloproteasi di matrice (pro-MMP) in MMPs attive, che a loro volta degradano i componenti della matrice extracellulare (Figura)^{95,96}. Sono stati definiti due attivatori fisiologici del plasminogeno, un attivatore tissutale (tPA) e un attivatore tipo urochinasico (uPA), il quale si lega ad un recettore cellulare (uPAR) per completar il processo di attivazione.

L'inibizione del sistema plasminogeno/MMPs avviene:

- ❖ A livello degli attivatori fisiologici da parte di inibitori specifici del plasminogeno (PAIs)
- ❖ A livello della plasmina principalmente ad opera dell' α_2 -antiplasmina
- ❖ A livello delle MMPs ad opera degli inibitori tissutali della MMPs (TIMPs)

Il sistema del plasminogeno svolge un duplice ruolo l'uno mediato dal tPA principalmente coinvolto nell'omeostasi della fibrina e l'altro mediato dall'uPA principalmente coinvolto nella migrazione delle cellule e nel rimodellamento tissutale.

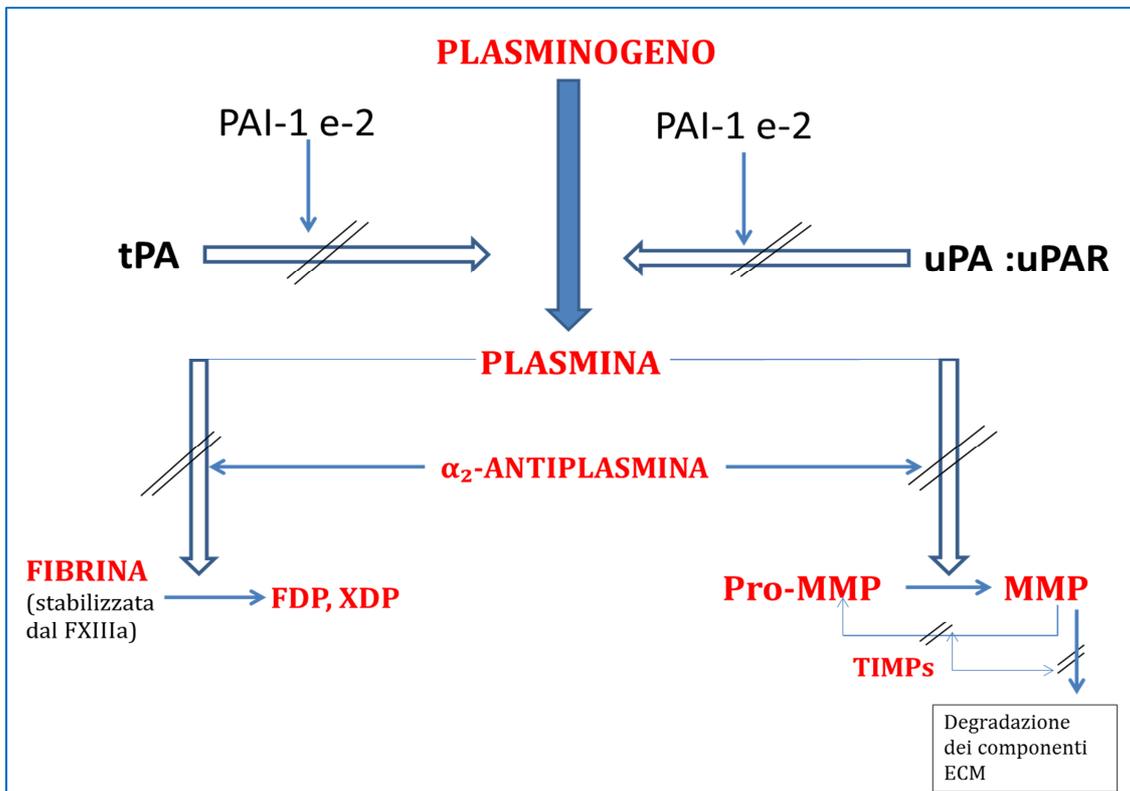


Figura 5: Rappresentazione schematica del sistema (fibrinolitico) del plasminogeno. T-PA: Attivatore tissutale del plasminogeno; u-PA: attivatore urochinasico del plasminogeno; u-PAR: recettore per l'attivatore urochinasico del plasminogeno; PAI: inibitore dell'attivatore del plasminogeno; TIMP: inibitore tissutale delle metalloproteasi; FDP/XDP: prodotti di degradazione della fibrina/stabilizzata

L'u-PA è una serina proteasi originariamente isolata dall'urina umana, ma presente in diverse localizzazioni fisiologiche come il torrente sanguigno o la matrice extracellulare. È una proteina con 411 residui che consiste in tre domini: Il dominio ad attività serina proteasica, il dominio kringle, il dominio fattore di crescita.

Viene sintetizzata in forma di zimogeno (pro-urochinasasi, o urochinasasi a catena singola) ed è attivata da scissione proteolitica fra i residui L158 e I159. Le due catene risultanti sono tenute insieme da un legame disolfuro.

Oltre alla sua capacità di attivare, con un singolo taglio proteolitico, il plasminogeno, presente nel plasma, negli ultimi anni, varie evidenze hanno indicato che l'uPA è in grado di indurre una cascata di reazioni intracellulari indipendentemente dalla sua attività catalitica, controllando motilità, proliferazione ed adesione cellulare. Tali effetti sono mediati da uno specifico recettore di membrana definito uPAR.

L'uPA è, dunque, una molecola bifunzionale: da una parte ha il dominio catalitico, dall'altra il dominio di legame al suo specifico recettore e la capacità di stimolare crescita, motilità, adesione cellulare e trascrizione di specifici geni; ciò suggerisce, inoltre, alcune implicazioni per la biologia dei tumori: è ipotizzabile che l'incrementata produzione di urochinasi e del suo recettore da parte di cellule tumorali, ne possa accrescere la capacità invasiva, sia fornendo alla cellula un'attività proteolitica di superficie, sia stimolandone la motilità⁹⁷.

5.3.2 PLASMINOGEN ACTIVATOR INHIBITOR-1 (PAI-1)

Le alterazioni del processo fibrinolitico sono responsabili dell'aumento del rischio di patologia coronarica nei soggetti con la sindrome metabolica⁹⁸.

Il tessuto adiposo diminuisce direttamente l'efficienza del sistema fibrinolitico attraverso la secrezione di PAI-1 e possibili inibitori della fibrinolisi⁹⁹.

Il PAI-1 (plasminogen activator inhibitor 1) è il principale inibitore dell'attivazione del plasminogeno in vivo¹⁰⁰⁻¹⁰². E' un membro della superfamiglia delle serpine, la quale è coinvolta in molti processi biologici tra i quali la coagulazione sanguigna, l'attivazione del complemento, la fibrinolisi, la morte cellulare programmata, lo sviluppo e i processi infiammatori¹⁰³⁻¹⁰⁵.

Lega e rapidamente inibisce l'attivatore urochinasi del plasminogeno (u-PA) e l'attivatore tissutale del plasminogeno (t-PA) i quali modulano la fibrinolisi endogena. La principale fonte di PAI-1 sono gli epatociti e le cellule endoteliali, e in misura minore anche le

piastrine, le cellule muscolari lisce e gli adipociti¹⁰⁶. In presenza di obesità si assiste ad un aumento dell'espressione genica e della secrezione di PAI-1 da parte degli adipociti a cui segue un aumento dei suoi livelli plasmatici. E' dimostrata una forte correlazione con i parametri specifici della sindrome metabolica, in particolare con l'aumento dei livelli ematici di trigliceridi e insulina, BMI, accumulo di grasso viscerale. I depositi adiposi viscerali producono più PAI-1 rispetto a quello sottocutaneo. In una popolazione di donne sane in premenopausa con un ampio range di BMI è stata registrata una correlazione positiva fra l'attività di PAI-1 e l'estensione del grasso adiposo viscerale misurato con la TC, indipendentemente dai livelli insulinici e dei trigliceridi¹⁰⁷. La perdita di peso conferma questa correlazione. La diminuzione di PAI-1 è correlata solo con la diminuzione dell'estensione del grasso viscerale e non con la diminuzione del grasso totale, dell'insulina o dei trigliceridi¹⁰⁷.

Uno studio randomizzato condotto su 1276 adulti appartenenti a diverse etnie con una prevalenza di sindrome metabolica del 25,8% ha rivelato che gli individui con la Sindrome hanno una maggiore incidenza, rispetto ai controlli, di aterosclerosi, malattie cardiovascolari e di elevati livelli di PAI-1 (24,2 versus 14,6 U/ml; P=0.001). Queste differenze nella prevalenza di malattia cardiovascolare si riducono notevolmente dopo la correzione dei livelli di PAI-1 suggerendo che la disfunzione del processo fibrinolitico sia alla base delle complicanze connesse con la Sindrome metabolica⁹⁸.

Studi in vitro hanno dimostrato che l'insulina stimola la produzione di PAI-1 in colture di cellule endoteliali o epatiche¹⁰⁸⁻¹¹⁰.

5.3.3 LIGANDO SOLUBILE DEL CD40 (sCD40L)

Piuttosto recentemente elevati livelli di CD40L sono stati associati con il diabete e la Sindrome metabolica sollevando l'intrigante questione su come il CD40L possa essere responsabile dell'aumentata incidenza di patologie cardiovascolari in questi pazienti¹¹¹.

Il ligando del CD40 (CD40L), anche conosciuto come CD154, è collocato sull'endotelio, sulle piastrine e anche sulle cellule del sistema immunitario¹¹². Un clivaggio del CD40L genera un frammento solubile denominato sCD40L il quale possiede proprietà biologiche simile al CD40L. Dopo l'attivazione il CD40L dà inizio ad una serie di attività pro-infiammatorie come l'espressione di molecole di adesione, rilascio di citochine, attivazione endoteliale¹¹³. L'interruzione del processo aterosclerotico dopo l'inibizione del segnale del CD40L sottolinea il ruolo di questa molecola nella patogenesi dell'aterosclerosi¹¹⁴⁻¹¹⁶.

Basili *e al.* hanno riportato elevati livelli plasmatici di CD40L in donne obese confrontate con un gruppo di controllo suggerendo che la massa grassa induca l'espressione di CD40L e contribuisca all'aumento di sCD40L nel sangue¹¹⁷. Analogamente, Schernthaner *e al.* hanno rilevato elevati livelli di sCD40L in pazienti obesi, valori che si sono notevolmente ridotti dopo la chirurgia bariatrica¹¹⁸. Secondo Missiou *e al.*¹¹⁹ gli adipociti e i preadipociti esprimono unicamente il CD40 e non il CD40L, ma questo non si pone in contrasto con gli studi precedenti: il tessuto adiposo potrebbe non avere una produzione propria di CD40L ma lo stato infiammatorio che si associa all'obesità potrebbe attirare nei depositi adiposi cellule che esprimono la molecola^{62, 120}.

Diverse evidenze, quindi, suggeriscono il ruolo del CD40L nel determinare il rischio cardiovascolare nei pazienti con Sindrome metabolica. La selettiva inibizione di CD40L potrebbe rivelarsi un promettente target terapeutico nelle patologie metaboliche e potrebbe essere, in futuro, testato *in vivo*¹¹⁹.

5.4 ANGIOGENESI

5.4.1 INTERLEUCHINA-8 (IL-8)

IL-8 è un membro della famiglia delle chemochine che svolge un ruolo fondamentale nell'angiogenesi e nella crescita tumorale. L'angiogenesi è un processo multistep che prevede la proliferazione di cellule endoteliali, la loro migrazione, grazie alla degradazione

della matrice extracellulare da parte di metalloproteasi di matrice (MMPs)¹²¹, e la formazione di nuovi capillari mediata da fattori pro-angiogenetici come IL-8, il fattore di crescita dell'endotelio vascolare e il fattore di crescita dei fibroblasti¹²². È stata dimostrata una produzione di IL-8 da parte di adipociti umani e da colture di tessuto adiposo^{123, 124}. Oltre all'associazione dell'IL-8 con i processi infiammatori essa sembra essere implicata nella patogenesi dell'aterosclerosi^{89,125} e della patologia coronarica¹²⁶. I livelli plasmatici di IL-8 sono notevolmente incrementati nei pazienti affetti sia da diabete mellito di tipo 1 che di tipo 2. Inoltre Bruun *et al.* hanno dimostrato che i livelli circolanti di IL-8 correlano con l'adiposità (BMI) del soggetto e l'insulino sensibilità; questo suggerisce un'implicazione della citochina in alcune complicanze correlate all'obesità¹²⁷.

5.4.2 ANGIOPOIETINA-2

Le angiopoietine sono una famiglia di molecole coinvolte nella stabilizzazione vascolare e nella patologica neovascolarizzazione^{128, 129}. Fra i vari membri della famiglia l'angiopoietina-1 (Ang-1) e l'angiopoietina-2 (Ang-2) sono state ben caratterizzate. L'angiopoietina-1 favorisce la sopravvivenza delle cellule endoteliale contribuendo alla stabilità vascolare e offrendo una sorta di protezione contro lo sviluppo di aterosclerosi. Al contrario, l'angiopoietina-2 ha un'azione antagonista nei confronti dell'angiopoietina-1. Infatti, lega e blocca il recettore dell'angiopoietina-1 interrompendo la sua via di trasduzione del segnale, esercita, quindi, un'azione principalmente pro-infiammatoria¹³⁰. Nei soggetti con diabete mellito di tipo 2 sono presenti elevati livelli di angiopoietina-2 indipendentemente dalla presenza o meno di patologia cardiovascolare¹³¹.

5.4.3 LIGANDO SOLUBILE DI FAS (sFASL)

Fas (CD95) appartiene alla super famiglia dei recettori del fattore di necrosi tumorale (TNF) e gioca un ruolo chiave nell'induzione dell'apoptosi^{132, 133}. Fas è attivato da *Fas-Ligand* (FasL), facente parte della famiglia dei TNF ligandi¹³⁴. Come gli altri membri di

questa famiglia, FasL è una proteina di membrana di tipo II da cui deriva, in seguito a una proteolisi, la molecola solubile: sFasL^{135, 136}

Recenti studi, hanno indentificato, in diverse linee cellulari, un nuovo ruolo di Fas in particolare nella proliferazione cellulare e infiammazione. L'attivazione di Fas induce, infatti, un aumento nella secrezione di citochine come IL-1 α , IL-1 β , IL-8(KC) e di MCP-1^{137, 138}. Sebbene sia stata dimostrata l'espressione di Fas nei preadipociti e negli adipociti ancora sappiamo poco sulle conseguenze dell'attivazione di Fas a livello adiposo, in particolare riguardo al suo ruolo nelle alterazioni connesse con l'obesità potendo rivestire un'attività nei processi infiammatori a essa correlati. Alcuni lavori rivelano che l'attivazione di Fas potrebbe determinare l'insulino-resistenza indotta dall'obesità. Infatti in uno studio condotto su topi obesi l'assenza di Fas negli adipociti determinava una parziale protezione dallo sviluppo di insulino-resistenza¹³⁹.

5.5 ADIPOCHINE E METABOLISMO

5.5.1 LEPTINA

La leptina è una proteina di 167 amminoacidi sintetizzata principalmente dal tessuto adiposo bianco ed è secreta in circolo in maniera direttamente proporzionale alla quantità assoluta di massa grassa dell'organismo^{140, 141}. La delezione del gene della leptina o una mutazione genica del suo recettore si associano, nell'animale da esperimento, a iperfagia e obesità di grado elevato; nell'uomo, tuttavia, queste mutazioni sono estremamente rare^{140, 141}. Questa adipochina svolge un ruolo centrale nell'omeostasi energetica dell'organismo e nella regolazione del senso di fame-sazietà attraverso un'azione a livello del sistema nervoso centrale, dove, attraverso un sistema a feedback, segnala l'entità dei depositi periferici di grasso e regola di conseguenza l'introito di cibo e il dispendio energetico basale⁶³. Tuttavia, la leptina possiede anche numerose altre azioni a livello periferico come a livello pancreatico, epatico¹⁴⁰. Inoltre, la leptina è coinvolta nella

regolazione del metabolismo glucidico, influenzando direttamente la secrezione di insulina, così come la sensibilità insulinica periferica a livello del tessuto adiposo stesso e del muscolo scheletrico. Un altro sistema "target" dell'azione della leptina è il sistema immunitario; la leptina infatti è in grado di interferire con la produzione di citochine, l'attivazione dei monociti-macrofagi, così come con la proliferazione di diversi progenitori delle cellule del sistema immunitario ed emopoietico¹⁴².

Le concentrazioni circolanti di leptina risultano direttamente proporzionali all'entità della massa adiposa, con valori elevati nei soggetti obesi. Tuttavia, negli obesi elevate concentrazioni circolanti di leptina non si associano a perdita di peso, nonostante l'azione anoressizzante di questa adipochina. Per questo nell'obesità è stata ipotizzata una condizione di leptino-resistenza^{140, 141, 143, 144}. I meccanismi alla base di questo fenomeno potrebbero essere riconducibili ad una saturazione del trasporto della leptina attraverso la barriera ematoencefalica o ad anomalie nell'attivazione del recettore della leptina o nella trasduzione del segnale^{143, 144}. Una condizione di iperleptinemia è associata nella popolazione generale con l'aterosclerosi, l'ipertensione e la sindrome metabolica. La leptina gioca un ruolo chiave negli step iniziali dell'aterosclerosi favorendo il reclutamento e la migrazione dei macrofagi nella parete endoteliale attraverso la produzione mitocondriale di superossidi e l'espressione di MCP-1 nelle cellule endoteliali¹⁴⁵. Inoltre, elevati livelli plasmatici di leptina si associano ad un aumentato rischio di infarto del miocardio e ictus indipendentemente dalla presenza di obesità e di altri fattori di rischio cardiovascolari¹⁴⁶. Questo può essere in parte spiegato dal fatto che l'aumento di leptina si associa allo sviluppo di una condizione di insulino-resistenza, alterazione dell'emostasi e infiammazione vascolare¹⁴⁷.

E' stato dimostrato che la leptina influenza l'espressione di mediatori dell'infiammazione come IL-6, TNF- α , IL-2, MCP-1, ROS, a livello delle cellule endoteliali e dei monociti circolanti¹⁴⁸. Studi clinici hanno dimostrato una correlazione positiva fra la leptina e la

quantità plasmatica di PAI-1, il fattore di von Willebrand, l'attivatore tissutale del plasminogeno (tPA) e una relazione inversamente proporzionale con la proteina C. Questo dimostra chiaramente lo stretto legame fra la leptina circolante e l'aumento dell'attività piastrinica osservata nella Sindrome metabolica¹⁴⁹.

5.5.2 ADIPONECTINA (ApN)

L'Adiponectina è una proteina di 30kDa prodotta principalmente dagli adipociti ma anche dalle cellule muscolari, cellule endoteliali e cardiomiociti. E' abbondantemente secreta nel circolo ematico dove rappresenta lo 0,01% delle proteine plasmatiche (3-30µg/ml)¹⁵⁰. Appartiene alla famiglia delle proteine del collagene e presenta omologie con il collagene di tipo VII, X, e alcuni fattori del complemento¹⁵¹. I livelli plasmatici di adiponectina aumentano in seguito alla perdita di peso e all'utilizzo di farmaci insulino sensibilizzanti quindi è inversamente correlato all'insulino-resistenza e all'obesità¹⁵². Inoltre è stato rilevato che le citochine proinfiammatorie inibiscono la secrezione di adiponectina in colture di adipociti, contribuendo alle evidenze che collegano l'infiammazione con l'insulino-resistenza e l'obesità¹⁴².

In seguito all'interazione ligando-recettore si ha una fosforilazione di chinasi-AMP e una complessa trasduzione del segnale solo in parte nota, che comporta anche la modulazione del fattore di trascrizione NF-kB¹⁵³. L'adiponectina presenta un'ampia gamma di attività biologiche, esercitando principalmente una funzione insulino-sensibilizzante, anti-aterogena e anti-infiammatoria^{151, 154}. Diversi studi hanno dimostrato che tale adipochina induce a livello del muscolo scheletrico un'aumentata ossidazione degli acidi grassi liberi, con riduzione del contenuto di trigliceridi del muscolo¹⁵³, ed inoltre riduce il flusso di acidi grassi liberi al fegato inibendo la gluconeogenesi epatica¹⁵⁵. Le concentrazioni di adiponectina risultano inversamente correlate a numerosi fattori di rischio cardiovascolare tradizionali, come ipertensione arteriosa, ipertrigliceridemia e ridotti livelli di colesterolo HDL^{84, 156}. È stato dimostrato che le concentrazioni di tale adipochina

siano significativamente ridotte in coronaropatici rispetto ai soggetti di controllo sani¹⁵⁷. Alti livelli circolanti di adiponectina si associano ad un rischio ridotto di infarto miocardico ed a un rischio moderatamente ridotto di patologia coronarica in soggetti maschi diabetici¹⁵⁸.

L'intrinseca azione anti-aterogena svolta dall'adipochina potrebbe dipendere dalla regolazione di diverse vie di trasduzione del segnale coinvolte nella genesi dell'aterosclerosi: PI3K-Akt, eNOS e AMPK¹⁵⁹. Inoltre sembra che sia in grado di sopprimere l'adesione monocitaria all'endotelio vascolare e di promuovere l'angiogenesi stimolando l'interazione fra Akt e AMPK nelle cellule endoteliali¹⁵⁷.

In definitiva possiamo considerare l'adiponectina una "buona" adipochina sia per i suoi effetti anti-infiammatori, anti-aterogenici, anti-diabetici, e effetti cardioprotettivi sia per la promozione di una buona funzione endoteliale.

5.5.1 RESISTINA E VISFATINA

La Resistina è un peptide di 12kDa espressa dagli adipociti nei topi e dai macrofagi nell'uomo¹⁶⁰. L'aumentata espressione di resistina è associata a obesità, dislipidemia e insulino-resistenza attraverso la diminuzione dell'uptake di glucosio a livello cellulare^{161, 162}. Diversi studi hanno valutato un'associazione tra i livelli plasmatici di resistina o l'espressione della stessa a livello adiposo rispetto a una condizione di insulino-resistenza¹⁶³⁻¹⁶⁵. Elevati livelli di resistina correlano con markers di flogosi, sindrome metabolica, aumento del rischio cardiovascolare, angina instabile, e prognosi negativa per patologia coronarica.

La Visfatina è un proteina di 52kDa prodotta da diversi tipi cellulari, inizialmente era stata indentificata come proteina coinvolta nella maturazione B cellulare (pre-B colony-enhancing factor)^{166, 167}. Possiede funzioni simil insuliniche e si trova prevalentemente a livello del tessuto adiposo viscerale¹⁶⁸. Alcuni studi hanno descritto una correlazione

positiva fra l'espressione del gene della visfatina a livello del tessuto adiposo viscerale e il BMI mentre una correlazione negativa fra il BMI e l'espressione genica dell'adipocitochina a livello del tessuto adiposo sottocutaneo, suggerendo una differente regolazione dell'espressione della proteina nei due siti¹⁶⁹. La Visfatina è in grado di aumentare l'espressione di IL-6 e TNF- α sia *in vivo* che *in vitro*¹⁷⁰. Inoltre incrementa l'attività della Metalloproteinasi-9 (MPP-9) nei monociti e la produzione di TNF- α e IL-8 nelle cellule mononucleate ematiche favorendo l'infiammazione endoteliale e lo stress ossidativo¹⁷¹. Riguardo il metabolismo lipidico e l'aterosclerosi si suppone l'esistenza di una correlazione positiva fra la visfatina e i livelli di colesterolo HDL. Inoltre Lim *et al.*¹⁷² hanno dimostrato un effetto benefico della visfatina sulla progressione dell'infarto del miocardio. In definitiva gli effetti cardiovascolari della visfatina appaiono controversi. I suoi effetti benefici comprendono la capacità di ridurre l'apoptosi delle cellule muscolari lisce vascolari, la contrattilità cardiaca e le dimensioni di un area infartuata. Nonostante questo, elevati livelli di visfatina si associano ad infiammazione endoteliale, instabilità di placca, aumento dello stress ossidativo e dei livelli di citochine proinfiammatorie. Possiamo concludere che il suo contributo allo sviluppo delle patologie cardiovascolari sia maggiore rispetto alla sua capacità di prevenirle.

6 ANGIOGENESI, INFIAMMAZIONE E FUNZIONE ENDOTELIALE IN DONNE IN POST MENOPAUSA AFFETTE DA SINDROME METABOLICA

6.1 ABSTRACT

Background: La prevalenza della sindrome metabolica (MetS) aumenta dopo l'inizio della fase menopausale. Tuttavia non sono state ancora ben delucidate le concomitanti alterazioni del profilo vascolare, endoteliale e del processo infiammatorio.

Obiettivo: Misurare marker specifici relativi all'angiogenesi, infiammazione e funzione endoteliale in donne in post-menopausa affette o meno dalla sindrome metabolica.

Metodi: Sul siero di 100 partecipanti è stata valutata la concentrazione di Angiopietina-2, Interleuchina-8 (IL-8), Ligando solubile di FAS (sFASL), Interleuchina-6 (IL-6), Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α), Ligando solubile del CD40 (sCD40L), Inibitore-1 dell'attivatore del Plasminogeno (PAI-1), Attivatore urochinasi del plasminogeno (uPA). I confronti sono stati effettuati rispetto alla presenza o meno della Sindrome metabolica e rispetto ai suoi specifici componenti. La presenza della Sindrome metabolica è stata definita utilizzando i criteri diagnostici di Modified Adult Treatment Panel III.

Risultati: Il 57% (n=57/100) dei campioni di siero analizzati appartenevano a soggetti con Sindrome metabolica, il 47% (n=47) a individui sani che formavano il gruppo di controllo. L'età e il tempo dall'inizio della menopausa era simile nei due gruppi. In generale le donne con la MetS hanno mostrato una tendenza a elevati valori delle varie molecole analizzate. Nonostante questo, in maniera statisticamente significativa, solo i livelli di IL-6 e quelli di uPA sono risultati rispettivamente più alti e più bassi nelle donne con la MetS rispetto al controllo. Quando i valori degli analiti sono stati confrontati rispetto alla presenza delle singole componenti diagnostiche della MetS è stato osservato che i livelli di IL-6 erano più alti fra le donne affette da obesità addominale, bassi valori di

HDL-C e alti livelli di trigliceridi. Donne con ipertrigliceridemia e bassi livelli di HDL-C presentavano significative basse concentrazioni di uPA mentre quelle con iperglicemia e bassi valori di HDL-C mostravano significativi alti livelli di sCD40L.

Conclusioni: Nel nostro studio donne in post-menopausa con la MetS hanno mostrato elevati livelli di IL-6 (infiammazione) e bassi livelli di uPA (disfunzione endoteliale) rispetto al controllo. Questi risultati sono principalmente connessi con alterazioni lipidiche e metaboliche. A questo proposito sono necessarie ulteriori ricerche.

Parole chiavi: post-menopausa, sindrome metabolica, citochine, fattori di crescita, infiammazione, angiogenesi.

6.2 SCOPO DELLA TESI

L'obiettivo del presente lavoro è stato quello di misurare marker relativi all'angiogenesi, infiammazione e funzione endoteliale in donne in post-menopausa con e senza la Sindrome metabolica e di valutare, inoltre, le concentrazioni degli stessi rispetto a specifici componenti diagnostici della Sindrome metabolica.

6.3 INTRODUZIONE

L'incidenza della patologia cardiovascolare aumenta progressivamente con l'età in entrambi i sessi, ma il sesso femminile presenta un incremento di incidenza relativamente rapido in corrispondenza della menopausa. Questo perché, in questa fase, si ha una diminuzione della protezione specifica, determinata dal genere, che comporta un aumentata suscettibilità agli effetti negativi dei fattori di rischio cardiovascolari. Il periodo di transizione menopausale può essere identificato come un momento critico di cambiamento del profilo lipidico, che conduce a un progressivo aumento dei fattori di rischio cardiovascolari durante gli anni post-menopausali. Sebbene la maggior parte di questo incrementato rischio sia dovuto alla modificazione dell'assetto lipidico, secondario

alla deficienza estrogenica, molti altri fattori ormonali e cambiamenti fisiologici concorrono a determinare tale aumento. Con la menopausa, ad esempio, si ha una redistribuzione del tessuto adiposo e un generale aumento di peso. I deleteri cambiamenti nella distribuzione del grasso corporeo consistono in un aumento dell'adiposità addominale (passaggio da un pattern ginoide a uno androide), che avviene indipendentemente dall'età e dalla massa grassa totale¹⁴¹. In definitiva le modificazioni fisiologiche che avvengono durante la transizione menopausale possono comportare la creazione di una serie di fattori di rischio cardiovascolari (sovrappeso/obesità, disglycemia, dislipidemia) che se contemporaneamente presenti determinano lo sviluppo della Sindrome metabolica. E' una condizione cronica influenzata dallo stile di vita che interessa circa un quarto della popolazione mondiale¹⁷³. La prevalenza della sindrome metabolica aumenta dopo l'inizio della menopausa. Essa è costituita da un insieme di componenti strettamente correlate con l'obesità, l'infiammazione, l'insulino-resistenza, aspetti pro-trombotici e aterosclerosi, che in definitiva, aumentano il rischio di patologia cardiovascolare, di patologia neoplastica e di mortalità¹⁷⁴.

La Sindrome metabolica è associata allo sviluppo di un processo infiammatorio, di disfunzione endoteliale, stress ossidativo e alterazioni del microcircolo che, in definitiva, aumentano il rischio di sviluppare una patologia cardiovascolare e neoplastica¹⁷⁵. Per quanto suddetto, risulta di notevole interesse comprendere il ruolo della menopausa e, soprattutto, della Sindrome metabolica nella genesi dei processi infiammatori e della disfunzione endoteliale. L'obiettivo del presente studio è stato quello di valutare come la presenza della Sindrome metabolica determini delle alterazioni che incrementano il rischio di sviluppare patologia cardiovascolare in donne, che a causa della condizione menopausale, hanno di base un rischio aumentato.

6.4 MATERIALI E METODI

6.4.1 PARTECIPANTI E DISEGNO DELLO STUDIO

Da Dicembre 2011 a Giugno 2012 in collaborazione con l'Istituto Di Biomedicina Della Facoltà Di Medicina Dell'Universidad Catolica De Santiago De Guayaquil in Ecuador è stato condotto un programma di screening per la Sindrome metabolica 6. Hanno partecipato un totale di 204 donne in fisiologica post-menopausa (di età fra i 40 e i 65 anni) reclutate attraverso un annuncio pubblicato su un quotidiano. Tutte le partecipanti non assumevano terapia ormonale sostitutiva (HT) al momento del reclutamento inoltre coloro che assumevano fitoestrogeni o farmaci in grado di diminuire i livelli di lipidi venivano escluse dallo studio. Il protocollo di ricerca dello studio è stato revisionato e approvato dal Comitato Scientifico Di Ricerca dell'istituto di Biomedicina. Ai soggetti consenzienti e corrispondenti ai criteri di inclusione è stato chiesto di recarsi all'Istituto per ricevere le dovute informazioni riguardo allo studio e per firmare il consenso informato. Dopo 8 ore di digiuno notturno, nelle donne arruolate, sono stati raccolti i seguenti dati: informazioni socio-demografiche, circonferenza vita, peso (BMI), altezza, misurazione della pressione arteriosa. Inoltre, è stato prelevato un campione di circa 10-15ml di sangue venoso periferico.

Per gli scopi del presente studio, il siero delle 100 partecipanti appartenenti alla coorte iniziale è stato analizzato per valutare la concentrazione di mediatori relativi a:

- ❖ Angiogenesi: Angiopoietina-2, Interleuchina-8 (IL-8) e il Ligando solubile di FAS (sFASL);
- ❖ Infiammazione: Interleuchina-6 (IL-6), Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α)
- ❖ Funzione endoteliale: Ligando solubile del CD40 (sCD40L), Inibitore-1 dell'attivatore del Plasminogeno (PAI-1), l'attivatore urochinasi del plasminogeno (uPA)

E' stata quindi confrontata la concentrazione dei vari analiti negli individui affetti da Sindrome metabolica rispetto ai soggetti sani e anche rispetto ai singoli componenti diagnostici della Sindrome.

6.4.2 CRITERI DIAGNOSTICI DELLA SINDROME METABOLICA

La presenza della sindrome metabolica è stata definita utilizzando i criteri diagnostici di "Adult Treatment Panel III" modificati dall' American Heart Association and The National Heart, Lung and Blood Institute¹⁷⁶. Per l'inclusione era, quindi, necessario soddisfare tre o più dei seguenti criteri 7:

- ❖ Obesità addominale (circonferenza vita > 88cm)
- ❖ Elevati livelli di trigliceridi (>150mg/dl)
- ❖ Basso livelli di colesterolo di lipoproteine a alta densità (HDL-C) (<50mg/dl)
- ❖ Iperglicemia (>100mg/dl o utilizzo di farmaci ipoglicemizzanti)
- ❖ Ipertensione (130/85 mmHg, o utilizzo di antiipertensivi)

6.4.3 ANALISI DEL SIERO

I campioni ematici di tutti i partecipanti sono stati centrifugati a 5°C per 10 minuti a 3,000 rpm. Il siero ottenuto è stato trattato secondo il manuale d'istruzione, decantato in aliquote di 0,5ml e poi stoccato a -70°C. Successivamente, e prima di procedere con l'analisi, sono stati aggiunti ai campioni l'inibitore DDP-IV e l'aprotinina (Sigma Aldrich, St.Louis, MO, USA) alla concentrazione finale di 100 µM e 0,013%, rispettivamente.

6.4.4 MISURAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE DEI DIVERSI ANALITI

La concentrazione dei trigliceridi (TG), del colesterolo HDL e del glucosio sono state valutate utilizzando un metodo enzimatico colorimetrico con l'analizzatore automatico fotometrico Hitachi 717 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). La concentrazione di Angiopietina-2, IL-8, sFASL, IL-6, TNF- α , sCD40L, PAI-1 e uPA sono

state valutate utilizzando Bio-Plex 200 System® (Bio-Rad Laboratories, Inc, CA, USA) presso Bioclarma srl, Torino, Italia¹⁷⁷

6.4.5 CARATTERISTICHE DEL SAGGIO: BIO-PLEX SYSTEM

Bio-Plex® multiplex assay è un saggio immunoenzimatico costituito da sfere che hanno sia proprietà magnetiche sia fluorescenti (*Beads*) utilizzando un'unica piastra di 96 pozzetti. Il principio del saggio è simile a quello del sandwich ELISA. Anticorpi specifici, diretti contro i biomarker desiderati, sono covalentemente accoppiati ai beads. Questo complesso reagisce con il campione contenente il biomarker di interesse. Dopo una serie di lavaggi, necessari per rimuovere le proteine non legate, viene aggiunto un anticorpo biotinilato al fine di creare un complesso sandwich. La detezione finale del complesso avviene grazie all'aggiunta di un coniugato di streptavidina-picoeritina (SA-PE). La picoeritina serve come indicatore di fluorescenza. L'utilizzo di differenti beads permette la simultanea identificazione e quantificazione di molteplici analiti (circa 100) presenti nello stesso campione (2µl di campione di siero)¹⁷⁸ (Figura 5). L'acquisizione dei dati e l'analisi della reazione viene effettuata utilizzando un sistema Bio-Plex o un similare lettore Luminex-based. Quando la sospensione di un multiplo saggio viene inserita nel lettore Bio-plex 200, un laser rosso (635nm) illumina la fluorescenza di ogni bead provvedendo a una classificazione degli stessi e quindi alla lettura del saggio. Allo stesso tempo, un laser verde (532nm) eccita la picoeritina generando il segnale di lettura che è detettato da un tubo fotomoltiplicatore(PMT). Un processore digitale a alta velocità gestisce l'output dei dati e Bio-Plex Manager™ software rappresenta i dati sia come Intensità di fluorescenza mediana (MFI) sia come concentrazione (pg/ml). La concentrazione degli analiti legati a ciascun bead è proporzionale al MFI del segnale inviato.

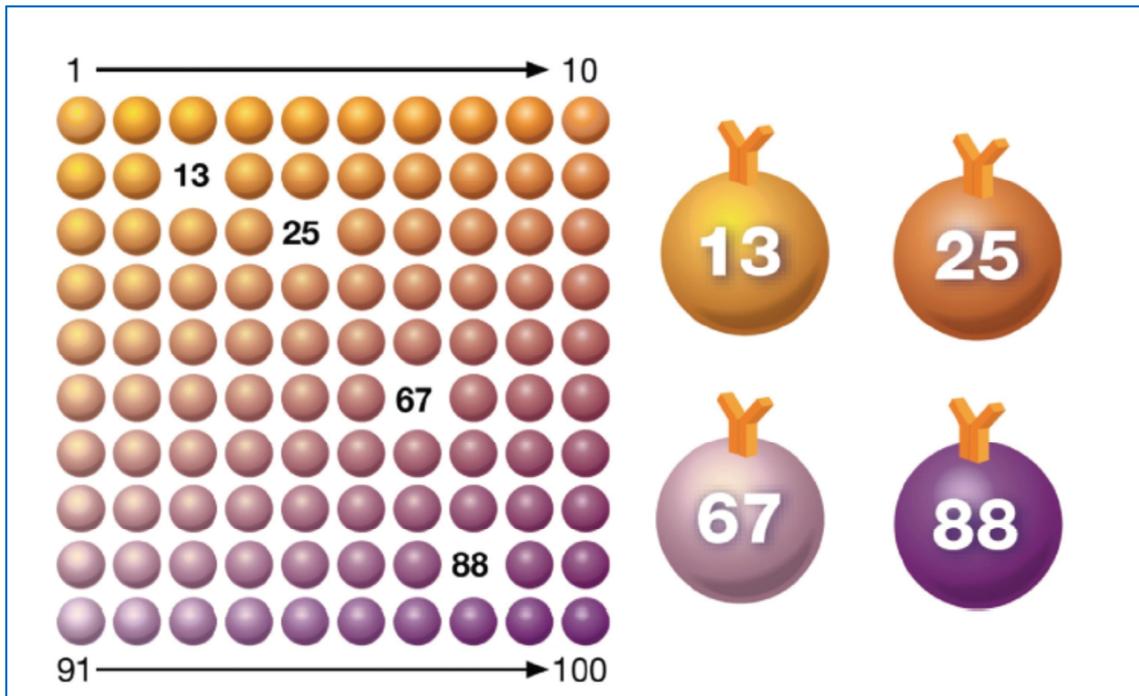


Figura 6: Saggio immunoenzimatico Multiplex. I Beads sono colorati internamente con due differenti fluorescenze (rosso e infrarosso). Vengono utilizzate 10 differenti concentrazioni di fluorescenza rossa e infrarossa per generare 100 regioni beads distinte. ogni specifico Beads viene coniugato con un analita target di interesse.

6.4.6 ANALISI STATISTICA

L'analisi statistica è stata condotta utilizzando il GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc, San Diego, CA, USA) e il *Statistical Package for the Social Sciences* (IBM SPSS, Armonk, NY, USA). I risultati sono stati rappresentati come media \pm deviazione standard, frequenza e percentuale. Per analizzare le differenze fra i due gruppi è stato utilizzato il Mann Whitney *U* test mentre con il Chi-Square test sono state confrontate le percentuali.

Per determinare la correlazione tra le concentrazioni degli analiti studiati e le componenti diagnostiche della Sindrome metabolica, espresse come variabili numeriche, sono stati calcolati i coefficienti di Spearman. A completamento è stata eseguita una regressione lineare multipla corretta per i vari fattori confondenti (età delle donne, tempo dall'inizio della menopausa, BMI, parità). Un *p* value < 0.05 è stato considerato significativo

6.5 RISULTATI

Il 57% (n=57/100) dei campioni di siero analizzati appartenevano a soggetti con Sindrome metabolica mentre il 43% (n=43) a individui sani utilizzati come controllo (Non MetS). Il 29% e il 10% dei pazienti aveva rispettivamente ipertensione e diabete. L'età e il tempo dall'inizio della menopausa era simile nei due gruppi.

Le donne affette da Sindrome metabolica rispondevano ai criteri diagnostici ATPIII modificati e presentavano un trend non statisticamente significativo di alte concentrazioni plasmatiche di angiopoietina-2, Il-8 e sFASL, tutte molecole implicate nei processi di angiogenesi (Tabella 3 e Figura 6).

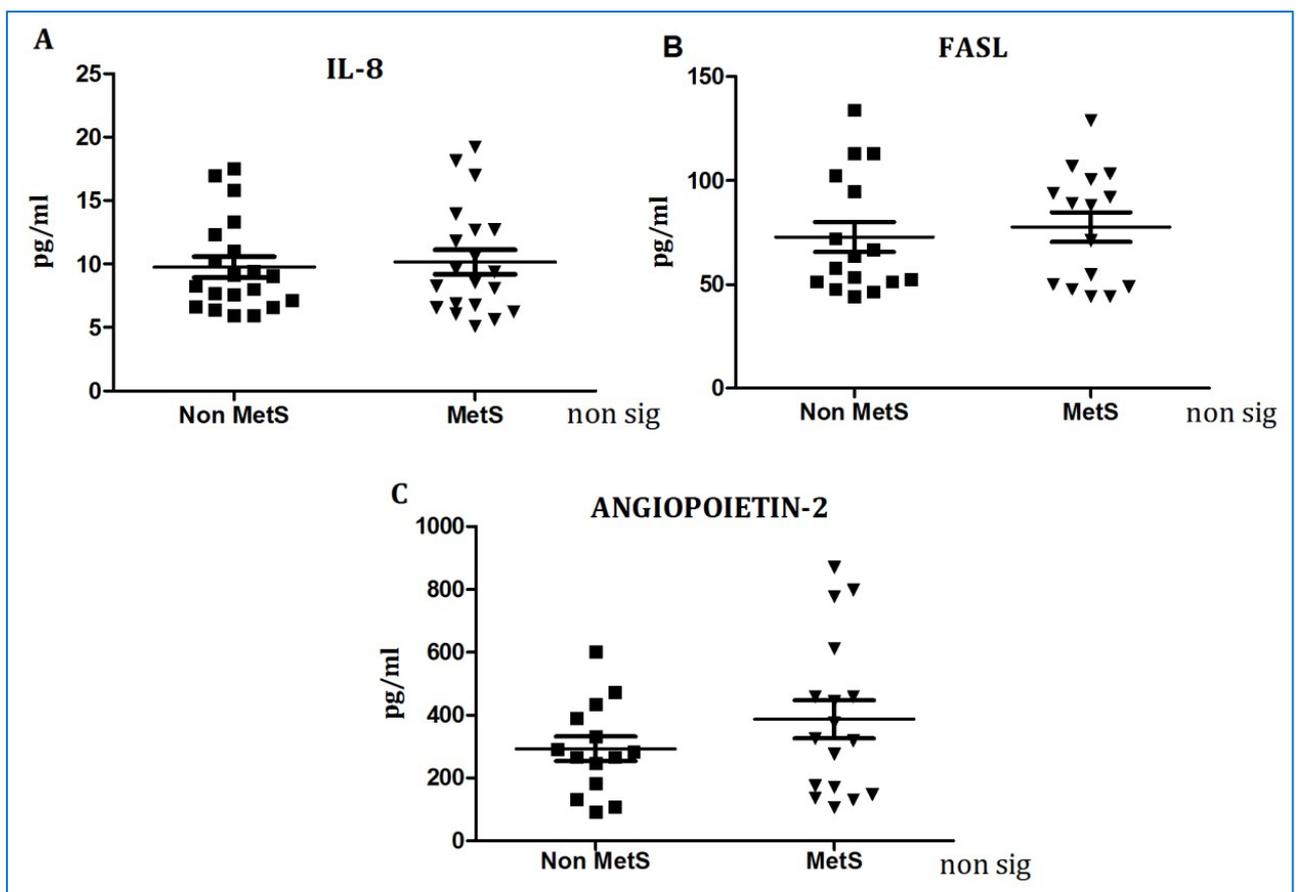


Figura 7: Concentrazioni di IL-8 (A), FASL (B) e Angiopoietina-2 (C) nei soggetti con MetS e Non MetS. Nei due gruppi non si registrano differenze statisticamente significative dopo valutazione con Mann Whitney U test (significatività $p < 0,05$).

I livelli di marker di infiammazione generale, come TNF- α , e di disfunzione endoteliale, come PAI-1 e sCD40L, non sono risultati differenti fra i due gruppi.

Una prima considerazione ha riguardato sia i livelli di citochine pro infiammatorie come IL-6 (che risultavano essere notevolmente più alti in donne con MetS), sia i livelli di U-Pa, un marker di funzione endoteliale associato con l'attivazione della fibrinolisi, che è apparso significativamente più basso nelle donne con la Sindrome metabolica (Tabella 3 e Figure 7, 8, 9).

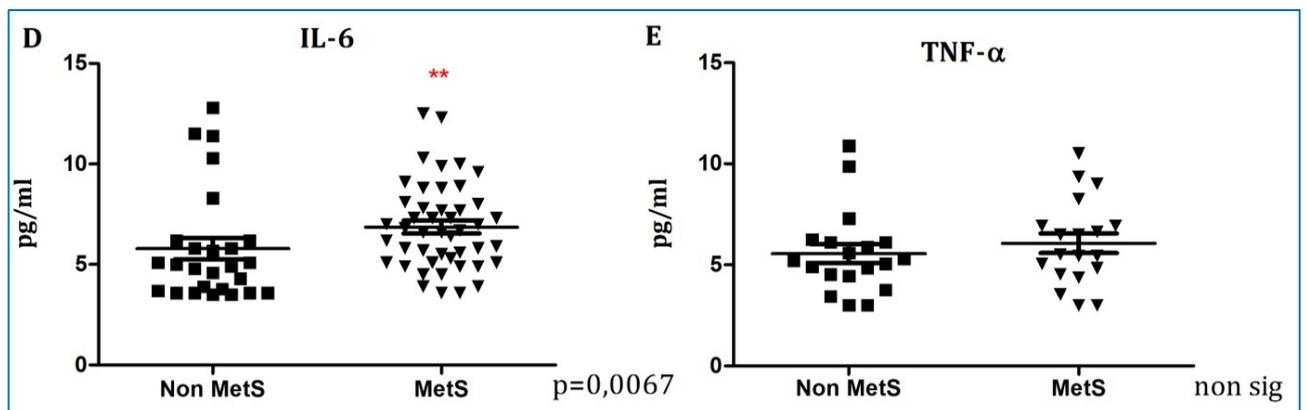


Figura 8: Alti livelli di IL-6, statisticamente significativi ($p < 0,05$), nei pazienti con MetS (D); dall'analisi statistica con Mann Whitney U test non risultano differenze nell'espressione di TNF- α fra le donne con MetS e il gruppo di controllo (Non MetS) (E).

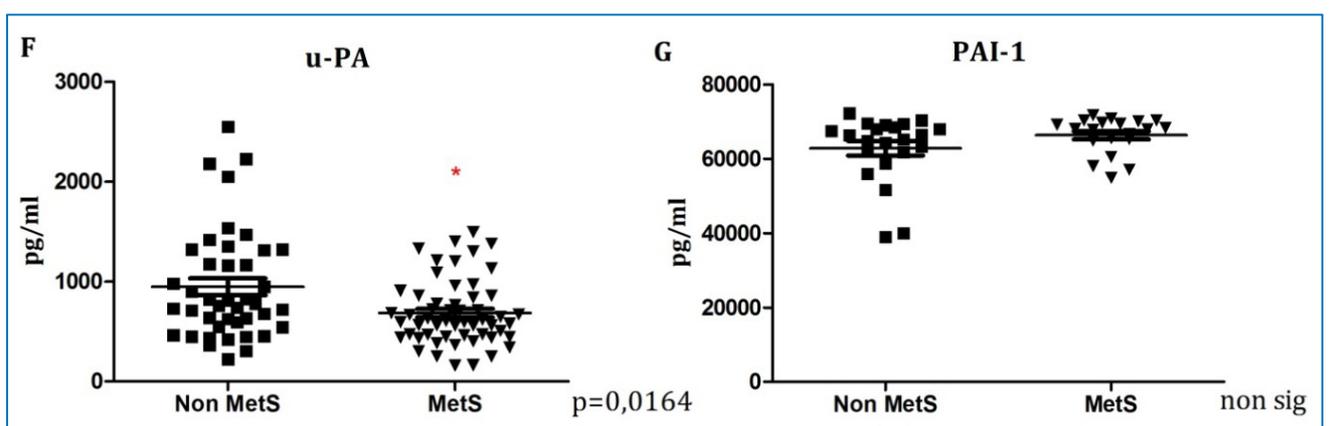


Figura 9: Bassi livelli di u-PA, statisticamente significativi ($p < 0,05$), nei pazienti con MetS (F); dall'analisi statistica con Mann Whitney U test non risultano differenze nell'espressione di PAI-1 fra le donne con MetS e il gruppo di controllo (Non MetS) (G).

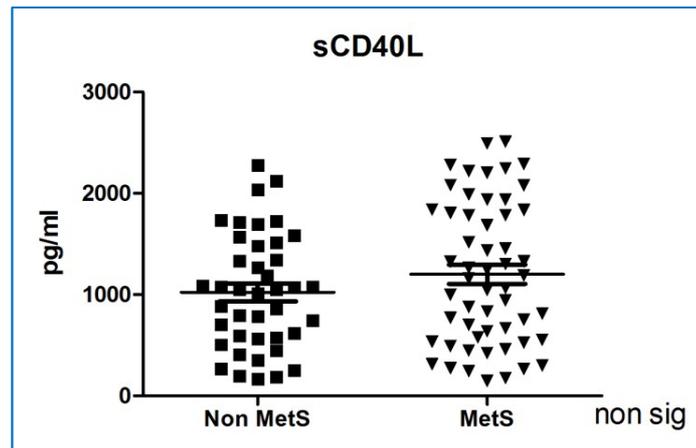


Figura 10: Rappresentazione grafica dell'analisi statistica con Mann Whitney *U* test della concentrazione di sCD40L nei soggetti con MetS e Non Mets. Non si riscontrano differenze statisticamente significative fra i due gruppi ($p < 0,05$).

Quando le concentrazioni dei vari analiti sono state confrontate rispetto alla presenza o meno di specifiche componenti della Sindrome metabolica è stato osservato che i livelli di IL-6 erano più alti fra le donne con obesità addominale, bassi valori di HDL-C e alti livelli di trigliceridi.

Donne con ipertrigliceridemia e bassi livelli di HDL-C presentavano, inoltre, basse concentrazioni di uPA, mentre quelle con iperglicemia e bassi livelli di HDL-C mostravano significativi elevati livelli di sCD40L (dati non mostrati in tabella).

Utilizzando l'analisi bivariata di Spearman, i livelli di IL-6 correlavano positivamente con la circonferenza vita e con i livelli di trigliceridi ($r^2=0,40$ e $0,38$, rispettivamente, entrambi con un $p=0,02$) e inversamente con HDL-C ($r^2=-0,37$, $p=0,01$). Le concentrazioni di uPA variavano in modo direttamente proporzionale con i livelli di HDL-C e inversamente con quelli dei trigliceridi ($r^2=0,39$ e $-0,36$, rispettivamente, entrambi con un $p=0,01$).

Infine è stata trovata una correlazione positiva fra i livelli di sCD40L e i valori di glicemia ($r^2=0,42$ e $0,37$, rispettivamente, entrambi con un $p=0,01$) e una correlazione inversa con i livelli di HDL-C ($r^2=-0,36$, $p=0,01$). Queste proporzioni sono state confermate da una multipla regressione lineare condotta per eliminare diversi fattori confondenti.

Parametri	MetS n=57	Non MetS n=43	p value*
Dati generali			
Età (anni)	56.7 ± 4.8	54.8 ± 5.4	NS
Tempo dalla menopausa (anni)	9.5 ± 7.5	8.4 ± 6.2	NS
Parità	3.2 ± 1.8	2.8 ± 1.5	NS
Educazioni (anni)	11.8 ± 5.3	13.2 ± 5.0	NS
Componenti MetS			
Obesità viscerale (circonferenza vita > 88 cm)	41 (71.9%)	14 (32.6%)	0.0001
Trigliceridi sierici (≥ 150 mg/dL)	37 (64.9%)	3 (6.9%)	0.0001
HDL-C sierico (< 50 mg/dL)	50 (87.7%)	12 (27.9%)	0.0001
Glicemia a digiuno (≥ 100 mg/dL)	30 (52.6%)	7 (16.3%)	0.03
Pressione arteriosa (≥130/85 mmHg)	41 (71.9%)	18 (41.9%)	0.002
Analiti			
Angiogenesi			
Angiopietina-2 (pg/ml)	386.8 ± 249.7	292.8 ± 145.5	NS
IL-8 (pg/ml)	10.1 ± 4.3	9.8 ± 3.7	NS
sFASL (pg/ml)	77.6 ± 27.6	72.8 ± 28.9	NS
Infiammazione			
IL-6 (pg/ml)	6.9 ± 2.1	5.8 ± 2.8	0.006
TNF-α (pg/ml)	6.0 ± 2.1	5.6 ± 2.0	NS
Funzione Endoteliale			
sCD40L (pg/ml)	1,202 ± 702	1,023 ± 567.8	NS
PAI-1(pg/ml)	66,347.0 ± 4,922.0	62,839 ± 8,991.0	NS
uPA (pg/ml)	685.5 ± 327.1	948.9 ± 550.8	0.01

Tabella 3 Dati sociodemografici, component MetS e concentrazioni degli analiti misurati nelle donne.

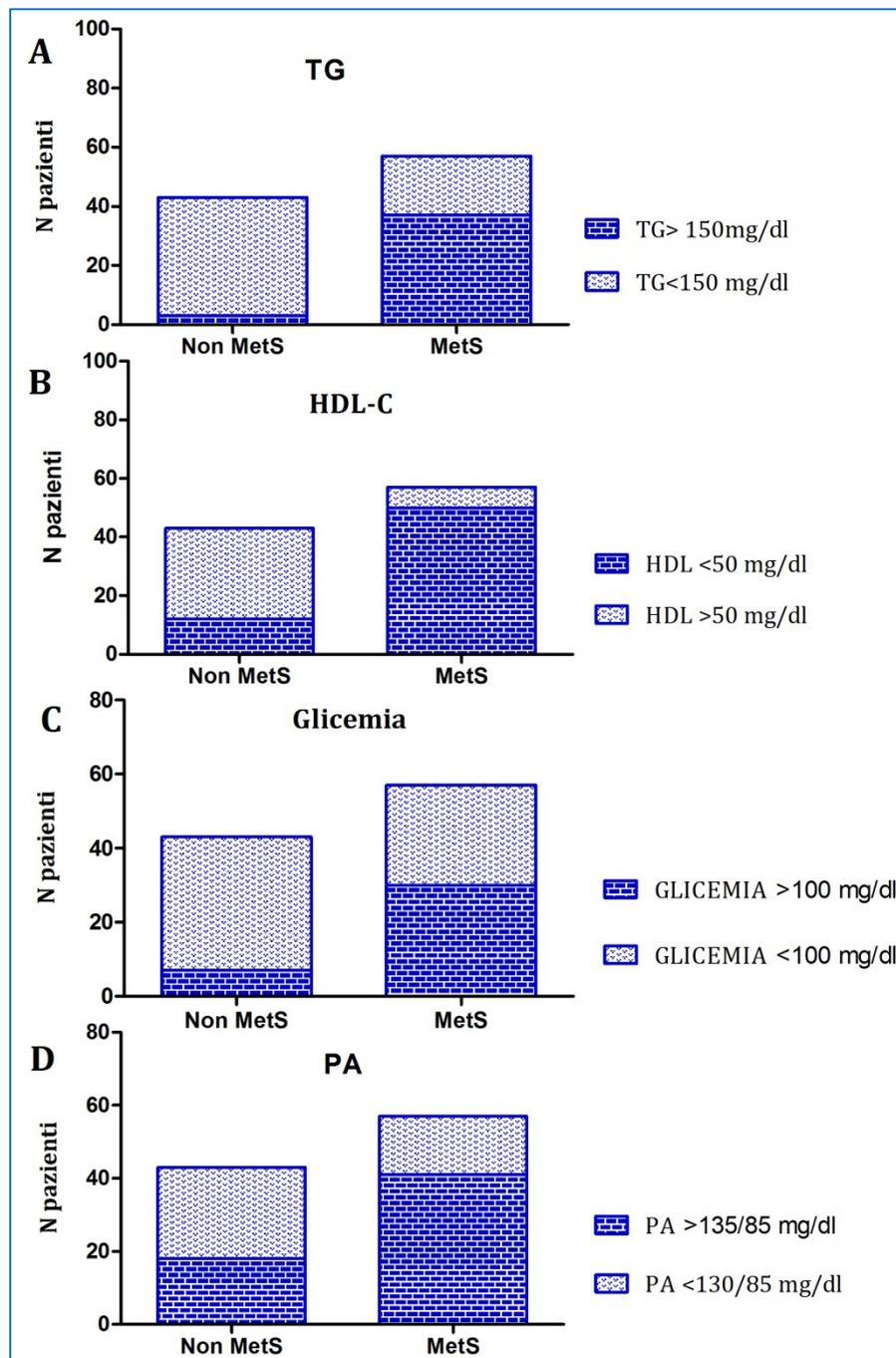


Figura 11: Rappresentazione grafica dei diversi parametri misurati nei due gruppi di pazienti. Nei soggetti con MetS prevale una condizione di dislipidemia. Infatti 37 individui con MetS su un totale di 57 presenta livelli di trigliceridi > 150 mg/dl (A), rispetto al controllo le donne con MetS hanno bassi livelli di C-HDL (< 50 mg/dl) infatti 50 pazienti su 57 versus 12 su 43 del gruppo controllo presentano queste concentrazioni (B). Poco più della metà dei soggetti con MetS presenta una glicemia < 100 mg/dl (30 individui su 57) (C). Circa il 72% (41 su 57) delle donne con MetS soffrono di ipertensione (D).

6.6 DISCUSSIONE

I risultati di queste rilevazioni hanno evidenziato come le donne in post menopausa, affette da Sindrome metabolica, presentino livelli più elevati di IL-6 (marker di infiammazione) e livelli più ridotti di uPA (marker di disfunzione endoteliale) rispetto al gruppo di controllo. Tali risultati sono coerenti con quelli di altri studi presenti in Letteratura¹⁷⁹.

Quando le concentrazioni degli analiti sono state confrontate con i singoli componenti diagnostici della Sindrome metabolica, i più elevati livelli di IL-6 sono stati registrati fra le donne con obesità addominale, bassi livelli di HDL-C e ipertrigliceridemia. Appare quindi interessante la scoperta della correlazione tra la Sindrome metabolica, piuttosto che la menopausa stessa, e gli elevati livelli di questo fattore infiammatorio.

Questi dati suggeriscono che, piuttosto che selezionare le donne per l'aver o meno la MetS, intesa come mera categoria, sarebbe più opportuno valutare i livelli di IL-6 rispetto a specifici aspetti diagnostici della Sindrome stessa.

A tal proposito, dobbiamo sottolineare che non tutte le donne obese rispondono ai criteri diagnostici della Sindrome metabolica e, nonostante questo, presentano comunque dislipidemia e aumentata secrezione di molecole pro infiammatorie da parte del tessuto adiposo. Quindi la secrezione di IL-6 da parte dei macrofagi del tessuto adiposo sembrerebbe essere una condizione generale che si manifesta in varie circostanze e che si esplica attraverso differenti meccanismi¹⁸⁰.

I nostri risultati sembrano confermare quelli derivati da uno studio che ha riportato come le concentrazioni di IL-6 in donne in post-menopausa siano significativamente associate ai livelli di trigliceridi e a altre variabili incluse nella sindrome metabolica¹⁸¹.

Tehrani *et al.* hanno rilevato che, in pazienti con patologia coronarica, la presenza di infiammazione, espressa da elevati livelli di IL-6, mitiga l'azione protettiva del HDL-C (correlazione inversa con la patologia coronarica).

I livelli sierici di IL-6 si associano con l'estensione del tessuto adiposo viscerale e possono influenzare i livelli di insulina¹⁸². Infatti, in questo studio, le donne con la METS hanno dimostrato avere elevati livelli insulinici direttamente correlati con quelli di IL-6.

Un promettente campo di ricerca potrebbe essere lo studio degli aspetti genetici coinvolti nella patogenesi della MetS e del rischio cardiovascolare a essa associata. Per esempio, è noto che, polimorfismi genici dell'IL-6 potrebbero giocare un ruolo nella patogenesi della MetS attraverso la modulazione dell'espressione della citochina¹⁸³.

Riguardo alla funzione endoteliale, è stata analizzata la concentrazione sierica di tre analiti: PAI-1, uPA e sCD40L. Nelle donne con la MetS sono stati riscontrati bassi valori di uPA e un trend non significativo di elevati livelli di PAI-1. Interessante sottolineare come, analizzando i valori di uPA rispetto ai vari componenti diagnostici della MetS, bassi livelli della proteina sono stati osservati nelle donne con bassi valori di HDL-C e ipertrigliceridemia.

L'attivatore urochinasi del plasminogeno (uPA) è una serina proteasi che attiva il plasminogeno in plasmina. Sintetizzato come precursore inattivo, viene rapidamente attivato per mezzo di una proteolisi. La sua azione è mediata dall'interazione con uno specifico recettore (uPAR) localizzato sulle membrane cellulari¹⁸⁴. Sia l'uPA che il suo recettore sono espressi da cellule infiammatorie inclusi i neutrofilo, monociti, macrofagi, e linfociti T attivi. In queste cellule, l'interazione dell'uPA con il suo recettore è fondamentale per mediare l'attivazione cellulare, l'adesione, la migrazione e la proliferazione¹⁸⁵⁻¹⁸⁸. Inoltre, il complesso uPA-uPAR potrebbe essere coinvolto in molti altri processi come l'angiogenesi, l'invasione cellulare, la risposta immunitaria, il rimodellamento vascolare e infine la cancerogenesi.

u-Pa e sCD40L sono coinvolti nell'attività del sistema plasminogeno-plasmina e nel rimodellamento tissutale.

PAI-1 influenza l'adesione cellulare e la migrazione con differenze relative al tipo cellulare, alla sua conformazione e concentrazione¹⁸⁹⁻¹⁹¹.

Quindi, bassi livelli di uPA embricati con tendenti elevati livelli di PAI-1 potrebbero essere responsabili della maggiore incidenza di eventi tromboembolici nelle donne in post-menopausa affette da MetS. E' fondamentale precisare che l'uPA è strettamente regolato dal PAI-1. In condizioni fisiologiche, durante il periodo menopausale prevalgono alti livelli di uPA e dei suoi recettori al contrario nel periodo premenopausale sono maggiori le concentrazioni di PAI-1.

L'aumento dei livelli di PAI-1 che avviene durante la transizione menopausale gioca un ruolo chiave nell'aumento del rischio cardiovascolare età-correlato. Sebbene non statisticamente significativi, i nostri risultati mostrano una tendenza a elevati valori di PAI-1 nelle donne con la Sindrome metabolica. Questo supporta l'ipotesi che modificazioni dell'assetto vascolare e infiammatorio siano presenti nelle fasi precoci della menopausa e forse della MetS (l'età media delle pazienti arruolate era 56 anni).

Tale fase rappresenta un momento indicato per intraprendere una terapia estrogenica che potrebbe sortire effetti benefici. Studi clinici hanno infatti suggerito come le cellule endoteliali siano sensibili ai cambiamenti ormonali che possono influenzare i livelli di PAI-1. Infatti, il controllo dei livelli estrogenici nelle donne in post-menopausa può esitare in più bassi livelli di PAI-1¹⁹².

E' quindi particolarmente interessante considerare che, dopo la menopausa, la presenza di MetS induce cambiamenti endocrini che sono responsabili dello sviluppo di disfunzione endoteliale. In questa ottica i nostri risultati supportano la necessità di ulteriori studi per valutare la possibilità di utilizzare il sistema PAI-1/uPA come marker di rischio metabolico e cardiovascolare nelle donne in post-menopausa.

Infine, è stata misurata la concentrazione del ligando solubile di CD40 (sCD40L). Esso è espresso dalle cellule presentanti l'antigene (cellule B, macrofagi, cellule dendritiche,

cellule timiche) e, contribuendo allo sviluppo di un quadro infiammatorio e pro-trombotico, risulta coinvolto nella genesi del processo aterosclerotico^{193, 194}.

In letteratura sono presenti lavori che indicano come gli individui con la MetS presentino elevati livelli circolanti di sVCAM e sCD40L, espressione dell'attivazione endoteliale e di conseguenza abbiano una maggiore incidenza di eventi cardiovascolari avversi connessi con complicanze aterotrombotiche^{195, 196}.

Sebbene nelle nostre pazienti con METS sia presente una tendenza, non statisticamente significativa, di elevati livelli di sCD40L, questo trend diventa significativo nelle donne con iperglicemia e bassi livelli di HDL-C. Ancora una volta, questa considerazione pone l'importanza sulla necessità di considerare in maniera individuale i vari aspetti diagnostici piuttosto che considerare la MetS come una categoria. I nostri risultati sono sovrapponibili a quelli del lavoro di Lim *et al.*, che ha rilevato elevati livelli di IL-6 e sCD40L nei pazienti diabetici.

Studi epidemiologici suggeriscono che nello sviluppo dell'aterosclerosi possano essere coinvolte differenze di genere. A questo proposito, nel sesso femminile, la proteina C, marker di infiammazione, correla maggiormente con l'insulino resistenza e i cambiamenti metabolici rispetto al sesso maschile^{197, 198}. Durante il periodo peri- e post-menopausale l'ipertrigliceridemia è stata associata alla presenza di MetS e di eccessive quantità di marker di flogosi¹⁹⁹.

Lo stato pro-infiammatorio connesso con la Sindrome metabolica induce un'alterazione delle proprietà antiinfiammatorie e ateroprotettive sia delle apolipoproteine A-I sia delle HDL, aumentando il rischio di sviluppare diabete e patologie cardiovascolari.

Infatti, elevati livelli di IL-6, registrati nella popolazione affetta da Sindrome metabolica, conducono sia ad un profilo lipidico alterato (bassi livelli di HDL-C e alti livelli di Trigliceridi) sia ad una condizione di disfunzione endoteliale (bassi livelli di uPA).

Infine, come limitazioni del presente studio dobbiamo menzionare l'estensione del campione e l'assenza di una valutazione dei livelli degli analiti nelle donne in

premenopausa, indipendentemente dalla presenza o meno della MetS, utile per una giusta comparazione.

Il nostro programma di reclutamento non teneva conto di una dettagliata analisi sulle abitudini alimentari che potrebbero influenzare l'introito calorico e lo sviluppo di varie componenti della Sindrome metabolica^{200, 201}. E' stato comunque considerato lo svolgimento o meno di una qualche attività fisica nel nostro campione. In entrambi i casi non vi sono differenze fra le concentrazioni dei vari analiti.

Studi futuri dovrebbero comprendere una valutazione longitudinale in modo da dimostrare l'andamento dei biomarkers analizzati nel passaggio da pre a post menopausa aggiungendo varie covariate fra cui l'età e la presenza della METS.

6.7 CONCLUSIONI

Nonostante le limitazioni sopramenzionate, questo lavoro dimostra che nelle donne in postmenopausa affette da METS sono presenti più alte concentrazioni di IL-6 (aspetto infiammatorio) e più basse concentrazioni di uPA (disfunzione endoteliale) rispetto al gruppo di controllo. Questi risultati sono principalmente correlate con alterazioni del profilo lipidico e metabolico.

In conclusione se, come emerge dal nostro studio, la Sindrome metabolica contribuisce allo sviluppo di aterosclerosi e di patologia cardiovascolare, la promozione di programmi educativi, alimentari e motori rappresenta una possibile strumento di prevenzione delle complicanze della Sindrome metabolica, soprattutto fra le giovani donne in post menopausa. Inoltre, considerando che dal nostro studio emerge che le alterazioni correlano principalmente con la presenza di specifiche componenti della Sindrome metabolica (obesità viscerale, bassi livelli di HDL e ipertrigliceridemia) risulta fondamentale promuovere una serie di misure volte al miglioramento di questi aspetti. Ad esempio, è opportuno promuovere un'attività fisica costante (30 minuti di esercizi per 4 volte alla settimana) associata ad un'alimentazione adeguata (riduzione dell'introito di carboidrati e di grassi saturi). Al fine di ottenere la massima compliance delle pazienti in questa fascia d'età è sicuramente necessaria una personalizzazione del programma che si adegui allo stile di vita della paziente e delle sue eventuali comorbidità.

Tale programma educativo mirato potrebbe quindi risultare una valida arma terapeutica per ridurre la morbilità e la mortalità cardiovascolare in donne in postmenopausa con la Sindrome metabolica.

7 BIBLIOGRAFIA

1. Toth MJ, Tchernof A, Sites CK, Poehlman ET. Effect of menopausal status on body composition and abdominal fat distribution. *International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity*. 2000; **24**(2): 226-31.
2. Harlow SD, Gass M, Hall JE, Lobo R, Maki P, Rebar RW, et al. Executive summary of the Stages of Reproductive Aging Workshop + 10: addressing the unfinished agenda of staging reproductive aging. *Menopause*. 2012; **19**(4): 387-95.
3. Harlow SD, Gass M, Hall JE, Lobo R, Maki P, Rebar RW, et al. Executive summary of the Stages of Reproductive Aging Workshop + 10: addressing the unfinished agenda of staging reproductive aging. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2012; **97**(4): 1159-68.
4. Wang Q, Hassager C, Ravn P, Wang S, Christiansen C. Total and regional body-composition changes in early postmenopausal women: age-related or menopause-related? *The American journal of clinical nutrition*. 1994; **60**(6): 843-8.
5. Sternfeld B, Dugan S. Physical activity and health during the menopausal transition. *Obstet Gynecol Clin North Am*. 2011; **38**(3): 537-66.
6. Toth MJ, Tchernof A, Sites CK, Poehlman ET. Menopause-related changes in body fat distribution. *Ann N Y Acad Sci*. 2000; **904**: 502-6.
7. Lee CG, Carr MC, Murdoch SJ, Mitchell E, Woods NF, Wener MH, et al. Adipokines, inflammation, and visceral adiposity across the menopausal transition: a prospective study. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2009; **94**(4): 1104-10.
8. Jayagopal V, Kilpatrick ES, Jennings PE, Holding S, Hepburn DA, Atkin SL. The biological variation of sex hormone-binding globulin in type 2 diabetes:

implications for sex hormone-binding globulin as a surrogate marker of insulin resistance. *Diabetes Care*. 2004; **27**(1): 278-80.

9. Goodman-Gruen D, Barrett-Connor E. Sex hormone-binding globulin and glucose tolerance in postmenopausal women. The Rancho Bernardo Study. *Diabetes Care*. 1997; **20**(4): 645-9.

10. Perry JR, Weedon MN, Langenberg C, Jackson AU, Lyssenko V, Sparso T, et al. Genetic evidence that raised sex hormone binding globulin (SHBG) levels reduce the risk of type 2 diabetes. *Human molecular genetics*. 2010; **19**(3): 535-44.

11. Ding EL, Song Y, Manson JE, Hunter DJ, Lee CC, Rifai N, et al. Sex hormone-binding globulin and risk of type 2 diabetes in women and men. *N Engl J Med*. 2009; **361**(12): 1152-63.

12. Peter A, Kantartzis K, Machann J, Schick F, Staiger H, Machicao F, et al. Relationships of circulating sex hormone-binding globulin with metabolic traits in humans. *Diabetes*. 2010; **59**(12): 3167-73.

13. Janssen I, Powell LH, Kazlauskaitė R, Dugan SA. Testosterone and visceral fat in midlife women: the Study of Women's Health Across the Nation (SWAN) fat patterning study. *Obesity (Silver Spring)*. 2010; **18**(3): 604-10.

14. Jorde R, Waterloo K, Storhaug H, Nyrnes A, Sundsfjord J, Jenssen TG. Neuropsychological function and symptoms in subjects with subclinical hypothyroidism and the effect of thyroxine treatment. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2006; **91**(1): 145-53.

15. Rosano GM, Maffei S, Andreassi MG, Vitale C, Vassalle C, Gambacciani M, et al. Hormone replacement therapy and cardioprotection: a new dawn? A statement of the Study Group on Cardiovascular Disease in Women of the Italian Society of Cardiology on hormone replacement therapy in postmenopausal women. *J Cardiovasc Med (Hagerstown)*. 2009; **10**(1): 85-92.

16. Mendelsohn ME, Karas RH. The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *N Engl J Med*. 1999; **340**(23): 1801-11.

17. Santoro N, Sutton-Tyrrell K. The SWAN song: Study of Women's Health Across the Nation's recurring themes. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 2011; **38**(3): 417-23.
18. Matthews KA, Crawford SL, Chae CU, Everson-Rose SA, Sowers MF, Sternfeld B, et al. Are changes in cardiovascular disease risk factors in midlife women due to chronological aging or to the menopausal transition? *J Am Coll Cardiol.* 2009; **54**(25): 2366-73.
19. Knauff EA, Westerveld HE, Goverde AJ, Eijkemans MJ, Valkenburg O, van Santbrink EJ, et al. Lipid profile of women with premature ovarian failure. *Menopause.* 2008; **15**(5): 919-23.
20. Welty FK, Stuart E, O'Meara M, Huddleston J. Effect of addition of exercise to therapeutic lifestyle changes diet in enabling women and men with coronary heart disease to reach Adult Treatment Panel III low-density lipoprotein cholesterol goal without lowering high-density lipoprotein cholesterol. *Am J Cardiol.* 2002; **89**(10): 1201-4.
21. Slentz CA, Houmard JA, Johnson JL, Bateman LA, Tanner CJ, McCartney JS, et al. Inactivity, exercise training and detraining, and plasma lipoproteins. STRRIDE: a randomized, controlled study of exercise intensity and amount. *J Appl Physiol* (1985). 2007; **103**(2): 432-42.
22. Simkin-Silverman LR, Wing RR. Weight gain during menopause. Is it inevitable or can it be prevented? *Postgrad Med.* 2000; **108**(3): 47-50, 3-6.
23. Grady D, Rubin SM, Petitti DB, Fox CS, Black D, Ettinger B, et al. Hormone therapy to prevent disease and prolong life in postmenopausal women. *Ann Intern Med.* 1992; **117**(12): 1016-37.
24. Yager JD, Davidson NE. Estrogen carcinogenesis in breast cancer. *N Engl J Med.* 2006; **354**(3): 270-82.

25. Schierbeck LL, Rejnmark L, Tofteng CL, Stilgren L, Eiken P, Mosekilde L, et al. Effect of hormone replacement therapy on cardiovascular events in recently postmenopausal women: randomised trial. *BMJ*. 2012; **345**: e6409.
26. Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association*. 1998; **15**(7): 539-53.
27. A.Lenzi GL, E.Martino, R.Vigneri. Sindrome metabolica. In: Medica M, editor. *Endocrinologia medica*. Torino; 2011. p. 363-71.
28. Huang PL. A comprehensive definition for metabolic syndrome. *Disease models & mechanisms*. 2009; **2**(5-6): 231-7.
29. Daskalopoulou SS, Athyros VG, Kolovou GD, Anagnostopoulou KK, Mikhailidis DP. Definitions of metabolic syndrome: Where are we now? *Current vascular pharmacology*. 2006; **4**(3): 185-97.
30. Alberti KG, Zimmet P, Shaw J. The metabolic syndrome--a new worldwide definition. *Lancet*. 2005; **366**(9491): 1059-62.
31. Day C. Metabolic syndrome, or What you will: definitions and epidemiology. *Diabetes & vascular disease research : official journal of the International Society of Diabetes and Vascular Disease*. 2007; **4**(1): 32-8.
32. Meigs JB. Epidemiology of the metabolic syndrome, 2002. *Am J Manag Care*. 2002; **8**(11 Suppl): S283-92; quiz S93-6.
33. Gupta A, Gupta R, Sarna M, Rastogi S, Gupta VP, Kothari K. Prevalence of diabetes, impaired fasting glucose and insulin resistance syndrome in an urban Indian population. *Diabetes Res Clin Pract*. 2003; **61**(1): 69-76.
34. Ford ES. Prevalence of the metabolic syndrome in US populations. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2004; **33**(2): 333-50.

35. Balkau B, Vernay M, Mhamdi L, Novak M, Arondel D, Vol S, et al. The incidence and persistence of the NCEP (National Cholesterol Education Program) metabolic syndrome. The French D.E.S.I.R. study. *Diabetes Metab.* 2003; **29**(5): 526-32.
36. Ramachandran A, Snehalatha C, Satyavani K, Sivasankari S, Vijay V. Metabolic syndrome in urban Asian Indian adults--a population study using modified ATP III criteria. *Diabetes Res Clin Pract.* 2003; **60**(3): 199-204.
37. Ponholzer A, Temml C, Rauchenwald M, Marszalek M, Madersbacher S. Is the metabolic syndrome a risk factor for female sexual dysfunction in sexually active women? *Int J Impot Res.* 2008; **20**(1): 100-4.
38. Chedraui P, Hidalgo L, Chavez D, Morocho N, Alvarado M, Huc A. Quality of life among postmenopausal Ecuadorian women participating in a metabolic syndrome screening program. *Maturitas.* 2007; **56**(1): 45-53.
39. Noto D, Barbagallo CM, Cefalu AB, Falletta A, Sapienza M, Cavera G, et al. The metabolic syndrome predicts cardiovascular events in subjects with normal fasting glucose: results of a 15 years follow-up in a Mediterranean population. *Atherosclerosis.* 2008; **197**(1): 147-53.
40. Gupta A, Gupta V. Metabolic syndrome: what are the risks for humans? *Bioscience trends.* 2010; **4**(5): 204-12.
41. Yamaoka K, Tango T. Effects of lifestyle modification on metabolic syndrome: a systematic review and meta-analysis. *BMC medicine.* 2012; **10**: 138.
42. Conti F. Regolazione endocrina del metabolismo di calcio, fosforo e glucosio. In: edi-ermes, editor. *Fisiologia Medica.* Milano; 2008.
43. Wang CC, Goalstone ML, Draznin B. Molecular mechanisms of insulin resistance that impact cardiovascular biology. *Diabetes.* 2004; **53**(11): 2735-40.

44. Matsuzawa Y, Funahashi T, Nakamura T. The concept of metabolic syndrome: contribution of visceral fat accumulation and its molecular mechanism. *J Atheroscler Thromb.* 2011; **18**(8): 629-39.
45. Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* 2004; **89**(6): 2548-56.
46. Koyama S, Ichikawa G, Kojima M, Shimura N, Sairenchi T, Arisaka O. Adiposity rebound and the development of metabolic syndrome. *Pediatrics.* 2014; **133**(1): e114-9.
47. Bogers RP, Bemelmans WJ, Hoogenveen RT, Boshuizen HC, Woodward M, Knekt P, et al. Association of overweight with increased risk of coronary heart disease partly independent of blood pressure and cholesterol levels: a meta-analysis of 21 cohort studies including more than 300 000 persons. *Arch Intern Med.* 2007; **167**(16): 1720-8.
48. Semenkovich CF. Insulin resistance and atherosclerosis. *The Journal of clinical investigation.* 2006; **116**(7): 1813-22.
49. Xu A, Vanhoutte PM. Adiponectin and adipocyte fatty acid binding protein in the pathogenesis of cardiovascular disease. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2012; **302**(6): H1231-40.
50. Kim JA, Montagnani M, Koh KK, Quon MJ. Reciprocal relationships between insulin resistance and endothelial dysfunction: molecular and pathophysiological mechanisms. *Circulation.* 2006; **113**(15): 1888-904.
51. Muniyappa R, Sowers JR. Role of insulin resistance in endothelial dysfunction. *Rev Endocr Metab Disord.* 2013; **14**(1): 5-12.
52. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science.* 1993; **259**(5091): 87-91.

53. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*. 1994; **372**(6505): 425-32.
54. Trayhurn P, Beattie JH. Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ. *Proc Nutr Soc*. 2001; **60**(3): 329-39.
55. Fruhbeck G, Gomez-Ambrosi J, Muruzabal FJ, Burrell MA. The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2001; **280**(6): E827-47.
56. Lihn AS, Pedersen SB, Richelsen B. Adiponectin: action, regulation and association to insulin sensitivity. *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity*. 2005; **6**(1): 13-21.
57. Frayn KN, Karpe F, Fielding BA, Macdonald IA, Coppack SW. Integrative physiology of human adipose tissue. *International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity*. 2003; **27**(8): 875-88.
58. S. C. Morphology of the inflammatory state of the adipose organ in obese mice and humans *Obesity and Metabolism*. 2006: 13-21.
59. Arner P. Regional differences in protein production by human adipose tissue. *Biochemical Society transactions*. 2001; **29**(Pt 2): 72-5.
60. Fain JN, Madan AK, Hiler ML, Cheema P, Bahouth SW. Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. *Endocrinology*. 2004; **145**(5): 2273-82.
61. Permana PA, Menge C, Reaven PD. Macrophage-secreted factors induce adipocyte inflammation and insulin resistance. *Biochemical and biophysical research communications*. 2006; **341**(2): 507-14.

62. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW, Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *The Journal of clinical investigation*. 2003; **112**(12): 1796-808.
63. Elena Zoico AR, Mauro Zamboni. Adipocitochine e complicanze metaboliche dell'obesità. *Biochimica Clinica*. 2011; **35**.
64. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *The Journal of clinical investigation*. 2004; **114**(12): 1752-61.
65. Cinti S, Mitchell G, Barbatelli G, Murano I, Ceresi E, Faloia E, et al. Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *J Lipid Res*. 2005; **46**(11): 2347-55.
66. de Luca C, Olefsky JM. Inflammation and insulin resistance. *FEBS letters*. 2008; **582**(1): 97-105.
67. Moller DE. Potential role of TNF-alpha in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Trends Endocrinol Metab*. 2000; **11**(6): 212-7.
68. Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelman BM. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. *The Journal of clinical investigation*. 1995; **95**(5): 2409-15.
69. Tsigos C, Kyrou I, Chala E, Tsapogas P, Stavridis JC, Raptis SA, et al. Circulating tumor necrosis factor alpha concentrations are higher in abdominal versus peripheral obesity. *Metabolism: clinical and experimental*. 1999; **48**(10): 1332-5.
70. Winkler G, Kiss S, Keszthelyi L, Sapi Z, Ory I, Salamon F, et al. Expression of tumor necrosis factor (TNF)-alpha protein in the subcutaneous and visceral adipose tissue in correlation with adipocyte cell volume, serum TNF-alpha, soluble serum TNF-receptor-2 concentrations and C-peptide level. *Eur J Endocrinol*. 2003; **149**(2): 129-35.

71. Cheung AT, Ree D, Kolls JK, Fuselier J, Coy DH, Bryer-Ash M. An in vivo model for elucidation of the mechanism of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha)-induced insulin resistance: evidence for differential regulation of insulin signaling by TNF-alpha. *Endocrinology*. 1998; **139**(12): 4928-35.
72. Ofei F, Hurel S, Newkirk J, Sopwith M, Taylor R. Effects of an engineered human anti-TNF-alpha antibody (CDP571) on insulin sensitivity and glycemic control in patients with NIDDM. *Diabetes*. 1996; **45**(7): 881-5.
73. Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, Gorgun CZ, Uysal KT, Maeda K, et al. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature*. 2002; **420**(6913): 333-6.
74. Hotamisligil GS. Inflammatory pathways and insulin action. *International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity*. 2003; **27 Suppl 3**: S53-5.
75. Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavari A, Ellis R, White MF, Spiegelman BM. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF-alpha- and obesity-induced insulin resistance. *Science*. 1996; **271**(5249): 665-8.
76. Hotamisligil GS, Budavari A, Murray D, Spiegelman BM. Reduced tyrosine kinase activity of the insulin receptor in obesity-diabetes. Central role of tumor necrosis factor-alpha. *The Journal of clinical investigation*. 1994; **94**(4): 1543-9.
77. Plomgaard P, Bouzakri K, Krogh-Madsen R, Mittendorfer B, Zierath JR, Pedersen BK. Tumor necrosis factor-alpha induces skeletal muscle insulin resistance in healthy human subjects via inhibition of Akt substrate 160 phosphorylation. *Diabetes*. 2005; **54**(10): 2939-45.
78. Kern PA, Di Gregorio GB, Lu T, Rassouli N, Ranganathan G. Adiponectin expression from human adipose tissue: relation to obesity, insulin resistance, and tumor necrosis factor-alpha expression. *Diabetes*. 2003; **52**(7): 1779-85.

79. Uysal KT, Wiesbrock SM, Marino MW, Hotamisligil GS. Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF- α function. *Nature*. 1997; **389**(6651): 610-4.
80. Ventre J, Doebber T, Wu M, MacNaul K, Stevens K, Pasparakis M, et al. Targeted disruption of the tumor necrosis factor- α gene: metabolic consequences in obese and nonobese mice. *Diabetes*. 1997; **46**(9): 1526-31.
81. Wisse BE. The inflammatory syndrome: the role of adipose tissue cytokines in metabolic disorders linked to obesity. *J Am Soc Nephrol*. 2004; **15**(11): 2792-800.
82. Kern PA, Ranganathan S, Li C, Wood L, Ranganathan G. Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2001; **280**(5): E745-51.
83. Bastard JP, Jardel C, Bruckert E, Blondy P, Capeau J, Laville M, et al. Elevated levels of interleukin 6 are reduced in serum and subcutaneous adipose tissue of obese women after weight loss. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2000; **85**(9): 3338-42.
84. Chandran M, Phillips SA, Ciaraldi T, Henry RR. Adiponectin: more than just another fat cell hormone? *Diabetes Care*. 2003; **26**(8): 2442-50.
85. Hotamisligil GS. Molecular mechanisms of insulin resistance and the role of the adipocyte. *International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity*. 2000; **24 Suppl 4**: S23-7.
86. Fasshauer M, Paschke R. Regulation of adipocytokines and insulin resistance. *Diabetologia*. 2003; **46**(12): 1594-603.
87. Heinrich PC, Castell JV, Andus T. Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem J*. 1990; **265**(3): 621-36.

88. Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE, Rifai N. C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *N Engl J Med.* 2000; **342**(12): 836-43.
89. Ridker PM, Morrow DA. C-reactive protein, inflammation, and coronary risk. *Cardiol Clin.* 2003; **21**(3): 315-25.
90. Burke AP, Tracy RP, Kolodgie F, Malcom GT, Zieske A, Kutys R, et al. Elevated C-reactive protein values and atherosclerosis in sudden coronary death: association with different pathologies. *Circulation.* 2002; **105**(17): 2019-23.
91. Burstein SA, Peng J, Friese P, Wolf RF, Harrison P, Downs T, et al. Cytokine-induced alteration of platelet and hemostatic function. *Stem Cells.* 1996; **14 Suppl 1**: 154-62.
92. Wassmann S, Stumpf M, Strehlow K, Schmid A, Schieffer B, Bohm M, et al. Interleukin-6 induces oxidative stress and endothelial dysfunction by overexpression of the angiotensin II type 1 receptor. *Circ Res.* 2004; **94**(4): 534-41.
93. Plata-Salaman CR. Immunoregulators in the nervous system. *Neurosci Biobehav Rev.* 1991; **15**(2): 185-215.
94. Wallenius V, Wallenius K, Ahren B, Rudling M, Carlsten H, Dickson SL, et al. Interleukin-6-deficient mice develop mature-onset obesity. *Nat Med.* 2002; **8**(1): 75-9.
95. Collen D. Ham-Wasserman lecture: role of the plasminogen system in fibrin-homeostasis and tissue remodeling. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2001: 1-9.
96. Collen D. The plasminogen (fibrinolytic) system. *Thromb Haemost.* 1999; **82**(2): 259-70.
97. Carriero MV, Franco P, Del Vecchio S, Massa O, Botti G, D'Aiuto G, et al. Tissue distribution of soluble and receptor-bound urokinase in human breast

cancer using a panel of monoclonal antibodies. *Cancer research*. 1994; **54**(20): 5445-54.

98. Anand SS, Yi Q, Gerstein H, Lonn E, Jacobs R, Vuksan V, et al. Relationship of metabolic syndrome and fibrinolytic dysfunction to cardiovascular disease. *Circulation*. 2003; **108**(4): 420-5.

99. Aso Y. Plasminogen activator inhibitor (PAI)-1 in vascular inflammation and thrombosis. *Front Biosci*. 2007; **12**: 2957-66.

100. Dimova EY, Kietzmann T. Metabolic, hormonal and environmental regulation of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) expression: lessons from the liver. *Thromb Haemost*. 2008; **100**(6): 992-1006.

101. Bergheim I, Guo L, Davis MA, Duveau I, Arteel GE. Critical role of plasminogen activator inhibitor-1 in cholestatic liver injury and fibrosis. *J Pharmacol Exp Ther*. 2006; **316**(2): 592-600.

102. Gilabert-Estelles J, Estelles A, Gilabert J, Castello R, Espana F, Falco C, et al. Expression of several components of the plasminogen activator and matrix metalloproteinase systems in endometriosis. *Hum Reprod*. 2003; **18**(7): 1516-22.

103. Carrell RW, Pemberton PA, Boswell DR. The serpins: evolution and adaptation in a family of protease inhibitors. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1987; **52**: 527-35.

104. Gettins PG. Serpin structure, mechanism, and function. *Chem Rev*. 2002; **102**(12): 4751-804.

105. Huntington JA, Read RJ, Carrell RW. Structure of a serpin-protease complex shows inhibition by deformation. *Nature*. 2000; **407**(6806): 923-6.

106. Panahloo A, Yudkin JS. Diminished fibrinolysis in diabetes mellitus and its implication for diabetic vascular disease. *Coron Artery Dis*. 1996; **7**(10): 723-31.

107. Janand-Delenne B, Chagnaud C, Raccah D, Alessi MC, Juhan-Vague I, Vague P. Visceral fat as a main determinant of plasminogen activator inhibitor 1 level in

women. *International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity*. 1998; **22**(4): 312-7.

108. Schneider DJ, Absher PM, Ricci MA. Dependence of augmentation of arterial endothelial cell expression of plasminogen activator inhibitor type 1 by insulin on soluble factors released from vascular smooth muscle cells. *Circulation*. 1997; **96**(9): 2868-76.

109. Sironi L, Mussoni L, Prati L, Baldassarre D, Camera M, Banfi C, et al. Plasminogen activator inhibitor type-1 synthesis and mRNA expression in HepG2 cells are regulated by VLDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1996; **16**(1): 89-96.

110. Latron Y, Chautan M, Anfosso F, Alessi MC, Nalbone G, Lafont H, et al. Stimulating effect of oxidized low density lipoproteins on plasminogen activator inhibitor-1 synthesis by endothelial cells. *Arterioscler Thromb*. 1991; **11**(6): 1821-9.

111. Angelico F, Alessandri C, Ferro D, Pignatelli P, Del Ben M, Fiorello S, et al. Enhanced soluble CD40L in patients with the metabolic syndrome: Relationship with in vivo thrombin generation. *Diabetologia*. 2006; **49**(6): 1169-74.

112. Genc H, Dogru T, Tapan S, Tasci I, Bozoglu E, Gok M, et al. Soluble CD40 ligand, soluble P-selectin and von Willebrand factor levels in subjects with prediabetes: the impact of metabolic syndrome. *Clin Biochem*. 2012; **45**(1-2): 92-5.

113. Andre P, Nannizzi-Alaimo L, Prasad SK, Phillips DR. Platelet-derived CD40L: the switch-hitting player of cardiovascular disease. *Circulation*. 2002; **106**(8): 896-9.

114. Mach F, Schonbeck U, Sukhova GK, Atkinson E, Libby P. Reduction of atherosclerosis in mice by inhibition of CD40 signalling. *Nature*. 1998; **394**(6689): 200-3.

115. Lee WL, Lee WJ, Chen YT, Liu TJ, Liang KW, Ting CT, et al. The presence of metabolic syndrome is independently associated with elevated serum CD40 ligand

and disease severity in patients with symptomatic coronary artery disease. *Metabolism: clinical and experimental*. 2006; **55**(8): 1029-34.

116. Varo N, Vicent D, Libby P, Nuzzo R, Calle-Pascual AL, Bernal MR, et al. Elevated plasma levels of the atherogenic mediator soluble CD40 ligand in diabetic patients: a novel target of thiazolidinediones. *Circulation*. 2003; **107**(21): 2664-9.

117. Basili S, Pacini G, Guagnano MT, Manigrasso MR, Santilli F, Pettinella C, et al. Insulin resistance as a determinant of platelet activation in obese women. *J Am Coll Cardiol*. 2006; **48**(12): 2531-8.

118. Schernthaner GH, Kopp HP, Krzyzanowska K, Kriwanek S, Koppensteiner R, Schernthaner G. Soluble CD40L in patients with morbid obesity: significant reduction after bariatric surgery. *Eur J Clin Invest*. 2006; **36**(6): 395-401.

119. Missiou A, Wolf D, Platzer I, Ernst S, Walter C, Rudolf P, et al. CD40L induces inflammation and adipogenesis in adipose cells--a potential link between metabolic and cardiovascular disease. *Thromb Haemost*. 2010; **103**(4): 788-96.

120. Wu H, Ghosh S, Perrard XD, Feng L, Garcia GE, Perrard JL, et al. T-cell accumulation and regulated on activation, normal T cell expressed and secreted upregulation in adipose tissue in obesity. *Circulation*. 2007; **115**(8): 1029-38.

121. McCawley LJ, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: multifunctional contributors to tumor progression. *Mol Med Today*. 2000; **6**(4): 149-56.

122. Fidler IJ, Ellis LM. Chemotherapeutic drugs--more really is not better. *Nat Med*. 2000; **6**(5): 500-2.

123. Bruun JM, Pedersen SB, Richelsen B. Regulation of interleukin 8 production and gene expression in human adipose tissue in vitro. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2001; **86**(3): 1267-73.

124. Gerszten RE, Garcia-Zepeda EA, Lim YC, Yoshida M, Ding HA, Gimbrone MA, Jr., et al. MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions. *Nature*. 1999; **398**(6729): 718-23.

125. Moreau M, Brocheriou I, Petit L, Ninio E, Chapman MJ, Rouis M. Interleukin-8 mediates downregulation of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 expression in cholesterol-loaded human macrophages: relevance to stability of atherosclerotic plaque. *Circulation*. 1999; **99**(3): 420-6.
126. Romuk E, Skrzep-Poloczek B, Wojciechowska C, Tomasik A, Birkner E, Wodniecki J, et al. Selectin-P and interleukin-8 plasma levels in coronary heart disease patients. *Eur J Clin Invest*. 2002; **32**(9): 657-61.
127. Bruun JM, Verdich C, Toubro S, Astrup A, Richelsen B. Association between measures of insulin sensitivity and circulating levels of interleukin-8, interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha. Effect of weight loss in obese men. *Eur J Endocrinol*. 2003; **148**(5): 535-42.
128. Takagi H, Koyama S, Seike H, Oh H, Otani A, Matsumura M, et al. Potential role of the angiotensin II type 2 receptor system in ischemia-induced retinal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003; **44**(1): 393-402.
129. Jones N, Master Z, Jones J, Bouchard D, Gunji Y, Sasaki H, et al. Identification of Tek/Tie2 binding partners. Binding to a multifunctional docking site mediates cell survival and migration. *The Journal of biological chemistry*. 1999; **274**(43): 30896-905.
130. Hanahan D. Signaling vascular morphogenesis and maintenance. *Science*. 1997; **277**(5322): 48-50.
131. Lim HS, Lip GY, Blann AD. Angiotensin-1 and angiotensin-2 in diabetes mellitus: relationship to VEGF, glycaemic control, endothelial damage/dysfunction and atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2005; **180**(1): 113-8.
132. Peter ME, Budd RC, Desbarats J, Hedrick SM, Hueber AO, Newell MK, et al. The CD95 receptor: apoptosis revisited. *Cell*. 2007; **129**(3): 447-50.
133. Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. Non-apoptotic Fas signaling. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2003; **14**(1): 53-66.

134. Suda T, Takahashi T, Golstein P, Nagata S. Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell*. 1993; **75**(6): 1169-78.
135. Tanaka M, Suda T, Takahashi T, Nagata S. Expression of the functional soluble form of human fas ligand in activated lymphocytes. *Embo J*. 1995; **14**(6): 1129-35.
136. Kayagaki N, Kawasaki A, Ebata T, Ohmoto H, Ikeda S, Inoue S, et al. Metalloproteinase-mediated release of human Fas ligand. *J Exp Med*. 1995; **182**(6): 1777-83.
137. Farley SM, Purdy DE, Ryabinina OP, Schneider P, Magun BE, Iordanov MS. Fas ligand-induced proinflammatory transcriptional responses in reconstructed human epidermis. Recruitment of the epidermal growth factor receptor and activation of MAP kinases. *The Journal of biological chemistry*. 2008; **283**(2): 919-28.
138. Schaub FJ, Liles WC, Ferri N, Sayson K, Seifert RA, Bowen-Pope DF. Fas and Fas-associated death domain protein regulate monocyte chemoattractant protein-1 expression by human smooth muscle cells through caspase- and calpain-dependent release of interleukin-1alpha. *Circ Res*. 2003; **93**(6): 515-22.
139. Wueest S, Rapold RA, Schumann DM, Rytka JM, Schildknecht A, Nov O, et al. Deletion of Fas in adipocytes relieves adipose tissue inflammation and hepatic manifestations of obesity in mice. *The Journal of clinical investigation*. 2010; **120**(1): 191-202.
140. Wauters M, Considine RV, Van Gaal LF. Human leptin: from an adipocyte hormone to an endocrine mediator. *Eur J Endocrinol*. 2000; **143**(3): 293-311.
141. Margetic S, Gazzola C, Pegg GG, Hill RA. Leptin: a review of its peripheral actions and interactions. *International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity*. 2002; **26**(11): 1407-33.

142. Lago F, Dieguez C, Gomez-Reino J, Gualillo O. The emerging role of adipokines as mediators of inflammation and immune responses. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2007; **18**(3-4): 313-25.
143. Zabeau L, Lavens D, Peelman F, Eyckerman S, Vandekerckhove J, Tavernier J. The ins and outs of leptin receptor activation. *FEBS letters.* 2003; **546**(1): 45-50.
144. Myers MG, Jr. Leptin receptor signaling and the regulation of mammalian physiology. *Recent Prog Horm Res.* 2004; **59**: 287-304.
145. Yamagishi SI, Edelstein D, Du XL, Kaneda Y, Guzman M, Brownlee M. Leptin induces mitochondrial superoxide production and monocyte chemoattractant protein-1 expression in aortic endothelial cells by increasing fatty acid oxidation via protein kinase A. *The Journal of biological chemistry.* 2001; **276**(27): 25096-100.
146. Sierra-Johnson J, Romero-Corral A, Lopez-Jimenez F, Gami AS, Sert Kuniyoshi FH, Wolk R, et al. Relation of increased leptin concentrations to history of myocardial infarction and stroke in the United States population. *Am J Cardiol.* 2007; **100**(2): 234-9.
147. Wannamethee SG, Tchernova J, Whincup P, Lowe GD, Kelly A, Rumley A, et al. Plasma leptin: associations with metabolic, inflammatory and haemostatic risk factors for cardiovascular disease. *Atherosclerosis.* 2007; **191**(2): 418-26.
148. Bouloumie A, Marumo T, Lafontan M, Busse R. Leptin induces oxidative stress in human endothelial cells. *Faseb J.* 1999; **13**(10): 1231-8.
149. Vykoukal D, Davies MG. Vascular biology of metabolic syndrome. *J Vasc Surg.* 2011; **54**(3): 819-31.
150. Ouchi N, Ohishi M, Kihara S, Funahashi T, Nakamura T, Nagaretani H, et al. Association of hypoadiponectinemia with impaired vasoreactivity. *Hypertension.* 2003; **42**(3): 231-4.

151. Ukkola O, Santaniemi M. Adiponectin: a link between excess adiposity and associated comorbidities? *J Mol Med (Berl)*. 2002; **80**(11): 696-702.
152. Kadowaki T, Yamauchi T. Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocrine reviews*. 2005; **26**(3): 439-51.
153. Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Tsuchida A, Yokomizo T, Kita S, et al. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature*. 2003; **423**(6941): 762-9.
154. Diez JJ, Iglesias P. The role of the novel adipocyte-derived hormone adiponectin in human disease. *Eur J Endocrinol*. 2003; **148**(3): 293-300.
155. Combs TP, Berg AH, Obici S, Scherer PE, Rossetti L. Endogenous glucose production is inhibited by the adipose-derived protein Acrp30. *The Journal of clinical investigation*. 2001; **108**(12): 1875-81.
156. Lyon CJ, Law RE, Hsueh WA. Minireview: adiposity, inflammation, and atherogenesis. *Endocrinology*. 2003; **144**(6): 2195-200.
157. Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Maeda K, Kuriyama H, Okamoto Y, et al. Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma protein adiponectin. *Circulation*. 1999; **100**(25): 2473-6.
158. Schulze MB, Shai I, Rimm EB, Li T, Rifai N, Hu FB. Adiponectin and future coronary heart disease events among men with type 2 diabetes. *Diabetes*. 2005; **54**(2): 534-9.
159. Shimada K, Miyazaki T, Daida H. Adiponectin and atherosclerotic disease. *Clin Chim Acta*. 2004; **344**(1-2): 1-12.
160. Curat CA, Wegner V, Sengenès C, Miranville A, Tonus C, Busse R, et al. Macrophages in human visceral adipose tissue: increased accumulation in obesity and a source of resistin and visfatin. *Diabetologia*. 2006; **49**(4): 744-7.

161. Silha JV, Krsek M, Skrha JV, Sucharda P, Nyomba BL, Murphy LJ. Plasma resistin, adiponectin and leptin levels in lean and obese subjects: correlations with insulin resistance. *Eur J Endocrinol.* 2003; **149**(4): 331-5.
162. Kusminski CM, McTernan PG, Kumar S. Role of resistin in obesity, insulin resistance and Type II diabetes. *Clin Sci (Lond).* 2005; **109**(3): 243-56.
163. Degawa-Yamauchi M, Bovenkerk JE, Juliar BE, Watson W, Kerr K, Jones R, et al. Serum resistin (FIZZ3) protein is increased in obese humans. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* 2003; **88**(11): 5452-5.
164. Heilbronn LK, Rood J, Janderova L, Albu JB, Kelley DE, Ravussin E, et al. Relationship between serum resistin concentrations and insulin resistance in nonobese, obese, and obese diabetic subjects. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* 2004; **89**(4): 1844-8.
165. Lee JH, Chan JL, Yiannakouris N, Kontogianni M, Estrada E, Seip R, et al. Circulating resistin levels are not associated with obesity or insulin resistance in humans and are not regulated by fasting or leptin administration: cross-sectional and interventional studies in normal, insulin-resistant, and diabetic subjects. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* 2003; **88**(10): 4848-56.
166. Kitani T, Okuno S, Fujisawa H. Growth phase-dependent changes in the subcellular localization of pre-B-cell colony-enhancing factor. *FEBS letters.* 2003; **544**(1-3): 74-8.
167. Samal B, Sun Y, Stearns G, Xie C, Suggs S, McNiece I. Cloning and characterization of the cDNA encoding a novel human pre-B-cell colony-enhancing factor. *Molecular and cellular biology.* 1994; **14**(2): 1431-7.
168. Fukuhara A, Matsuda M, Nishizawa M, Segawa K, Tanaka M, Kishimoto K, et al. Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin. *Science.* 2005; **307**(5708): 426-30.

169. Berndt J, Kloting N, Kralisch S, Kovacs P, Fasshauer M, Schon MR, et al. Plasma visfatin concentrations and fat depot-specific mRNA expression in humans. *Diabetes*. 2005; **54**(10): 2911-6.
170. Patel SD, Rajala MW, Rossetti L, Scherer PE, Shapiro L. Disulfide-dependent multimeric assembly of resistin family hormones. *Science*. 2004; **304**(5674): 1154-8.
171. Dahl TB, Yndestad A, Skjelland M, Oie E, Dahl A, Michelsen A, et al. Increased expression of visfatin in macrophages of human unstable carotid and coronary atherosclerosis: possible role in inflammation and plaque destabilization. *Circulation*. 2007; **115**(8): 972-80.
172. Lim SY, Davidson SM, Paramanathan AJ, Smith CC, Yellon DM, Hausenloy DJ. The novel adipocytokine visfatin exerts direct cardioprotective effects. *J Cell Mol Med*. 2008; **12**(4): 1395-403.
173. Dunstan DW, Zimmet PZ, Welborn TA, De Courten MP, Cameron AJ, Sicree RA, et al. The rising prevalence of diabetes and impaired glucose tolerance: the Australian Diabetes, Obesity and Lifestyle Study. *Diabetes Care*. 2002; **25**(5): 829-34.
174. Isomaa B, Almgren P, Tuomi T, Forsen B, Lahti K, Nissen M, et al. Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome. *Diabetes Care*. 2001; **24**(4): 683-9.
175. Whaley-Connell A, Sowers JR. Indices of obesity and cardiometabolic risk. *Hypertension*. 2011; **58**(6): 991-3.
176. Grundy SM, Cleeman JI, Daniels SR, Donato KA, Eckel RH, Franklin BA, et al. Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. *Circulation*. 2005; **112**(17): 2735-52.
177. Houser B. Bio-Rad's Bio-Plex(R) suspension array system, xMAP technology overview. *Arch Physiol Biochem*. 2012; **118**(4): 192-6.

178. Tighe P, Negm O, Todd I, Fairclough L. Utility, reliability and reproducibility of immunoassay multiplex kits. *Methods*. 2013; **61**(1): 23-9.
179. Eder K, Baffy N, Falus A, Fulop AK. The major inflammatory mediator interleukin-6 and obesity. *Inflamm Res*. 2009; **58**(11): 727-36.
180. Piche ME, Lemieux S, Weisnagel SJ, Corneau L, Nadeau A, Bergeron J. Relation of high-sensitivity C-reactive protein, interleukin-6, tumor necrosis factor-alpha, and fibrinogen to abdominal adipose tissue, blood pressure, and cholesterol and triglyceride levels in healthy postmenopausal women. *Am J Cardiol*. 2005; **96**(1): 92-7.
181. Tehrani DM, Gardin JM, Yanez D, Hirsch CH, Lloyd-Jones DM, Stein PK, et al. Impact of inflammatory biomarkers on relation of high density lipoprotein-cholesterol with incident coronary heart disease: cardiovascular Health Study. *Atherosclerosis*. 2013; **231**(2): 246-51.
182. Cartier A, Lemieux I, Almeras N, Tremblay A, Bergeron J, Despres JP. Visceral obesity and plasma glucose-insulin homeostasis: contributions of interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha in men. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2008; **93**(5): 1931-8.
183. Jiang CQ, Lam TH, Liu B, Lin JM, Yue XJ, Jin YL, et al. Interleukin-6 receptor gene polymorphism modulates interleukin-6 levels and the metabolic syndrome: GBCS-CVD. *Obesity (Silver Spring)*. 2010; **18**(10): 1969-74.
184. Blasi F, Vassalli JD, Dano K. Urokinase-type plasminogen activator: proenzyme, receptor, and inhibitors. *J Cell Biol*. 1987; **104**(4): 801-4.
185. Gyetko MR, Libre EA, Fuller JA, Chen GH, Toews G. Urokinase is required for T lymphocyte proliferation and activation in vitro. *J Lab Clin Med*. 1999; **133**(3): 274-88.
186. Blasi F, Carmeliet P. uPAR: a versatile signalling orchestrator. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002; **3**(12): 932-43.

187. Blasi F. uPA, uPAR, PAI-1: key intersection of proteolytic, adhesive and chemotactic highways? *Immunol Today*. 1997; **18**(9): 415-7.
188. Ossowski L, Aguirre-Ghiso JA. Urokinase receptor and integrin partnership: coordination of signaling for cell adhesion, migration and growth. *Curr Opin Cell Biol*. 2000; **12**(5): 613-20.
189. Vaughan DE. PAI-1 and cellular migration: dabbling in paradox. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002; **22**(10): 1522-3.
190. Buchwalter G, Gross C, Wasylyk B. The ternary complex factor Net regulates cell migration through inhibition of PAI-1 expression. *Molecular and cellular biology*. 2005; **25**(24): 10853-62.
191. Declerck PJ, Gils A. Three decades of research on plasminogen activator inhibitor-1: a multifaceted serpin. *Semin Thromb Hemost*. 2013; **39**(4): 356-64.
192. Goglia L, Tosi V, Sanchez AM, Flamini MI, Fu XD, Zullino S, et al. Endothelial regulation of eNOS, PAI-1 and t-PA by testosterone and dihydrotestosterone in vitro and in vivo. *Mol Hum Reprod*. 2010; **16**(10): 761-9.
193. San Miguel Hernandez A, Inglada-Galiana L, Garcia Iglesias R, Alonso Castillejos N, Martin Gil FJ. [Soluble CD40 ligand: a potential marker of cardiovascular risk]. *Rev Clin Esp*. 2007; **207**(8): 418-21.
194. Antoniades C, Bakogiannis C, Tousoulis D, Antonopoulos AS, Stefanadis C. The CD40/CD40 ligand system: linking inflammation with atherothrombosis. *J Am Coll Cardiol*. 2009; **54**(8): 669-77.
195. Palomo IG, Jaramillo JC, Alarcon ML, Gutierrez CL, Moore-Carrasco R, Segovia FM, et al. Increased concentrations of soluble vascular cell adhesion molecule-1 and soluble CD40L in subjects with metabolic syndrome. *Mol Med Rep*. 2009; **2**(3): 481-5.
196. Gustafson B. Adipose tissue, inflammation and atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb*. 2010; **17**(4): 332-41.

197. Onat A, Can G, Kaya H, Hergenc G. "Atherogenic index of plasma" (log₁₀ triglyceride/high-density lipoprotein-cholesterol) predicts high blood pressure, diabetes, and vascular events. *J Clin Lipidol.* 2010; **4**(2): 89-98.
198. Onat A. Metabolic syndrome: nature, therapeutic solutions and options. *Expert Opin Pharmacother.* 2011; **12**(12): 1887-900.
199. Onat A, Can G, Ornek E, Sansoy V, Aydin M, Yuksel H. Abdominal obesity with hypertriglyceridaemia, lipoprotein(a) and apolipoprotein A-I determine marked cardiometabolic risk. *Eur J Clin Invest.* 2013; **43**(11): 1129-39.
200. Perez-Lopez FR, Chedraui P, Haya J, Cuadros JL. Effects of the Mediterranean diet on longevity and age-related morbid conditions. *Maturitas.* 2009; **64**(2): 67-79.
201. Chedraui P, Perez-Lopez FR. Nutrition and health during mid-life: searching for solutions and meeting challenges for the aging population. *Climacteric.* 2013; **16 Suppl 1**: 85-95.

RINGRAZIAMENTI

Un ringraziamento particolare va al Prof. Tommaso Simoncini sia per avermi trasmesso la passione per la ricerca sia per tutti i suoi preziosi consigli e insegnamenti.

Grazie a tutti coloro che hanno lavorato e lavorano presso il Laboratorio di Endocrinologia Ginecologica Cellulare e Molecolare (Università di Pisa), in particolare alla Dott.ssa Magdalena Montt, Dott.ssa Stefania Spina, Dott.ssa Giulia Palla, Dott.ssa Guya Bernacchi per il loro aiuto e la loro amicizia.

Un pensiero a tutti i miei amici per aver condiviso con me, ognuno a suo modo, questi sei faticosi anni.

Una grazie sincero e affettuoso a tutta la mia famiglia:

A babbo per il suo sostegno silenzioso e per la stima che ripone in me,

A Giulia, perché se questo lavoro ha una forma decente è solo merito suo,

A Francesco per i suoi portafortuna e il suo dolce supporto,

A mamma, perché ciò che sono oggi è merito suo,

A Giacomo per il suo amore e per tutti i sogni che condividiamo,

A nonna Angela, perché mai come oggi l'avrei voluta qui con me.

Elena