

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI VERONA

DIPARTIMENTO DI MEDICINA E CHIRURGIA

SCUOLA DI DOTTORATO DI

SCIENZE DELLA VITA E DELLA SALUTE

DOTTORATO DI RICERCA IN

SCIENZE BIOMEDICHE CLINICHE E SPERIMENTALI

CICLO /ANNO (1° anno d'iscrizione): XXX CICLO (2014)

TITOLO DELLA TESI DI DOTTORATO

ASSOCIAZIONE FRA ELEVATI LIVELLI CIRCOLANTI DI CERAMIDI E SEVERITA' DELLA STENOSI CORONARICA IN UN CAMPIONE DI PAZIENTI SOTTOPOSTI AD ANGIOGRAFIA CORONARICA

S.S.D. MED/09 MEDICINA INTERNA

Coordinatore: Prof. GIOVANNI TARGHER

Tutori: Dott. GUIDO ARCARO

Prof. ZENO BISOFFI

Co-tutori Prof. PIETRO MINUZ

Prof. GIOVANNI TARGHER

Dottorando: Dott. STEFANO CALABRIA

Associazione fra elevati livelli circolanti di ceramidi e severità della stenosi coronarica in un campione di pazienti sottoposti ad angiografia coronarica;
Dott. Stefano Calabria; Tesi di Dottorato

I principali risultati di questa Tesi di Dottorato sono stati recentemente accettati per la loro pubblicazione su *Diabetes & Metabolism*:

Mantovani A, Bonapace S, Lunardi G, Canali G, Dugo C, Vinco G, Calabria S, Barbieri E, Laaksonen R, Bonnet F, Byrne CD, Targher G. Associations between specific plasma ceramides and severity of coronary-artery stenosis assessed by coronary angiography.

Diabetes Metab. Diabetes Metab. 2019 Aug 3. pii: S1262-3636(19)30118-1. doi: 10.1016/j.diabet.2019.07.006. [Epub ahead of print]

INDICE

● ABSTRACT	4
● SOMMARIO	5
● 1 INTRODUZIONE	6
1.1 Struttura delle ceramidi	6
1.2 Nomenclatura delle ceramidi	7
1.3 Produzione delle ceramidi	7
1.4 Meccanismo di azione degli sfingolipidi	9
1.5 Interazioni tra ceramidi ed altri fattori implicati nella malattia cardiovascolare	11
1.6 Ceramidi e cardiopatia ischemica	14
● 2 SCOPO DELLO STUDIO	19
● 3 MATERIALI E METODI	20
3.1 Pazienti	20
3.2 Dati clinici e di laboratorio	20
3.3 Misurazione delle ceramidi plasmatiche	21
3.4 Angiografia coronarica ed ecocardiografia	22
3.5 Analisi statistica	23
● 4 RISULTATI	25
● 5 DISCUSSIONE	28
● 6 BIBLIOGRAFIA	33
● 7 APPENDICE I. TABELLE	41
● 8 APPENDICE II. TABELLE SUPPLEMENTARI	54

ABSTRACT

Aims: Recent prospective studies have identified distinct plasma ceramides as strong predictors of adverse cardiovascular events in patients with established or suspected coronary artery disease (CAD). Currently, it is uncertain whether higher levels of distinct plasma ceramides are associated with a greater angiographic severity of coronary-artery stenoses in this patient population.

Methods: We measured six previously identified high-risk plasma ceramide species [Cer(d18:1/16:0), Cer(d18:1/18:0), Cer(d18:1/20:0), Cer(d18:1/22:0), Cer(d18:1/24:0) and Cer(d18:1/24:1)] in 167 patients with established or suspected CAD, who consecutively underwent urgent or elective coronary angiography.

Results: Approximately 77% of patients had a significant stenosis ($\geq 50\%$) in one or more of the main coronary arteries, the majority of whom ($\sim 60\%$) had a significant stenosis in the left anterior descending (LAD) artery. Of the six measured plasma ceramides, higher levels of plasma Cer(d18:1/20:0) (adjusted-odds ratio 1.39, 95%CI 1.0-1.99), Cer(d18:1/22:0) (adjusted-odds ratio 1.57, 95%CI 1.08-2.29) and Cer(d18:1/24:0) (adjusted-odds ratio 1.59, 95%CI 1.08-2.32) were significantly associated with the presence of LAD stenosis $\geq 50\%$, even after adjustment for age, sex, smoking, pre-existing CAD, hypertension, diabetes, dyslipidemia, estimated glomerular filtration rate, plasma C-reactive protein levels and use of lipid-lowering treatment. Almost identical results were found even after excluding patients ($n=15$) with acute ST-elevation myocardial infarction. Similar results were also found when patients were categorized according to the Gensini severity score.

Conclusion: Our cross-sectional study shows for the first time that higher levels of specific plasma ceramides are independently associated with a greater severity of coronary-artery stenoses in the LAD artery in patients who had suspected or established CAD.

SOMMARIO

Obiettivi: Recenti studi hanno identificato specifiche ceramidi plasmatiche come significativi predittori di futuri eventi cardiovascolari in pazienti con nota o sospetta cardiopatia ischemica. Attualmente non è ancora noto se livelli elevati di tali ceramidi plasmatiche siano anche associate ad una maggiore severità delle stenosi delle arterie coronarie in questa popolazione di pazienti.

Metodi: Abbiamo misurato i livelli di 6 ceramidi plasmatiche che sono state precedentemente associate ad alto rischio cardiovascolare [[Cer(d18:1/16:0), Cer(d18:1/18:0), Cer(d18:1/20:0), Cer(d18:1/22:0), Cer(d18:1/24:0) e Cer(d18:1/24:1)] in 167 pazienti con nota o sospetta cardiopatia ischemica, che sono stati sottoposti consecutivamente ad angiografia coronarica urgente od in elezione.

Risultati: Il 77% di tali pazienti presentava una stenosi significativa ($\geq 50\%$) in una o più delle arterie coronarie, la maggioranza dei quali ($\sim 60\%$) avevano una stenosi significativa a livello della arteria discendente anteriore (LAD). Delle 6 ceramidi misurate, livelli plasmatici più elevati di Cer(d18:1/20:0) (odds ratio aggiustato 1.39, 95%CI 1.0-1.99), Cer(d18:1/22:0) (odds ratio aggiustato 1.57, 95%CI 1.08-2.29) e Cer(d18:1/24:0) (odds ratio aggiustato 1.59, 95%CI 1.08-2.32) erano associati in maniera significativa con la presenza di stenosi a livello della LAD $\geq 50\%$, anche dopo aggiustamento per età, sesso, fumo, presenza di cardiopatia ischemica, ipertensione, diabete, dislipidemia, terapia ipolipemizzante, velocità di filtrazione glomerulare stimata e livelli circolanti di proteina C reattiva. Analoghi risultati sono stati osservati anche dopo avere escluso i pazienti ($n=15$) con infarto miocardico acuto con elevazione del tratto ST. Risultati simili sono stati anche evidenziati quando i pazienti sono stati classificati utilizzando lo score di severità angiografica proposto da Gensini.

Conclusioni: Questo studio trasversale dimostra per la prima volta che livelli più elevati di specifiche ceramidi plasmatiche sono associati in maniera indipendente con una maggiore severità delle stenosi coronariche a livello della LAD in una coorte di paziente che presentavano cardiopatia ischemica nota o sospetta.

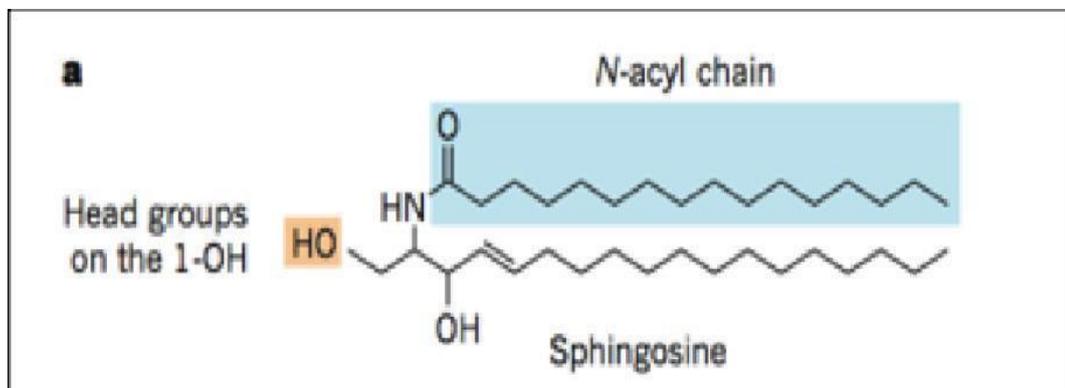
1. INTRODUZIONE

1.1 STRUTTURA DELLE CERAMIDI

Nel 1880, il chimico britannico Thudichum denominò alcuni lipidi situati nel tessuto cerebrale con il termine di "*sfiningosine*", richiamando così l'immagine della sfinge, considerata la natura biochimica apparentemente enigmatica di tali composti. Dal punto di vista biochimico, le sfiningosine sono grassi amino-alcoli che costituiscono la "spina dorsale" di una classe ubiquitaria di lipidi denominati sfingolipidi, di cui fanno parte le ceramidi (*N*-acil-sfiningosine), le sfingomieline e centinaia di altri glico-sfingolipidi.

In particolare, le ceramidi sono una famiglia di lipidi costituiti da una sfiningosina legata in maniera covalente ad un acido grasso, che è variabile per lunghezza e grado di saturazione, e ciò determina le differenze fra le singole ceramidi (Figura 1). In passato tali composti sono stati ritenuti dei semplici componenti strutturali di tutte le membrane cellulari. Negli ultimi 30-40 anni, invece, si è scoperto che tutti gli stimoli "stressogeni" dell'organismo (quali per esempio, stimoli infiammatori, calore, radiazioni U.V., ipossia, stress ossidativo ed uso di alcuni chemioterapici) sono virtualmente in grado di aumentare la produzione di ceramidi come parte di una risposta cellulare evolutivamente conservata^{1,2,3,4,5}.

Figura 1. Struttura base della ceramide con una "spina dorsale" costituita da una sfiningosina e da un acido grasso che è variabile per lunghezza e grado di saturazione (tratto da: Maceyka M et al. Nature. 2014; 51: 58-67)²⁵



1.2 NOMENCLATURA DELLE CERAMIDI

Nella maggior parte delle pubblicazioni scientifiche per identificare una ceramide viene utilizzata una nomenclatura che identifica separatamente la base sfingoide ed il gruppo acile. Ad esempio, la ceramide formata da una sfingosina ed un acido grasso saturo a 16 atomi di carbonio viene identificato come Cer(d18:1/16:0). Le basi sfingoidi hanno 18 atomi di carbonio e differiscono per il loro numero di doppi legami e di gruppi idrossile. Le principali basi sfingoidi sono la sfingosina, la sfinganina, la fitosfingosina e lo sfingadiene e sono indicate, nell'ordine, come d18:1, d18:0, t18:0 e d18:2. Il primo numero corrisponde agli atomi di carbonio, che è 18 per tutte, mentre il secondo indica il numero di doppi legami. Il prefisso *d* o *t* indica il numero di gruppi idrossile; in particolare, *d* indica la presenza di una idrossilazione in posizione 1 ed 3, mentre *t* indica una idrossilazione in posizione 1, 3 e 4. Il gruppo acile è invece identificato da due numeri: il primo indica il numero di atomi di carbonio, mentre il secondo indica il grado di saturazione. Negli esseri umani le ceramidi derivano soprattutto dalla sfingosina (d18:1), mentre nelle piante derivano dalla fito-sfingosina. Questo nostro studio fa unicamente riferimento alle ceramidi derivate dalla sfingosina e, di conseguenza, distingueremo le ceramidi, che abbiamo misurato, unicamente dal gruppo acile (ad esempio C16:0).

1.3 PRODUZIONE DELLE CERAMIDI

Come schematizzato in Figura 2, esistono tre principali vie di produzione delle ceramidi: sintesi *de novo*, sintesi mediante idrolisi della sfingomieline e sintesi mediante la cosiddetta “via di recupero”.

a) Sintesi de novo. Il percorso di sintesi meglio caratterizzato è la sintesi *de novo* della ceramide, che avviene a livello del foglietto citoplasmatico del reticolo endoplasmatico e che inizia con il trasferimento di un residuo di serina su un grasso acyl-CoA mediante la serina-palmitoyl-transferase (SPT) per formare 3-keto-sfinganina (3KSn), che rappresenta la spina dorsale di 18 atomi di carbonio su cui sono costruiti gli sfingolipidi più complessi. Tre reazioni enzimatiche

successive, catalizzate da 3-chetodiosfingosina reductasi (KDHR), diidroceramide-sintasi (CerS) e di-idroceramide desaturasi (Des 1 e 2), convertono questo prodotto intermedio in ceramide. La maggior parte degli enzimi coinvolti nella sintesi *de novo* delle ceramidi sono indotti da eventi infiammatori.

b) Sintesi mediante idrolisi della sfingomielina. La seconda via di sintesi in grado di generare ceramidi comporta l'idrolisi del gruppo di testa della fosfolina da sfingomielina da parte di una famiglia di sfingomielinasi (SMasi), che sono degli enzimi che si distinguono per il loro pH ottimale di attivazione e/o localizzazione intracellulare^{6,7}. Le sfingomielinasi umane sono distinte in tre principali categorie a seconda del pH ottimale a cui sono attive: sfingomielinasi acida (aSMase), neutra (nSMase) ed alcalina. La sfingomielinasi alcalina è espressa principalmente nell'intestino e nel fegato e serve alla digestione delle sfingomieline. La aSMase è presente principalmente nei lisosomi, metabolizza sfingomieline che sono presenti negli endosomi e può essere secreta nello spazio extra-cellulare agendo, ad esempio, sulle sfingomieline contenute nelle lipoproteine plasmatiche. Poiché la sfingomielina è lo sfingolipide più abbondante nei mammiferi, la sua capacità come fonte di ceramidi è enorme. Diversi stimoli nocivi sono in grado di attivare le SMasi, inclusi agenti patogeni, stress ossidativo e citochine pro-infiammatorie^{8,9}. Il conseguente accumulo di ceramide indotto dalla attivazione della SMasi si ritiene sia responsabile dell'apoptosi indotta da stress in una varietà di tipi cellulari¹⁰. Due citochine pro-infiammatorie, TNF-alfa e IL-1beta, sono specificatamente in grado di attivare la SMasi e inducono accumulo di ceramidi¹¹.

c) Sintesi mediante la "via di recupero" (salvage pathway). Le ceramidi possono essere prodotte indirettamente anche dal catabolismo di altri sfingolipidi complessi. Infatti, attraverso una serie di eventi denominati "via di recupero" sfingolipidico o "via di salvataggio", diversi sfingolipidi complessi, come sfingomielina e glicosfingolipidi vengono degradati da enzimi residenti all'interno del compartimento cellulare (SMasi e β glucosidasi acida) per formare ceramidi¹², che a loro volta sono degradate in sfingosina ed acidi grassi liberi, che sono così in grado di entrare nel citosol¹³. Una volta all'interno del citosol la sfingosina viene riconvertita a ceramide mediante l'attività enzimatica della ceramide sintasi.

Benchè la cosiddetta “*via di recupero*” sia ad oggi quella meno studiata a causa dell’esistenza di difficoltà tecniche ed analitiche per poterla analizzare, tale via è rappresentativa di più della metà dei fosfolipidi presenti all’interno della cellula¹⁴. Si stima, infatti, che la “*via di recupero*” contribuisca dal 50% al 80% della sintesi di nuovi sfingolipidi, suggerendo pertanto un ruolo centrale di questa via di sintesi nel turnover degli sfingolipidi e nella trasduzione del segnale cellulare attraverso le ceramidi.

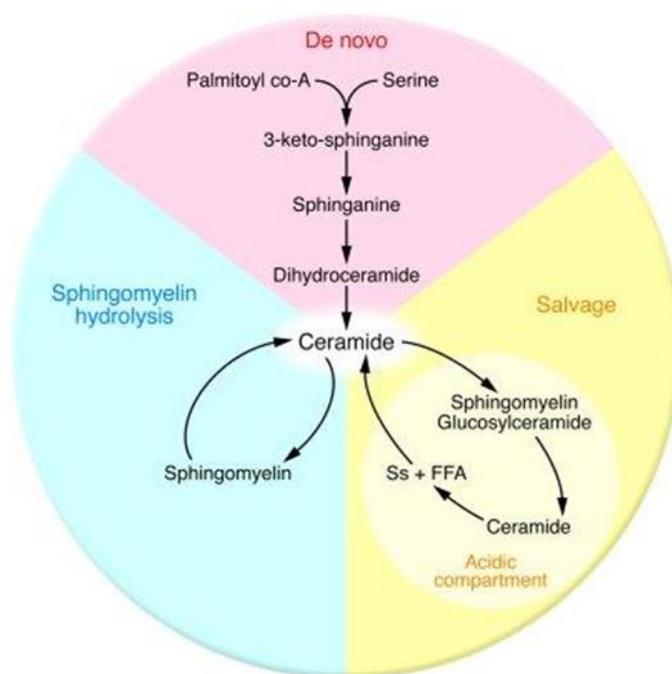


Figura 2. Principali vie di sintesi delle ceramidi (tratto da Bikman BT et al. J Clin Invest. 2011; 121: 4222-4230).

1.4 MECCANISMO DI AZIONE DEGLI SFINGOLIPIDI

Le ceramidi rappresentano uno degli sfingolipidi più importanti e servono come precursore di altri sfingolipidi biologicamente attivi, come la sfingosina (SPH) e la sfingosina 1-fosfato (S1P)¹⁵. Le sfingosino-chinasi (sfingosinochinasi tipo 1;

SK1 e sfingosinocinasasi tipo 2; SK2) sono in grado di fosforilare la sfingosina per generare S1P¹⁶. Essendo le ceramidi un precursore di S1P, qualsiasi alterazione dei livelli delle ceramidi è in grado di incrementare anche i livelli di S1P. Il principale meccanismo di azione degli sfingolipidi è l'attivazione di proteine enzimatiche come la protein-chinasi attivata da ceramide, la protein-fosfatasi attivata da ceramide, la protein-chinasi attivata da mitogeno e la protein-chinasi C-Jun-N-terminale¹⁷. Le ceramidi agiscono come secondi messaggeri, regolando diversi processi a livello cellulare come la crescita e la differenziazione cellulare, la proliferazione e l'apoptosi. Le ceramidi sono anche coinvolte nella regolazione di protein-chinasi C, raf -1, chinasi soppressore di Ras, proteasi cellulare catepsina D ed inibizione di fosfolipasi D^{18,19}.

S1P gioca un ruolo chiave nella proliferazione e crescita cellulare, nella migrazione cellulare, infiammazione, angiogenesi e resistenza alla apoptosi. L'effetto di S1P è mediato principalmente da recettori S1P connessi con differenti tipi di proteine G che derivano dalla attivazione di diverse vie di segnale intracellulare¹⁸. L'apoptosi cellulare e le risposte agli stress sono strettamente associate con le ceramidi. Diversi fattori tra cui agenti infettivi (*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Rhinovirus*) ma anche radiazioni UV ed alcuni chemioterapici sono in grado di attivare le SMasi. Alcuni di questi fattori stimolano una translocazione di SMasi sul foglietto esterno della membrana cellulare, portando al rilascio di ceramidi ed alla formazione di 'domini' di membrana ricchi di ceramidi. Questi 'domini' di membrana servono a raggruppare i recettori di membrana per amplificare la via di segnale che è richiesta nell'induzione dell'apoptosi. Alcuni studi sperimentali suggeriscono che la relazione tra sfingolipidi e apoptosi può essere importante anche nella patogenesi di alcune malattie croniche come il diabete mellito, lo stroke ischemico e l'infarto miocardico^{20,21,22}. Infatti, gli aggregati lipoproteici che sono stati isolati dalle lesioni aterosclerotiche umane sono particolarmente ricchi di ceramidi. Inoltre, in un modello animale di aterosclerosi il trattamento con miocrina, che è un inibitore specifico della serina-palmitoyl-transferasi, induce un profilo lipoproteico maggiormente protettivo. Tuttavia, i meccanismi che legano sfingolipidi, lipoproteine ed aterosclerosi devono essere ancora chiariti²³. Il ruolo

importante degli sfingolipidi nella patogenesi delle malattie croniche correlate allo stile di vite potrebbe essere inoltre il risultato (almeno in parte) di una influenza di tali molecole sul sistema immunitario. Studi sperimentali hanno dimostrato un possibile coinvolgimento degli sfingolipidi nel *trafficking* e nella regolazione dei processi delle cellule immunitarie come l'apoptosi dei linfociti T, la variazione del bilancio di Th1 e Th2, la fagocitosi, l'infiammazione e la suscettibilità all'allergia. Alcuni studi sperimentali hanno inoltre suggerito che l'infiammazione sarebbe in grado di alterare il metabolismo degli sfingolipidi e l'attività dei recettori per S1P^{24,25}.

1.5 INTERAZIONI TRA CERAMIDI ED ALTRI FATTORI IMPLICATI NELLA MALATTIA CARDIOVASCOLARE

Ceramidi e sistema renina-angiotensina-aldosterone. Alcuni studi *in vitro* hanno esaminato il rapporto esistente tra ceramidi ed il sistema renina-angiotensina-aldosterone. Studi eseguiti su cellule di feocromocitoma di ratto PC12W hanno dimostrato che l'attivazione del recettore tipo 2 per angiotensina II causa l'aumento dei livelli intracellulari di ceramide con conseguente aumento dell'apoptosi. Le ceramidi potrebbero pertanto giocare un ruolo importante nella inibizione della crescita indotta dal recettore tipo 2 dell'angiotensina II e nell'induzione della apoptosi nei tessuti cardiaci e vascolari²⁶.

Relazioni delle ceramidi con trombossano e ossido nitrico. Sono state documentate delle possibili relazioni tra ceramidi con il trombossano sierico e l'ossido nitrico. Esperimenti *in vitro* eseguiti su arterie carotidiche isolate da ratti ipertesi hanno dimostrato una significativa contrazione dei vasi dopo l'applicazione di sfingomielinasi ed inibitori di sfingosina chinasi. Al contrario, tali effetti vasocostrittivi non sono stati osservati in arterie isolate da ratti normotesi²⁷. Sulla base di tali evidenze è stato pertanto suggerito che le ceramidi possano contribuire alla contrazione di arterie isolate, aumentando il rilascio di trombossano da parte dell'endotelio. S1P causa sia vasocostrizione che vasodilatazione a seconda del tipo di recettori attivati. S1P induce una

vasodilatazione dipendente dalla ossido-nitrico-sintasi endoteliale in arteriole mesenteriche sia di ratto che di topo già vaso-costrette da epinefrina. Alcuni studi hanno dimostrato che l'attivazione della ossido-nitrico-sintasi può essere modulata dal recettore S1P1. S1P è in grado di indurre vasocostrizione nelle arterie basilari sia di topi *wild-type* che *knockout* per S1P2. E' verosimile ipotizzare che tale vasocostrizione sia principalmente mediata dalla attivazione del sottotipo S1P3, dato che l'attività vasocostrittrice di S1P veniva persa in animali *knockout* per S1P3²⁸.

Ceramide e piastrine. Le piastrine sono molto importanti per l'emostasi primaria dopo un danno vascolare acuto e sono elementi cardine nello sviluppo dell'occlusione trombotica acuta e nel successivo svilupparsi di infarto miocardico acuto e stroke ischemico^{29,30}. Dopo la loro attivazione le piastrine secernono i loro granuli e vengono sottoposte a *scrambling* della membrana cellulare con esposizione di fosfatidil-serina, andando incontro ad aggregazione e formazione di trombo³¹. In altri tipi cellulari lo *scrambling* della membrana cellulare³² e la degranolazione sono modificate dalla sfingomielinasi acida che produce ceramidi³³. La sfingomielinasi "rompe" la sfingomielina di membrana con produzione di ceramidi, che svolgono un ruolo importante nel *signalling* lipidico di diverse malattie cardiovascolari inducendo infiammazione sistemica³⁴. Uno studio³⁵, che è stato condotto per verificare se la sfingomielinasi acida partecipi nella regolazione ceramide-dipendente delle proprietà di membrana delle piastrine e della loro attività procoagulante, ha documentato che la sfingomielinasi acida gioca un ruolo decisivo nella secrezione piastrinica, nella esposizione di fosfatidilserina e nella generazione di trombina. La sfingomielinasi acida pertanto partecipa nei vari meccanismi di *signalling* che sono coinvolti nella adesione piastrinica e formazione del trombo arterioso in vivo. Al contrario, il trattamento con un inibitore funzionale della sfingomielinasi acida (amitriptilina o fluoxetina) era in grado di ridurre la degranolazione piastrinica, l'esposizione di fosfatidilserina e la formazione del trombo. Questo studio identifica, pertanto, una nuova via di segnale che è potenzialmente coinvolta nella regolazione delle proprietà e funzioni delle membrane piastriniche. Questa via di segnale potrebbe rappresentare quindi un potenziale *target* di trattamenti terapeutici nella

prevenzione e trattamento dell'occlusione vascolare trombotica acuta, che è alla base dell'infarto miocardio acuto e dello stroke ischemico. Peraltro, è già stato precedentemente dimostrato³⁶ che la ceramide C6 è in grado di mantenere elevati livelli di calcio nelle piastrine attivate e che la ceramide C6 nelle membrane piastriniche induce la traslocazione calcio-dipendente della fosfolipasi A2 dal citosol alle membrane, probabilmente attraverso la modificazione dei fosfolipidi di membrana³⁷.

Ceramidi e infiammazione. Durante la difesa ospite-patogeno, i recettori *pattern recognition*, inclusi i recettori Toll-like (TLR) ed i recettori *Nod-like* (NLR) (che sono espressi principalmente da macrofagi e cellule dendritiche) legano i prodotti microbici per attivare la risposta immunitaria innata e l'immunità adattativa primaria. L'analisi di recenti dati di sfingolipidomica e trascrittomica dei macrofagi che sono stati trattati con lipopolisaccaride (il principale ligando di TLR4), ha rivelato che numerosi enzimi, che sono coinvolti nel metabolismo degli sfingolipidi e delle ceramidi, sono attivati nella risposta immunitaria innata e nell'immunità adattativa primaria^{25,38,39}.

Sono state proposte diverse ipotesi per spiegare come le ceramidi leghino TLR4. Nei macrofagi è richiesta una maggiore biosintesi delle ceramidi de novo per la formazione di autofagosomi³⁹, che si ritiene abbiano un ruolo chiave nell'immunità innata⁴⁰. Un aspetto ancora in corso di chiarimento è quello concernente il fatto se i cambiamenti determinatisi nell'autofagia, indotti dalle ceramidi, possano direttamente contribuire all'attivazione dell'immunità e/o allo sviluppo di infiammazione. Sperimentalmente è stato dimostrato che la rottura dei micro-domini di membrana nei topi *knockout* per *Cers2*, che non sono quindi in grado di produrre ceramidi a catena molto lunga, impedisce l'internalizzazione del TNF-R1 e la conseguente attivazione delle vie di *signalling* a valle⁴¹.

Un'altra area di ricerca che ha ricevuto recentemente attenzione è la possibile connessione tra infiammazione subclinica e la patogenesi dell'obesità e della disfunzione metabolica associata^{42,43}. Un legame recentemente scoperto tra aumento dell'infiammazione ed obesità è l'attivazione di TLR4 da parte degli acidi grassi saturi, che porta all'attivazione trascrizionale di diversi geni coinvolti nella

sintesi delle ceramidi, compresi quelli che codificano per SPT e specifiche isoforme CerS⁴⁴. E' inoltre interessante il fatto che veniva richiesta un'elevata produzione di ceramidi per l'insulino-resistenza TLR4-dipendente, dovuta all'inibizione di Akt⁴⁴, la cui attivazione è necessaria per il trasporto del glucosio insulino-stimolato⁴⁵. Allo stesso modo, i topi *knockout* per CerS2 mostrano una alterata tolleranza glucidica a causa dell'incapacità di traslocazione sulla membrana del recettore dell'insulina, impedendo così l'attivazione di Akt⁴⁶. Nel loro insieme, questi recenti studi sperimentali suggeriscono che le ceramidi siano un mediatore che collega le vie infiammatorie indotte dai lipidi con l'insulino-resistenza. L'inflammasoma NLRP3 (*Nod like receptor P3*), membro della famiglia NLR, viene attivato da diversi fattori-DAMP (*danger-associated molecular patterns*) di tipo non microbico derivati da cellule danneggiate ed è in grado di indurre infiammazione, aumentando la secrezione di IL-1 β e IL-18. Nei topi obesi, è stato dimostrato che l'aumento delle ceramidi indotto dalla lipotossicità aumentava l'attività della caspasi-1 in maniera dipendente dall'inflammasoma NLRP3, sia nei macrofagi che nel tessuto adiposo⁴⁷. Ciò dimostra che le ceramidi sono in grado di attivare l'inflammasoma portando alla scissione della caspasi-1^{47,48}. Inoltre, l'aumento legato all'età delle ceramidi timiche porta anche all'attivazione della caspasi-1 in maniera dipendente dall'inflammasoma NLRP3, suggerendo che questa forma di incremento delle ceramidi possa essere responsabile del collasso del microambiente delle cellule stromali timiche con conseguente ridotta produzione di linfociti T *naive* e possibile riduzione della sorveglianza immunitaria con l'avanzare dell'età⁴⁹.

1.6 CERAMIDI E CARDIOPATIA ISCHEMICA

La cardiopatia ischemica rappresenta attualmente una delle principali cause di morbidità e mortalità nel mondo⁵⁰. E' noto che il colesterolo totale e le lipoproteine a bassa densità (LDL-C) plasmatiche sono associate in maniera significativa con l'aterosclerosi e le sue principali manifestazioni cliniche (come la sindrome coronarica acuta) e, nell'ambito clinico, sono pertanto utilizzate ormai da anni per la stratificazione del rischio cardiovascolare globale di un paziente⁵¹.

Tuttavia, è altresì noto che i livelli circolanti di colesterolo totale e colesterolo LDL-C da soli non sono in grado di identificare una proporzione sostanziale di pazienti ad alto rischio cardiovascolare. Per esempio, in uno studio su pazienti ospedalizzati con cardiopatia ischemica, quasi la metà di tali pazienti presentava, al momento del ricovero, dei valori di colesterolo LDL inferiori a 100 mg/dl mentre meno di un quarto aveva valori di colesterolo LDL maggiori di 130 mg/dl⁵². Da questo ed altri studi è quindi emersa la necessità di comprendere meglio il ruolo di differenti specie lipidiche nell'aterosclerosi, al di là dei valori di colesterolo totale, LDL, HDL e trigliceridi.

Nel 2011 uno studio⁵³ aveva analizzato (mediante tecnica di ionizzazione-elettrospray in tandem con spettrometria di massa) il *lipidoma* plasmatico, misurando >300 specie lipidiche circolanti in 220 individui (controlli sani n=80, pazienti con angina stabile n=60, pazienti con angina instabile/sindrome coronarica acuta n=80). Questo studio ha individuato differenze nel *lipidoma* plasmatico tra pazienti affetti da arteriopatia coronarica instabile e stabile ed anche tra paziente affetti da arteriopatia coronarica stabili e soggetti di controllo. Tra i lipidi analizzati in questo studio vi erano anche alcune ceramidi a lunga catena (Cer20:3 e Cer20:4), che sono risultate essere significativamente associate ad arteriopatia coronarica stabile. Un altro studio nel 2011⁵⁴ ha analizzato come i livelli di sfingosina 1 fosfato (S1P) ed altri sfingolipidi in siero umano contenente HDL correlassero con il rischio di cardiopatia ischemica. In particolare, per svolgere questo studio è stata usata una cromatografia liquida associata a spettrometria di massa per misurare i livelli di S1P in frazioni di siero contenenti HDL (e deplete di LDL e VLDL) che sono state prelevate da 204 soggetti del *Copenhagen City Heart Study*. Questo gruppo di individui era costituito da sia soggetti che avevano elevati livelli di HDL e cardiopatia ischemica, sia da soggetti con bassi livelli di HDL-C ma che non presentavano cardiopatia ischemica. Tale studio ha dimostrato la presenza di una significativa associazione tra ridotti livelli di S1P nelle frazioni di siero contenenti HDL ed aumentato rischio di cardiopatia ischemica. E' stata, inoltre, osservata una associazione inversa con la cardiopatia ischemica per altri due sfingolipidi, la deidro-sfingosina 1 fosfato e la ceramide C24:1. Lo studio ha infine dimostrato che la quantità di

S1P presente nelle HDL correlava con la quota di signalling indotto dalle HDL a livello della barriera della cellula endoteliale. Questo studio pertanto suggerisce che le differenze nella composizione degli sfingolipidi delle frazioni di siero contenenti HDL possono essere correlate con lo sviluppo di cardiopatia ischemica e possono contribuire a spiegare il ruolo protettivo svolto dalle HDL nella cardiopatia ischemica.

Nel 2014 è stato pubblicato uno studio⁵⁵ nel quale è stato prelevato il siero di 445 soggetti con cardiopatia ischemica che avevano partecipato allo studio *Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health* (LURIC), oltre al siero di pazienti partecipanti ad un trial clinico randomizzato che erano stati trattati con simvastatina (n=24), ezetimibe (n=24) od entrambi i farmaci (n=24). Nel siero dei soggetti partecipanti allo studio LURIC è stata anche valutata la presenza di della mutazione con perdita di funzione (R46L) del gene PCSK9 (n=19). Da tale studio è emerso che elevati livelli circolanti di tre distinte ceramide [cioè Cer(d18:1/16:0)/Cer(d18:1/24:0), Cer(d18:1/20:0)/Cer(d18:1/24:0) e Cer(d18:1/24:0)/Cer(d18:1/24:1) e specialmente il loro rapporto con la Cer(d18:1/24:0), erano significativamente associati con un aumentato rischio di cardiopatia ischemica fatale. La simvastatina riduceva di circa il 25% il livello circolante di tali ceramidi mentre non si osservavano variazioni nei livelli delle ceramidi nei soggetti trattati con ezetimibe. La deficienza del gene PCSK9 risultava inoltre associata ad una significativa riduzione dei livelli circolanti di LDL-C e delle ceramidi e ad un ridotto rischio di sviluppare cardiopatia ischemica.

Successivamente nel 2016⁵⁶ è stato svolto uno studio mirato a valutare il ruolo prognostico di diverse ceramidi plasmatiche [Cer(d18:1/16:0), Cer(d18:1/18:0), Cer(d18:1/24:0) e Cer(d18:1/24:1)] nel rischio di morte cardiovascolare, utilizzando tre coorti indipendenti di pazienti con arteriopatia coronarica. In particolare, lo studio Corogene è uno studio prospettico finlandese che include pazienti con arteriopatia coronarica stabile (n=160); lo studio di coorte prospettico SPUM-ACS (*Special Program University Medicine—Inflammation in Acute Coronary Syndromes*) (n=1637) condotto in 4 ospedali e lo studio di coorte

prospettico norvegese BECAC (*Bergen Coronary Angiography Cohort*) che era costituito da pazienti con arteriopatia coronarica stabile. Elevati livelli plasmatici delle ceramidi sovra-riportate, specie quando venivano misurate in rapporto con Cer(d18:1/24:0), sono risultate associate in maniera significativa con un aumentato rischio di morte cardiovascolare in tutti e tre le coorti di pazienti, indipendentemente dai fattori di rischio cardiovascolare tradizionale e dai livelli di proteina C reattiva. Tale studio fornisce pertanto una chiara evidenza che distinte ceramidi plasmatiche sono dei predittori di morte cardiovascolare al di là dei classici parametri lipidici in pazienti con arteriopatia coronarica stabile e/o con sindrome coronarica acuta. È importante sottolineare il fatto che tale capacità predittiva è risultata significativa anche in pazienti che erano già in trattamento con statine. In questo studio le ceramidi a lunga catena (Cer(d18:1/16:0) e Cer(d18:1/18:0)) dimostravano un potere prognostico maggiore rispetto a quelle a catena molto lunga (Cer(d18:1/24:0)). A tale riguardo, in letteratura stanno infatti progressivamente aumentando le evidenze che suggeriscono una variabilità di funzioni delle varie ceramidi in relazione alla lunghezza di catena delle ceramidi stesse. Per esempio, uno studio sperimentale ha, di recente, suggerito che l'aumento relativo in ceramidi a lunga catena (C16), ma non quello in ceramidi a catena molto lunga (C24-24:1), è associato a peggiore insulino-resistenza nei topi⁵⁷. Nel *Caenorhabditis elegans* le ceramidi a lunga catena sono pro-apoptotiche, mentre quelle a catena molto lunga sembrano esercitare una attività anti-apoptotica⁵⁸.

Nel 2018 il nostro gruppo⁵⁹ si è posto lo scopo di indagare se aumentati livelli circolanti di specifiche ceramidi (che erano state associate ad aumentato rischio di eventi cardiovascolari in altri precedenti studi) fossero associati alla presenza di ischemia miocardica inducibile durante scintigrafia miocardica da sforzo. In tale studio sono state quindi misurate sei ceramidi plasmatiche [Cer(d18:1/16:0), Cer(d18:1/18:0), Cer(d18:1/20:0), Cer(d18:1/22:0), Cer(d18:1/24:0) e Cer(d18:1/24:1)] in 167 pazienti con nota o sospetta cardiopatia ischemica, che sono stati consecutivamente sottoposti a scintigrafia miocardica di perfusione sotto stress da esercizio fisico o dopo infusione di dipiridamolo per varie indicazioni cliniche. Le ceramidi plasmatiche erano misurate con cromatografia

liquida in tandem con spettrometria di massa, sia in condizioni basali che dopo scintigrafia miocardica. Complessivamente 78 pazienti presentavano una ischemia miocardica inducibile in corso di scintigrafia miocardica. Delle 6 ceramidi plasmatiche misurate, i livelli basali della ceramide Cer(d18:1/24:1) mostravano la più forte associazione con la presenza di difetti di perfusione miocardica acuta (odds ratio 1.48, 95% intervallo di confidenza 1.08–2.04). Dopo aggiustamento per età, sesso, fumo, dislipidemia, ipertensione, diabete, precedente storia di cardiopatia ischemica, frazione di eiezione ventricolare sinistra e tipologia di stress (esercizio fisico vs. dipiridamolo e.v.) tutte le ceramidi misurate, eccetto la Cer(d18:1/24:0), sono risultate essere associate in modo indipendente con la presenza di ischemia miocardica acuta inducibile. Pertanto, da questo nostro recente studio emerge chiaramente che elevati livelli basali di distinte ceramidi plasmatiche sono dei predittori indipendenti di ischemia miocardica acuta inducibile in pazienti con cardiopatia coronarica nota o sospetta.

2. SCOPO DELLO STUDIO

L'ipotesi di ricerca che ha condotto a questo studio è che vi possa essere una relazione significativa tra aumentati livelli circolanti di distinte ceramidi e la severità delle stenosi coronariche documentate in corso di angiografia coronarica. Al momento attuale, infatti, non sono disponibili in letteratura delle evidenze conclusive riguardo l'esistenza di una significativa associazione tra elevati livelli circolanti di specifiche ceramidi e maggiore severità delle stenosi coronariche in pazienti con coronaropatia nota o sospetta^{60,61}.

Pertanto, lo scopo principale di questo studio osservazionale è di verificare se esista una associazione significativa tra i livelli circolanti di sei ceramidi plasmatiche (che sono state precedentemente associate ad un aumentato rischio cardiovascolare) e la severità della stenosi coronarica in una coorte di paziente con sospetta coronaropatia, che sono stati consecutivamente sottoposti ad angiografia coronarica per diverse indicazioni cliniche.

3 MATERIALI E METODI

3.1 PAZIENTI

Sono stati arruolati in maniera consecutiva tutti i pazienti che venivano sottoposti ad angiografia coronarica, in elezione od in urgenza, per varie indicazioni cliniche (come per esempio, dolore toracico, dispnea, alterazioni ischemiche elettrocardiografiche e presenza di anomalie ecocardiografiche sospette) presso l'Unità Operativa di Cardiologia dell' IRCCS Sacro Cuore - Ospedale di Negrar (VR) nel periodo compreso tra aprile 2017 e gennaio 2018. I pazienti con una precedente anamnesi di neoplasia, cirrosi scompensata ed insufficienza renale terminale sono stati esclusi dallo studio ($n=21$, vale a dire patologie che potrebbero alterare i livelli delle ceramidi plasmatiche indipendentemente dalla presenza di coronaropatia)^{62,25}.

Il protocollo dello studio è stato approvato dal Comitato etico locale ed è stato ottenuto il consenso informato da parte di tutti i soggetti partecipanti allo studio.

3.2 DATI CLINICI E DI LABORATORIO

L'indice di massa corporea (BMI) è stato misurato in chilogrammi divisi per il quadrato dell'altezza misurata in metri. I pazienti venivano considerati ipertesi se la loro pressione sanguigna era $\geq 140/90$ mmHg o se erano in trattamento con qualsiasi farmaco anti-ipertensivo. In tutti i pazienti sono state raccolte informazioni riguardo la storia di fumo e l'attuale uso di farmaci.

Il prelievo di sangue venoso è stato eseguito la mattina dopo il digiuno notturno. La creatinina, i lipidi, la troponina e gli altri parametri biochimici sono stati determinati utilizzando procedure di laboratorio standard presso il Laboratorio centrale di analisi dell'Ospedale. La concentrazione di proteina C plasmatica ad elevata sensibilità (hs-CRP) è stata misurata mediante il sistema Beckman Coulter Image Immunochemistry System. Il colesterolo LDL è stato determinato utilizzando l'equazione di Friedewald. La velocità di filtrazione glomerulare

renale (e-GFR) è stata stimata utilizzando l'equazione proposta dallo studio MDRD (Modification of Diet in Renal Disease)⁶³.

La presenza di coronaropatia è stata definita come una precedente storia clinica di infarto miocardico acuto, angina pectoris o pregresse procedure di rivascularizzazione coronarica. La diagnosi di fibrillazione atriale permanente è stata formulata sulla base della storia clinica (rivedendo i referti medici e ospedalieri) e sulla base di ECG standard. La storia precedente di malattie valvolari cardiache è stata confermata rivedendo i referti medici dell'ospedale e degli ecocardiogrammi. La presenza di diabete era definita dalla diagnosi medica di diabete riportata dal paziente o dall'uso di farmaci ipoglicemizzanti (insulina o antidiabetici orali). La dislipidemia era definita da livelli di colesterolo LDL-C \geq 100 mg/dl e/o dall'uso di farmaci ipolipidemizzanti. La malattia renale cronica (CKD, chronic kidney disease) è stata definita dalla presenza di $e\text{-GFR}_{\text{MDRD}} < 60$ mL/min/1.73 m² ⁶³.

3.3 MISURAZIONE DELLE CERAMIDI PLASMATICHE

Il prelievo di sangue per la misurazione delle ceramidi è stato eseguito in provette contenenti EDTA immediatamente prima della esecuzione dell'angiografia coronarica. Il plasma veniva conservato a temperatura di -80°C fino alla analisi. Un tecnico esperto di laboratorio, che non era a conoscenza dei dati clinici dei partecipanti, ha eseguito tutte le misurazioni delle ceramidi plasmatiche in un'unica sessione. Gli standard delle ceramidi sono stati acquistati da Avanti Polar Lipids Inc. (Alabaster, Alabama, USA). Le concentrazioni plasmatiche di Cer(d18:1/16:0), Cer(d18:1/18:0), Cer(d18:1/20:0), Cer(d18:1/22:0), Cer(d18:1/24:0) e Cer(d18:1/24:1) sono state misurate con estrazione liquido-liquido con 2-propanol:etil acetato (4:1 v/v) in cromatografia a gradiente di fase inversa su colonna Agilent Poroshell 120 C18 column (4.6x50mm, 2.7 μm)^{59,64}. E' stata utilizzata come standard interno la Cer(d18:1/17:0). L'apparato di misurazione era costituito da un sistema Agilent 1290 UHPLC (*ultra-high-performance liquid chromatography*) accoppiato con un sistema a cromatografia

liquida/spettrometria di massa (LC/MS) Agilent 6495 *Triple Quadrupole liquid chromatography/mass spectrometry* (LC/MS). La fase mobile era costituita da acqua di qualità in LC-MS (A), acetonitrile con 0.1% di acido formico (B) e 10 mM di acetato di ammonio in 2-propanolo (C). È stata selezionata la transizione $[M+H]^+ \rightarrow 264$ MRM (*multiple reaction monitoring*) per quantificare ogni ceramide. Gli standard di calibrazione (sei punti) sono stati preparati ogni giorno in una matrice surrogata (5% di albumina sierica bovina) a concentrazioni che variavano da 1.0 a 0.031 $\mu\text{M/L}$ per Cer(d18:1/16:0), Cer(d18:1/18:0) e Cer(d18:1/20:0) e da 10 a 0.31 $\mu\text{M/L}$ per Cer(d18:1/22:0), Cer(d18:1/24:0) e Cer(d18:1/24:1), rispettivamente. I coefficienti di regressione lineare erano $R^2 > 0.99$ per tutte le ceramidi. I coefficienti di variazione, sia intra-assay ed inter-assay, erano $< 15\%$ per tutte le ceramidi misurate⁵⁹. Non è stata osservata alcuna interferenza della matrice.

3.4 ANGIOGRAFIA CORONARICA ED ECOCARDIOGRAFIA

In tutti i pazienti è stata eseguita una angiografia coronarica da due cardiologi esperti, che non erano a conoscenza dei dettagli clinici e biochimici dei partecipanti. Il grado di stenosi coronarica del ramo principale sinistro, della discendente anteriore (LAD), dell'arteria circonflessa sinistra (LCX) e della coronaria destra (RCA) è stato determinato sulla base di metodiche standard⁶⁵. La coronaropatia è stata definita come "significativa" in presenza di una stenosi $\geq 50\%$ in una o più delle arterie coronarie⁶⁵. La severità angiografica delle stenosi coronariche è stata calcolata anche utilizzando lo score di Gensini⁶⁶. Dopo la procedura angiografica sono state eseguite, in base all'indicazione clinica, la terapia medica e/o l'intervento di rivascolarizzazione per via percutanea oppure è stata posta indicazione ad intervento cardiocirurgico di bypass aorto-coronarico. In un sottogruppo di pazienti ($n=122$, 73% del totale) è stata eseguita una ecocardiografia trans-toracica (Vivid 7, GE Vingmed, Horten, Norway) per misurare i diametri del ventricolo sinistro, lo spessore della parete e la massa ventricolare sinistra in accordo a criteri diagnostici standard. Sono stati anche

misurati i volumi ventricolari sinistri diastolico e sistolico e la frazione di eiezione a riposo dalla proiezione apicale 4 camere e 2 camere.

3.5 ANALISI STATISTICA

I dati sono stati espressi come media \pm SD, mediana (range inter-quartile, IQR) o percentuali. E' stata utilizzata una analisi di regressione lineare per testare le associazioni indipendenti tra ciascuna ceramide plasmatica (inclusa come variabile continua, vale a dire, per ogni incremento di 1 SD) e la severità della stenosi coronarica che rappresentava la misura di outcome (inclusa anch'essa nel modello statistico come variabile continua), dopo aggiustamento per molteplici fattori di rischio cardiovascolare. In particolare, abbiamo utilizzato due modelli di regressione lineare multipla: il primo modello è stato aggiustato per età e sesso (modello 1) mentre il secondo modello è stato ulteriormente aggiustato per fumo, pregressa storia di malattia cardiaca coronarica, dislipidemia (definita come colesterolo LDL \geq 100 mg/dl o uso di farmaci ipolipemizzanti), ipertensione (PA \geq 140/90 mmHg o uso di farmaci antiipertensivi), diabete, e-GFR e livelli di hs-PCR (modello 2). Queste covariate sono state selezionate come potenziali fattori confondenti in base alla loro significatività statistica nelle analisi univariate o in base alla loro plausibilità biologica. Con l'analisi di regressione logistica abbiamo successivamente testato l'esistenza di una associazione statistica tra ciascuna ceramide e la presenza di stenosi \geq 50% della arteria coronaria discendente anteriore (inclusa nel modello come variabile categorica) dopo aggiustamento per le stesse covariate sopramenzionate. In questi modelli di regressione è stato eseguito anche un aggiustamento per test a confronti multipli, utilizzando il metodo di Benjamini-Hochberg⁶⁷. Infine, tutti i modelli di regressione sopramenzionati sono stati ripetuti sia utilizzando lo *score* di Gensini, che è un altro metodo ampiamente utilizzato per determinare la severità angiografica delle stenosi coronariche⁶⁶, sia dopo aver escluso il sottogruppo di pazienti con infarto miocardico acuto con elevazione del tratto ST (STEMI; $n=15$), nei quali la

determinazione della stenosi coronarica potrebbe risultare meno accurata data la presenza di un trombo all'interno della arteria coronaria. E' stato considerato come statisticamente significativo un valore di $p < 0.05$. L'analisi statistica è stata eseguita mediante il software STATA, versione 14.2 (STATA, College Station, Texas, USA).

4. RISULTATI

In totale, sono stati arruolati nello studio 167 pazienti (123 uomini e 44 donne) affetti da cardiopatia ischemica sospetta o nota, che sono stati consecutivamente sottoposti ad angiografia coronarica elettiva od in urgenza nel periodo compreso tra aprile 2017 e gennaio 2018.

Le principali caratteristiche cliniche, biochimiche ed i dati angiografici coronarici di questi pazienti sono elencati nella Tabella 1 e Tabella 2. Complessivamente, i pazienti avevano una età media di 69 anni ed erano in predominanza uomini (73.6%) e in sovrappeso corporeo (BMI medio 26.3 kg/m²). Inoltre, il 34.1 % di questi pazienti avevano una precedente storia di cardiopatia ischemica, l'84.4% aveva dislipidemia, il 77.2% aveva ipertensione ed il 21% aveva un diabete noto (la maggior parte dei quali era trattato con ipoglicemizzanti orali). Tra questi pazienti, 30 pazienti (18%) sono stati sottoposti ad angiografia coronarica urgente per infarto miocardico STEMI (n=15) o per infarto miocardico non-STEMI, mentre i rimanenti 137 (82%) pazienti sono stati sottoposti ad angiografia coronarica elettiva (non urgente). Come mostrato in Tabella 2 una stenosi di almeno il 50% in una o più delle arterie coronarie è stata rilevata nel 77.2% dei pazienti, la maggior parte dei quali (60%) avevano una stenosi $\geq 50\%$ a livello della LAD.

Rispetto ai pazienti sottoposti ad angiografia coronarica selettiva, i pazienti che sono stati sottoposti ad angiografia urgente erano più frequentemente donne e fumatori ed erano meno frequentemente trattati con farmaci anti-ipertensivi, ipolipemizzanti e con farmaci antiaggreganti. Questi pazienti presentavano livelli più elevati di troponina e hs-CPR rispetto a quelli sottoposti ad angiografia non urgente. Questi pazienti mostravano inoltre la tendenza ad avere livelli più elevati di ceramidi plasmatiche. Non vi erano invece significative differenze in termini di età, diabete, BMI, e-GFR e principali dati angiografici coronarici tra i due gruppi di pazienti (dati non mostrati).

La Tabella 3 mostra gli effetti dell'aggiustamento statistico per molteplici fattori di rischio cardiovascolare sull'associazione tra ciascuna ceramide (espressa per

ogni incremento 1-SD) e la severità della stenosi della arteria coronaria discendente anteriore (inserita come variabile continua nel modello statistico). Livelli circolanti più elevati di Cer(d18:1/20:0), Cer(d18:1/22:0) e Cer(d18:1/24:0) erano significativamente associati con una maggiore severità della stenosi della arteria coronaria discendente anteriore (LAD) dopo aggiustamento per età, sesso, fumo, precedente storia di cardiopatia ischemica, ipertensione, dislipidemia, diabete, e-GFR e livelli di hs-CPR (modello 2). Nel modello 2, la precedente storia di cardiopatia ischemica era l'unica altra variabile che era associata in maniera indipendente ad una maggiore severità della stenosi della LAD. In particolare, dopo ulteriore aggiustamento per molteplicità (utilizzando il metodo di Benjamini-Hochberg) è stato documentato che solo i livelli di Cer(d18:1/22:0) e Cer(d18:1/24:0) mantenevano una significatività statistica. Al contrario, nessuna associazione statistica è stata documentata tra i livelli delle ceramidi plasmatiche e la severità delle stenosi dell'arterie coronaria destra e circonflessa sinistra dopo aggiustamento per i fattori di rischio sopramenzionati (dati non mostrati).

Come mostrato nella Tabella supplementare 1, sono stati ottenuti risultati analoghi anche quando abbiamo ripetuto tutte le analisi statistiche, escludendo i pazienti con infarto miocardico STEMI ($n=15$) nei quali la determinazione della stenosi della arteria coronaria potrebbe essere meno accurata per la presenza di un trombo all'interno della arteria coronaria.

La Tabella 4 mostra gli effetti dell'aggiustamento statistico per multipli fattori di rischio cardiovascolare sull'associazione tra ogni ceramide plasmatica e la presenza di stenosi della arteria coronaria discendente anteriore $\geq 50\%$ (considerata come variabile categorica) nell'intero campione di pazienti. Analogamente a quanto riportato sopra, livelli più elevati di Cer(d18:1/20:0), Cer(d18:1/22:0) e Cer(d18:1/24:0) erano significativamente associate ad un aumentato rischio di stenosi della LAD $\geq 50\%$, anche dopo aggiustamento per molteplici fattori di rischio cardiovascolare e variabili potenzialmente confondenti (modello 2). Dopo ulteriore aggiustamento per molteplicità (utilizzando la procedura di Benjamini-Hochberg), solo i livelli di Cer(d18:1/22:0) e

Cer(d18:1/24:0) mantenevano una associazione indipendente con aumentato rischio di stenosi della LAD $\geq 50\%$. Questi risultati erano invariati anche quando erano esclusi dall'analisi statistica i pazienti con infarto miocardico STEMI ($n=15$) (Tabella supplementare 2)

In maniera simile ai risultati sopra riportati, quando i pazienti venivano categorizzati in tre gruppi in accordo ai terzili dello *score* di severità di Gensini (che erano calcolati dalla somma degli scores dei segmenti coronarici individuali) e dopo aver escluso i pazienti con infarto miocardico STEMI, è stato rilevato che livelli più elevati di Cer(d18:1/20:0), Cer(d18:1/22:0) e Cer(d18:1/24:0) erano significativamente associati ad uno score di Gensini più elevato (tale variabile era inclusa nei modelli di regressione logistica multivariata come una variabile categorica, vale a dire, confrontando il primo terzile *vs.* la combinazione di secondo e terzo terzile); tali associazioni rimanevano significative anche dopo aggiustamento per le possibili variabili confondenti (Tabella supplementare 3).

5. DISCUSSIONE

I principali risultati di questo studio osservazionale dimostrano che elevati livelli di alcune specifiche ceramidi plasmatiche (che sono state precedentemente associate ad un maggior rischio di mortalità e morbilità cardiovascolare), cioè Cer(d18:1/20:0), Cer(d18:1/22:0) e Cer(d18:1/24:0), si associavano in maniera significativa ad una maggiore severità angiografica della stenosi della arteria coronaria discendente anteriore (LAD) anche dopo aggiustamento per i comuni fattori di rischio cardiovascolare, uso di farmaci ipolipemizzanti, e-GFR e concentrazioni plasmatiche di hs-CRP. Al contrario, i livelli plasmatici di Cer(d18:1/16:0), Cer(d18:1/18:0) e Cer(d18:1/24:1) non erano associate in maniera indipendente con la severità della stenosi di LAD in questo gruppo di pazienti. E' interessante sottolineare che questi risultati sono stati confermati anche sia quando sono stati esclusi dall'analisi i pazienti con infarto miocardico acuto STEMI ($n=15$) sia quando veniva utilizzato lo score di Gensini per quantificare la severità angiografica delle stenosi coronariche.

Le concentrazioni dei livelli circolanti delle ceramidi, che abbiamo dosato in questo studio, sono risultati paragonabili a quelli misurati in altri studi precedentemente pubblicati in letteratura, che includevano coorti simili di pazienti con malattia coronarica nota o che erano sottoposti ad angiografia coronarica^{56,68,60}.

A prima vista, la mancanza di significative associazioni nel nostro studio tra livelli circolanti delle varie ceramidi plasmatiche e la severità della stenosi coronarica a livello delle arterie coronaria destra (RCA) e circonflessa (LCX) potrebbero apparire in parte inaspettate. Tuttavia, è verosimile che la spiegazione più plausibile per questa mancanza di associazione è che l'arteria coronaria discendente anteriore (LAD) era l'arteria più comunemente occlusa nei pazienti del nostro studio (infatti circa il 60% dei nostri pazienti presentava una stenosi $\geq 50\%$ a livello di LAD). Inoltre è importante ricordare che dal punto di vista anatomico la LAD ed i suoi rami forniscono il sangue alla maggior parte del setto inter-ventricolare e ad oltre la metà del ventricolo sinistro e che, proprio per tale ragione, la LAD è considerata la coronaria più importante in termini di fornitura

di sangue al miocardio⁶⁵. E' verosimile quindi ipotizzare che i nostri risultati, avendo dimostrato una forte associazione delle ceramidi plasmatiche proprio con la severità della stenosi a livello della LAD, potrebbero contribuire a rinforzare ulteriormente la possibilità che esista una relazione di tipo causale tra elevati livelli di specifiche ceramidi plasmatiche e severità della stenosi coronarica, suggerendo come specifiche ceramidi, specie quelle a catena molto lunga, potrebbero giocare un ruolo nella fisiopatologia della malattia coronarica aterosclerotica (come verrà discusso in maggior dettaglio anche in seguito). In ogni caso, nell'interpretazione di questi risultati è necessario tenere in considerazione il fatto che nel nostro studio è stata eseguita una angiografia coronarica, che non è un metodo sufficientemente adeguato per valutare con accuratezza il diametro dei vasi e specialmente l'estensione della malattia, la sua distribuzione e la composizione delle placche aterosclerotiche. E' verosimile ritenere che l'uso di migliori strumenti di *imaging* intra-coronarico attualmente disponibili, come gli ultrasuoni intravascolari e/o la tomografia a coerenza ottica, potrebbero fornire delle informazioni più dettagliate a tale riguardo, fornendo anche una spiegazione più chiara per l'associazione significativa, che abbiamo osservato in questo studio, tra elevati livelli di ceramidi e severità della stenosi coronarica a livello della LAD.

Un numero sempre maggiore di studi osservazionali supporta un ruolo di specifiche ceramidi plasmatiche come dei potenziali mediatori o *biomarkers* nello sviluppo e nella progressione dell'aterosclerosi coronarica^{56,69,59}. Come è stato già precedentemente discusso in un'altra sezione della tesi, allo stato attuale delle conoscenze, tuttavia, è ancora incerto se livelli più elevati di specifiche ceramidi siano associati anche ad una maggiore severità delle stenosi coronariche in pazienti con cardiopatia ischemica già diagnosticata o sospetta. Per esempio, nello studio *ATHEROREMO-IVUS* che coinvolgeva 581 pazienti con malattia coronarica stabile e/o con sospetta sindrome coronarica acuta, Cheng e coautori hanno riportato che elevati livelli di Cer(d18:1/16:0) e Cer(d18:1/24:0) erano significativamente associate ad una morfologia di placca coronarica più "vulnerabile", ma non ad una maggiore severità della stenosi coronarica, suggerendo quindi l'esistenza di una associazione tra specifiche ceramidi ed il

rischio di rottura di placca piuttosto che con il rischio di progressione di placca aterosclerotica⁶¹. In un altro studio prospettico di circa 500 pazienti, che sono stati sottoposti ad angiografia coronarica in elezione, Meeusen e coautori hanno riportato che livelli più elevati di Cer(d18:1/16:0), Cer(d18:1/18:0) e Cer(d18:1/24:1) erano associati in maniera indipendente con un aumentato rischio di sviluppare futuri eventi cardiovascolari durante un follow-up di 4 anni⁶⁰. Tuttavia, gli autori non hanno osservato alcuna associazione significativa tra le ceramidi plasmatiche sopramenzionate e la severità angiografica delle stenosi coronariche al *baseline*⁶⁰.

I meccanismi eziopatogenetici che sono stati ipotizzati per spiegare il possibile ruolo delle ceramidi nello sviluppo e progressione dell'aterosclerosi coronarica non sono ancora completamente chiari. Diverse evidenze sperimentali suggeriscono che specifiche ceramidi sono implicate in una varietà di vie di segnale che sono importanti nei processi di aterogenesi^{62,70,71,72,73,25}. Inoltre, è stato sperimentalmente dimostrato che il miocardio è in grado di produrre alcune ceramidi in risposta all'ischemia acuta ed alla sua successiva riperfusione, portando ad un incremento di specifiche ceramidi che attivano l'autofagia mitocondriale e l'apoptosi^{74,75}. Recentemente, de Carvalho e coautori hanno anche dimostrato una *up-regulation* a livello miocardico di tre enzimi che sono coinvolti nella sintesi delle ceramidi (ossia ceramide sintasi 6, serina palmitoli transferasi 2 e sfingomielinasi neutra) in un modello murino di infarto miocardico indotto dopo legatura della LAD. In tale modello, è stato osservato un marcato incremento nella produzione miocardica di diverse ceramidi a lunga catena, principalmente Cer(d18:1/20:0), Cer(d18:1/22:0) e Cer(d18:1/24:0) in seguito all'ischemia acuta indotta dalla legatura della LAD⁷⁶. Nel loro insieme i risultati di questo sperimentale possono anche aiutarci nell'interpretazione dei risultati del nostro studio che hanno appunto dimostrato una significativa associazione tra aumentati livelli proprio di queste tre ceramidi plasmatiche [Cer(d18:1/20:0), Cer(d18:1/22:0) e Cer(d18:1/24:0)] e la severità della stenosi a livello della LAD. Sono comunque necessarie ulteriori ricerche per poter meglio definire il diverso impatto di specifiche ceramidi plasmatiche (con varia lunghezza della catena acilica e con differenti composti di grassi saturi/insaturi) sulle vie di segnale che

influenzano lo sviluppo e la progressione della arteriosclerosi coronarica. E' possibile, infatti, ipotizzare che differenze nei livelli di ceramidi con varie lunghezze di catena acilica o composti di grassi insaturi/saturi possano spiegare, almeno in parte, il differente rischio esercitato da tali composti sullo sviluppo della aterosclerosi coronarica⁷⁷.

Il nostro studio ha alcune importanti limitazioni che devono essere tenute in considerazione. In primo luogo, il disegno trasversale dello studio non consente di determinare la temporalità e la causalità delle associazioni osservate. In secondo luogo, i pazienti reclutati nello studio avevano un rischio cardiovascolare elevato. Pertanto, questi risultati potrebbero non essere generalizzabili anche ad altre coorti di pazienti con un rischio cardiovascolare basso od intermedio. In terzo luogo, anche se siamo stati in grado di aggiustare i nostri risultati per molteplici fattori di rischio cardiovascolare, non si può escludere la possibilità di un confondimento residuo derivante da fattori che non sono stati specificatamente misurati. Sfortunatamente, per esempio, nessuna informazione era disponibile riguardo l'introito dietetico di grassi, la presenza di epatopatia steatosica non alcolica (NAFLD) (che è una patologia associata ad aumentato rischio cardiovascolare, dove alcune specifiche ceramidi sono state implicate nello sviluppo di insulino-resistenza epatica)^{78,79} nè riguardo possibili variazioni peri-procedurali (post-angiografiche) nei livelli delle ceramidi in relazione alle concomitanti variazioni dei livelli di troponina. Infine, in questo studio non sono stati misurati altri marcatori della biosintesi delle ceramidi (come ad esempio la sfingomieline).

Nonostante queste limitazioni, il nostro studio presenta anche degli importanti punti di forza, come il campione relativamente ampio dello studio, l'arruolamento consecutivo dei pazienti, l'utilizzo dell'angiografia coronarica per misurare la severità delle stenosi coronarica, la completezza del database, l'aggiustamento per molti fattori di rischio cardiovascolare e l'esclusione di pazienti con una precedente storia di neoplasia, cirrosi scompensata ed insufficienza renale avanzata. A nostro avviso, l'inclusione di pazienti con tali co-morbidità avrebbe potenzialmente confuso l'interpretazione dei dati.

In conclusione, questo studio osservazionale dimostra per la prima volta che livelli più elevati di alcune specifiche ceramidi plasmatiche, principalmente Cer(d18:1/20:0), Cer(d18:1/22:0), e Cer(d18:1/24:0), che sono state precedentemente associate ad un maggior rischio di sviluppare eventi cardiovascolari, erano significativamente associati ad una maggiore severità della stenosi a livello della arteria discendente anteriore in un campione di pazienti con cardiopatia ischemica nota o sospetta che sono stati consecutivamente sottoposti ad angiografia coronarica elettiva e/o in urgenza. Queste associazioni erano indipendenti dai fattori di rischio cardiovascolare tradizionali, dall'uso di farmaci ipolipemizzanti, e-GFR e livelli circolanti di hs-CRP. I nostri risultati suggeriscono che la misurazione di specifiche ceramidi plasmatiche potrebbe essere clinicamente utile in pazienti con nota o sospetta malattia coronarica. In ogni caso, sono senza dubbio necessari ulteriori studi per comprendere meglio se tali ceramidi possano rappresentare anche dei nuovi *target* terapeutici per il trattamento e la gestione della aterosclerosi coronarica. Inoltre, sono necessari anche ulteriori studi con strumenti di *imaging* intra-coronarico più accurato (per esempio, ultrasuoni intravascolari e/o tomografia a coerenza ottica) in grado di fornire informazioni più dettagliate riguardo la parete dei vasi a livello della stenosi coronarica ed offrire ulteriori approfondimenti sulla relazione tra distinte ceramidi plasmatiche e la severità della stenosi della LAD che abbiamo osservato in questo studio.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Rozenova K.A., Deevska G.M., Karakashian A.A., Nikolova-Karakashian M.N. Studies on the role of acid sphingomyelinase and ceramide in the regulation of tumor necrosis factor alpha (TNFalpha)-converting enzyme activity and TNF-alpha secretion in macrophages. *J Biol Chem.* 2010; 285: 21103–21113.
2. Li X., Becker K.A., Zhang Y. Ceramide in redox signaling and cardiovascular diseases. *Cell Physiol Biochem.* 2010; 26: 41–48.
3. Hannun Y.A., Obeid L.M. The Ceramide-centric universe of lipid-mediated cell regulation: stress encounters of the lipid kind. *J Biol Chem.* 2002; 277: 25847–25850.
4. Hannun Y.A., Luberto C. Ceramide in the eukaryotic stress response. *Trends Cell Biol.* 2000; 10: 73–80.
5. Sawai H., Hannun Y.A. Ceramide and sphingomyelinases in the regulation of stress responses. *Chem Phys Lipids.* 1999; 102: 141–147.
6. Boulgaropoulos B., Amenitsch H., Laggner P., Pabst G. Implication of sphingomyelin/ceramide molar ratio on the biological activity of sphingomyelinase. *Biophys J.* 2010; 99: 499–506.
7. Claus R.A., Dorer M.J., Bunck A.C., Deigner H.P. Inhibition of sphingomyelin hydrolysis: targeting the lipid mediator ceramide as a key regulator of cellular fate. *Curr Med Chem.* 2009; 16: 1978–2000.
8. Summers S.A. Ceramides in insulin resistance and lipotoxicity. *Prog Lipid Res.* 2006; 45: 42–72.
9. Zeidan Y.H., Hannun Y.A. The acid sphingomyelinase/ceramide pathway: biomedical significance and mechanisms of regulation. *Curr Mol Med.* 2009; 10: 454–466.
10. Pena L.A., Fuks Z., Kolesnick R. Stress-induced apoptosis and the sphingomyelin pathway. *Biochem Pharmacol.* 1997; 53: 615–621.
11. Dressler K.A., Mathias S., Kolesnick R.N. Tumor necrosis factor-alpha activates the sphingomyelin signal transduction pathway in a cell-free system. *Science.* 1992; 255: 1715–1718.
12. Kitatani K., Idkowiak-Baldys J., Hannun Y.A. The sphingolipid salvage pathway in ceramide metabolism and signaling. *Cell Signal.* 2008; 20: 1010–1018.

13. Riboni L., Bassi R., Caminiti A., Prinetti A., Viani P., Tettamanti G. Metabolic fate of exogenous sphingosine in neuroblastoma neuro2A cells. Dose-dependence and biological effects. *Ann N Y Acad Sci.* 1998; 845: 46–56.
14. Gillard B.K., Clement R.G., Marcus D.M. Variations among cell lines in the synthesis of sphingolipids de novo and recycling pathways. *Glycobiology.* 1998; 8: 885–890.
15. Mao C., Obeid L.M. Ceramidases: regulators of cellular responses mediated by ceramide, sphingosine, and sphingosine-1-phosphate. *Biochim Biophys Acta.* 2008; 1781: 424–434.
16. Ponnusamy S., Meyers-Needham M., Senkal C.E., Saddoughi S.A., Sentelle D, Selvam SP, et al. Sphingolipids and cancer: ceramide and sphingosine-1-phosphate in the regulation of cell death and drug resistance. *Future Oncol.* 2010; 6: 1603–1624.
17. Kurek K., Piotrowska D.M., Wiesiołek-Kurek P., Chabowska A., Łukaszuk B., Żendzian-Piotrowska M. The role of sphingolipids in selected cardiovascular diseases. *Postepy Hig Med Dosw (Online).* 2013; 67: 1018–26.
18. Bartke N., Hannun Y.A. Bioactive sphingolipids: metabolism and function. *J Lipid Res.* 2009; 50(Suppl): S91–S96.
19. Gangoiti P., Camacho L., Arana L., Ouro A., Granado M.H., Brizuela L., Casas J., Fabriás G., Abad J.L., Delgado A., Gómez-Muñoz A. Control of metabolism and signaling of simple bioactive sphingolipids: Implications in disease. *Prog Lipid Res.* 2010; 49: 316–334.
20. Galadari S., Rahman A., Pallichankandy S., Galadari A., Thayyullathil F. Role of ceramide in diabetes mellitus: evidence and mechanisms. *Lipids Health Dis.* 2013; 12: 98.
21. Knapp M., Żendzian-Piotrowska M., Kurek K., Błachnio-Zabielska A. Myocardial infarction changes sphingolipid metabolism in the uninfarcted ventricular wall of the rat. *Lipids.* 2012; 47: 847–853.
22. Herr I., Martin-Villalba A., Kurz E., Roncaioli P., Schenkel J., Cifone M.G., Debatin K.M. FK506 prevents stroke-induced generation of ceramide and apoptosis signaling. *Brain Res.* 1999; 826: 210–219.
23. Tabas I. Sphingolipids and atherosclerosis: a mechanistic connection? A therapeutic opportunity? *Circulation.* 2004; 110: 3400–3401.

24. Yang J., Yu Y., Sun S., Duerksen-Hughes P.J. Ceramide and other sphingolipids in cellular responses. *Cell Biochem Biophys.* 2004; 40: 323–350.
25. Maceyka M., Spiegel S. Sphingolipid metabolites in inflammatory disease. *Nature.* 2014; 510: 58–67.
26. Berry C., Touyz R., Dominiczak A.F., Webb R.C., Johns D.G. Angiotensin receptors: signaling, vascular pathophysiology, and interactions with ceramide. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001; 281: H2337–H2365.
27. Spijkers L.J.A., Van den Akker R.F.P., Janssen B.J.A., Debets J.J., De Mey J.G., Stroes E.S., Van den Born B.J., Wijesinghe D.S., Chalfant C.E., MacAleese L., Eijkel G.B., Heeren R.M., Alewijnse A.E., Peters S.L. Hypertension is associated with marked alterations in sphingolipid biology: a potential role for ceramide. *PLoS ONE.* 2011; 6: e21817.
28. Igarashi J., Michel T. Sphingosine-1-phosphate and modulation of vascular tone. *Cardiovasc Res.* 2009; 82: 212–220.
29. Gawaz M., Langer H., May A.E. Platelets in inflammation and atherogenesis. *J Clin Invest.* 2005; 115: 3378–3384.
30. Ruggeri Z.M. Platelets in atherothrombosis. *Nat Med.* 2002; 8: 1227–1234.
31. Borst O., Schmidt E.M., Münzer P., Schönberger T., Towhid S.T., Elvers M., Leibrock C., Schmid E., Eysten A., Kuhl D., May A.E., Gawaz M., Lang F. The serum- and glucocorticoid-inducible kinase 1 (SGK1) influences platelet calcium signaling and function by regulation of Orail expression in megakaryocytes. *Blood.* 2012; 119: 251–261.
32. Kornhuber J., Tripal P., Reichel M., Mühle C., Rhein C., Muehlbacher M., Groemer T.W., Gulbins E. Functional inhibitors of acid sphingomyelinase (FIASMA): a novel pharmacological group of drugs with broad clinical applications. *Cell Physiol Biochem.* 2010; 26: 9–20.
33. Herz J., Pardo J., Kashkar H., Schramm M., Kuzmenkina E., Bos E., Wiegmann K., Wallich R., Peters P.J., Herzig S., Schmelzer E., Krönke M., Simon M.M., Utermöhlen O. Acid sphingomyelinase is a key regulator of cytotoxic granule secretion by primary T lymphocytes. *Nat Immunol.* 2009; 10: 761–768.
34. Wymann M.P., Schneiter R. Lipid signalling in disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008; 9: 162–176.
35. Münzer P., Borst O., Walker B., Schmid E., Feijge M.A., Cosemans J.M., Chatterjee M., Schmidt E.M., Schmidt S., Towhid S.T., Leibrock C., Elvers M., Schaller M.,

- Seizer P., Ferlinz K., May A.E., Gulbins E., Heemskerk J.W., Gawaz M., Lang F. Acid sphingomyelinase regulates platelet cell membrane scrambling, secretion, and thrombus formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014; 34: 61-71.
36. Wong K., Li X.B. C6-ceramide maintains elevated cytosolic calcium levels in activated platelets. *Thromb Res.* 1996; 81: 219-229.
 37. Kitatani K., Oka T., Murata T., Hayama M., Akiba S., Sato T. Acceleration by ceramide of calcium-dependent translocation of phospholipase A2 from cytosol to membranes in platelets. *Arch Biochem Biophys.* 2000; 382: 296-302.
 38. Dennis E.A., Deems R.A., Harkewicz R., Quehenberger O., Brown H.A., Milne S.B., Myers D.S., Glass C.K., Hardiman G., Reichart D., Merrill A.H.Jr., Sullards M.C., Wang E., Murphy R.C., Raetz C.R., Garrett T.A., Guan Z., Ryan A.C., Russell D.W., McDonald J.G., Thompson B.M., Shaw W.A., Sud M, Zhao Y., Gupta S., Maurya M.R., Fahy E., Subramaniam S. A mouse macrophage lipidome. *J Biol Chem.* 2010; 285: 39976–39985
 39. Sims K., Haynes C.A., Kelly S., Allegood J.C., Wang E., Momin A., Leipelt M., Reichart D., Glass C.K., Sullards M.C., Merrill A.H.Jr. Kdo2-lipid A, a TLR4-specific agonist, induces de novo sphingolipid biosynthesis in RAW264.7 macrophages, which is essential for induction of autophagy. *J Biol Chem.* 2010; 285: 38568–38579.
 40. Levine B., Mizushima N., Virgin H.W. Autophagy in immunity and inflammation. *Nature.* 2011; 469: 323–335.
 41. Ali M., Fritsch J., Zigdon H., Pewzner-Jung Y., Schütze S., Futerman A.H. Altering the sphingolipid acyl chain composition prevents LPS/GLN-mediated hepatic failure in mice by disrupting TNFR1 internalization. *Cell Death Disease.* 2013; 4: e929.
 42. Hotamisligil G.S. Inflammation and metabolic disorders. *Nature.* 2006; 444:860–867.
 43. Holland W.L., Summers S.A. Sphingolipids, insulin resistance, and metabolic disease: new insights from in vivo manipulation of sphingolipid metabolism. *Endocr Rev.* 2008; 29: 381-402.
 44. Holland W.L., Bikman B.T., Wang L.P., Yuguang G., Sargent K.M., Bulchand S., Knotts T.A., Shui G., Clegg D.J., Wenk M.R., Pagliassotti M.J., Scherer P.E., Summers S.A. Lipid-induced insulin resistance mediated by the proinflammatory receptor TLR4 requires saturated fatty acid-induced ceramide biosynthesis in mice. *J. Clin. Invest.* 2011; 121: 1858–1870.
 45. Chavez J.A., Summers S.A. A ceramide-centric view of insulin resistance. *Cell Metab.* 2012; 15: 585–594

46. Park J.W., Park W.J., Kuperman Y., Boura-Halfon S., Pewzner-Jung Y., Futerman A.H. Ablation of very long acyl chain sphingolipids causes hepatic insulin resistance in mice due to altered detergent-resistant membranes. *Hepatology*. 2013; 57: 525–532.
47. Vandanmagsar B., Youm Y.H., Ravussin A., Galgani J.E., Stadler K., Mynatt R.L., Ravussin E., Stephens J.M., Dixit V.D. The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Nat Med*. 2011; 17: 179–188.
48. Youm Y.H., Grant R.W., McCabe L.R., Albarado D.C., Nguyen K.Y., Ravussin A., Pistell P., Newman S., Carter R., Laque A., Münzberg H., Rosen C.J., Ingram D.K., Salbaum J.M., Dixit V.D. Canonical Nlrp3 inflammasome links systemic low-grade inflammation to functional decline in aging. *Cell Metab*. 2013; 18: 519–532
49. Youm Y.H., Kanneganti T.D., Vandanmagsar B., Zhu X., Ravussin A., Adijiang A., Owen J.S., Thomas M.J., Francis J., Parks J.S., Dixit V.D. The Nlrp3 inflammasome promotes age-related thymic demise and immunosenescence. *Cell Rep*. 2012; 1: 56–68.
50. Roger V.L., Go A.S., Lloyd-Jones D.M., Adams R.J., Berry J.D., Brown T.M., Carnethon M.R., Dai S., De Simone G., Ford E.S., Fox C.S., Fullerton H.J., Gillespie C., Greenlund K.J., Hailpern S.M., Heit J.A., Ho P.M., Howard V.J., Kissela B.M., Kittner S.J., Lackland D.T., Lichtman J.H., Lisabeth L.D., Makuc D.M., Marcus G.M., Marelli A., Matchar D.B., McDermott M.M., Meigs J.B., Moy C.S., Mozaffarian D., Mussolino M.E., Nichol G., Paynter N.P., Rosamond W.D., Sorlie P.D., Stafford R.S., Turan T.N., Turner M.B., Wong N.D., Wylie-Rosett J.; American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart disease and stroke statistics—2011 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*. 2011; 123: e18–e209.
51. Durrington P. Dyslipidaemia. *Lancet* 2003; 362: 717-731.
52. Sachdeva A., Cannon C.P., Deedwania P.C., Labresh K.A., Smith S.C.Jr., Dai D., Hernandez A., Fonarow G.C. Lipid levels in patients hospitalized with coronary artery disease: an analysis of 136 905 hospitalizations in Get With The Guidelines. *Am Heart J*. 2009; 157: 111–117.e112.
53. Meikle J., Wong G., Tsorotes D., Barlow C.K., Weir J.M., Christopher M.J., Machintosh G.L., Goudey B., Stern L., Kpwalczyk A., Haviv I., White A.J., Dart A.M., Duffy S.J., Jennings G.L., Kingwell B.A. Plasma lipidomic analysis of stable and unstable coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011; 31: 2723–2732.

54. Argraves K.M., Sethi A.A., Gazzolo P.J., Wilkerson B.A., Remaley A.T., Tybjaerg-Hansen A., Nordestgaard B.G., Yeatts S.D., Nicholas K.S., Barth J.L., Argraves W.S. S1P, dihydro-S1P and C24:1-ceramide levels in the HDL-containing fraction of serum inversely correlate with occurrence of ischemic heart disease. *Lipids Health Dis.* 2011; 10: 70.
55. Tarasov K., Ekroos K., Suoniemi M., Kauhanen D., Sylvänne T., Hurme R., Gouni-Berthold I., Berthold H.K., Kleber M.E., Laaksonen R., März W. Molecular lipids identify cardiovascular risk and are efficiently lowered by simvastatin and PCSK9 deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014; 99: E45–E52.
56. Laaksonen R., Ekroos K., Sysi-Aho M., Hilvo M., Vihervaara T., Kauhanen D., Suoniemi M., Hurme R., März W., Scharnagl H., Stojakovic T., Vlachopoulou E., Lokki M.L., Nieminen M.S., Klingenberg R., Matter C.M., Hornemann T., Jüni P., Rodondi N., Räber L., Windecker S., Gencer B., Pedersen E.R., Tell G.S., Nygård O., Mach F., Sinisalo J., Lüscher T.F. Plasma ceramides predict cardiovascular death in patients with stable coronary artery disease and acute coronary syndromes beyond LDL-cholesterol. *Eur Heart J.* 2016; 37: 1967–1976.
57. Turpin S.M., Nicholls H.T., Willmes D.M., Mourier A., Brodesser S., Wunderlich C.M., Mauer J., Xu E., Hammerschmidt P., Brönneke H.S., Trifunovic A., Lo Sasso G., Wunderlich F.T., Kornfeld J.W., Blüher M., Krönke M., Brüning J.C. Obesity-induced CerS6-dependent C16:0 ceramide production promotes weight gain and glucose intolerance. *Cell Metab.* 2014; 20: 678–686.
58. Menuz V., Howell K.S., Gentina S., Epstein S., Riezman I., Fornallaz-mulhauser M., Hengartner M.O., Gomez M., Riezman H., Martinou J. Protection of *C. elegans* from Anoxia by HYL-2 Ceramide Synthase. *Science* 2009; 324: 381–384.
59. Mantovani A., Bonapace S., Lunardi G., Salgarello M., Dugo C., Gori S., Barbieri E., Verlato G., Laaksonen R., Byrne C.D., Targher G. Association of plasma ceramides with myocardial perfusion in patients with coronary artery disease undergoing stress myocardial perfusion scintigraphy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2018; 38: 2854-2861.
60. Meeusen J.W., Donato L.J., Bryant S.C., Baudhuin L.M., Berger P.B., Jaffe A.S. Plasma ceramides. A novel predictor of major adverse cardiovascular events after coronary angiography. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2018; 38: 1933-1939.
61. Cheng J.M., Suoniemi M., Kardys I., Vihervaara T., De Boer S.P., Akkerhuis K.M., Sysi-Aho M., Ekroos K., Garcia-Garcia H.M., Oemrawsingh R.M., Regar E., Koenig W., Serruys P.W., Van Geuns R.J., Boersma E., Laaksonen R. Plasma concentrations

- of molecular lipid species in relation to coronary plaque characteristics and cardiovascular outcome: Results of the ATHEROREMO-IVUS study. *Atherosclerosis*. 2015; 243: 560-566.
62. Borodzicz S., Czarzasta K., Kuch M., Cudnoch-Jedrzejewska A. Sphingolipids in cardiovascular diseases and metabolic disorders. *Lipids Health Dis*. 2015; 14: 55.
63. Levey A.S., Bosch J.P., Lewis J.B., Greene T., Rogers N., Roth D. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. *Ann Intern Med*. 1999; 130: 461-470.
64. Kauhanen D., Sysi-Aho M., Koistinen K.M., Laaksonen R., Sinisalo J., Ekroos K. Development and validation of a high-throughput LC-MS/MS assay for routine measurement of molecular ceramides. *Anal Bioanal Chem*. 2016; 408: 3475-3483.
65. Desai N.R., Bradley S.M., Parzynski C.S., Nallamothu B.K., Chan P.S., Spertus J.A., Patel M.R., Ader J., Soufer A., Krumholz H.M., Curtis J.P. Appropriate use criteria for coronary revascularization and trends in utilization, patient selection, and appropriateness of percutaneous coronary intervention. *JAMA*. 2015; 314: 2045-2053.
66. Gensini G.G. A more meaningful scoring system for determining the severity of coronary heart disease. *Am J Cardiol*. 1983; 51: 606.
67. Benjamini Y., Hochberg Y. More powerful procedures for multiple significance testing. *Stat Med*. 1990; 9: 811-818.
68. Anroedh S., Hilvo M., Akkerhuis K.M., Kauhanen D., Koistinen K., Oemrawsingh R., Serruys P., van Geuns R.J., Boersma E., Laaksonen R., Kardys I. Plasma concentrations of molecular lipid species predict long-term clinical outcome in coronary artery disease patients. *J Lipid Res*. 2018; 59: 1729-1737.
69. Havulinna A.S., Sysi-Aho M., Hilvo M., Kauhanen D., Hurme R., Ekroos K., Salomaa V., Laaksonen R. Circulating ceramides predict cardiovascular outcomes in the population-based FINRISK 2002 cohort. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2016; 36: 2424-2430.
70. Weil B.R., Canty J.M.Jr. Ceramide signaling in the coronary microcirculation: a double-edged sword?. *Circ Res*. 2014; 115: 475-477.
71. Bismuth J., Lin P., Yao Q., Chen C. Ceramide: a common pathway for atherosclerosis? *Atherosclerosis*. 2008; 196: 497-504.

72. Freed J.K., Beyer A.M., LoGiudice J.A., Hockenberry J.C., Gutterman D.D. Ceramide changes the mediator of flow-induced vasodilation from nitric oxide to hydrogen peroxide in the human microcirculation. *Circ Res.* 2014; 115: 525-532.
73. Jernigan P.L., Makley A.T., Hoehn R.S., Edwards M.J., Pritts T.A. The role of sphingolipids in endothelial barrier function. *Biol Chem.* 2015; 396: 681-691.
74. Beresewicz A., Dobrzyn A., Gorski J. Accumulation of specific ceramides in ischemic/reperfused rat heart; effect of ischemic preconditioning. *J Physiol Pharmacol.* 2002; 53: 371-382.
75. Novgorodov S.A., Gudz T.I. Ceramide and mitochondria in ischemia/reperfusion. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2009; 53: 198-208.
76. De Carvalho L.P., Tan S.H., Ow G.S., Tang Z., Ching J., Kovalik J.P., Poh S.C., Chin C.T., Richards A.M., Martinez E.C., Troughton R.W., Fong A.Y., Yan B.P., Seneviratna A., Sorokin V., Summers S.A., Kuznetsov V.A., Chan M.Y. Plasma ceramides as prognostic biomarkers and their arterial and myocardial tissue correlates in acute myocardial infarction. *JACC Basic Transl Sci.* 2018; 3: 163-175.
77. Grösch S., Schiffmann S., Geisslinger G. Chain length-specific properties of ceramides. *Prog Lipid Res.* 2012; 51: 50-62.
78. Targher G., Byrne C.D., Lonardo A., Zoppini G., Barbui C. Non-alcoholic fatty liver disease and risk of incident cardiovascular disease: A meta-analysis. *J Hepatol.* 2016; 65: 589-600.
79. Petersen M.C., Shulman G.I. Roles of diacylglycerols and ceramides in hepatic insulin resistance. *Trends Pharmacol Sci.* 2017; 38: 649-665.

7. APPENDICE I.

TABELLE

Tabella 1. Caratteristiche cliniche e biochimiche in 167 pazienti con malattia coronarica nota o sospetta che sono stati sottoposti ad angiografia coronarica elettiva o in urgenza

	Campione totale
Età (anni)	69 ± 10
Sesso (uomini) %	73.6
BMI (kg/m ²)	26.3 ± 4
Fumatore (%)	11.4
Pressione arteriosa sistolica (mmHg)	142 ± 24
Pressione arteriosa diastolica (mmHg)	72 ± 11
Colesterolo totale (mmol/l)	4.51 ± 1.1
Colesterolo LDL (mmol/l)	2.62 ± 0.9
Colesterolo HDL (mmol/l)	1.31 ± 0.3
Trigliceridi (mmol/l)	1.40 ± 0.8
Glucosio a digiuno (mmol/l)	6.3 ± 2.1
e-GFR _{MDRD} (ml/min/1.73 m ²)	80.9 ± 21
Troponina I (ug/l)	0.02 (0.01-0.06)
hs-PCR (mg/l)	2.6 (1.1-6.5)
Dislipidemia (%)	84.4
Ipertensione arteriosa (%)	77.2
Diabete (%)	21.0
Malattia renale cronica (%)	14.4
Malattia coronarica (%)	34.1
Malattia valvolare cardiaca (%)	17.9
Fibrillazione atriale permanente (%)	8.9
Frazione di eiezione ventricolare sinistra (%), n=122	56 ± 12
Farmaci antiplastrinici (%)	53.3
Farmaci anticoagulanti (%)	14.4

ACE-I/ARB (%)	60.5
Beta bloccanti (%)	46.1
Diuretici (%)	33.5
Calcio-antagonisti (%)	17.9
Nitroderivati (%)	14.4
Statine (%)	44.3
Ezetimibe (%)	7.2
Fenofibrato (%)	2.4
Ipoglicemizzanti orali (%), n=35*	17.4
Insulina (%), n=35*	4.8
<p>Campione totale, $n=167$ a meno che indicato in maniera diversa. I dati sono espressi come media \pmSD o mediana (intervalli interquartili) e percentuali.</p> <p>* Informazioni riguardo l'uso di farmaci ipoglicemizzanti erano disponibili per tutti pazienti con diabete noto ($n=35$).</p>	

Tabella 2. Dati angiografici e livelli di ceramidi plasmatiche in 167 pazienti con malattia coronarica nota o sospetta che sono stati sottoposti ad angiografia coronarica elettiva o in urgenza

	Campione totale
Dati angiografici coronarici	
Indicazione urgente, n (%)	30 (18%)
Dominanza (destra), n	154 (92.2%)
Stenosi ramo principale sinistro $\geq 50\%$, n (%)	9 (5.4%)
Stenosi $\geq 50\%$ in LAD, n (%)	100 (59.9%)
Stenosi $\geq 50\%$ in RCA, n (%)	78 (46.7%)
Stenosi $\geq 50\%$ in LCX, n (%)	75 (45.0%)
Stenosi $\geq 50\%$ in qualsiasi arteria coronaria, n (%)	129 (77.2%)
Ceramidi	
Cer(d18:1/16:0) (umol/L)	0.329 \pm 0.10
Cer(d18:1/18:0) (umol/L)	0.127 \pm 0.06
Cer(d18:1/20:0) (umol/L)	0.100 \pm 0.04
Cer(d18:1/22:0) (umol/L)	0.725 \pm 0.29
Cer(d18:1/24:0) (umol/L)	2.766 \pm 1.15
Cer(d18:1/24:1) (umol/L)	1.047 \pm 0.37
Campione totale, $n=167$. I dati sono espressi come media \pm SD o percentuali.	
Abbreviazioni: LAD, discendente anteriore sinistra; LCX, circonflessa sinistra; RCA, arteria coronaria destra.	

Tabella 3. Associazione tra ceramidi plasmatiche e severità angiografica delle stenosi coronariche a livello della arteria discendente anteriore (inclusa come variabile continua) nel campione totale di soggetti partecipanti allo studio

Analisi di regressione lineare multipla	Coefficiente β standardizzato	P value
Modello aggiustato 1		
Cer(d18:1/16:0) (1-SD incremento, i.e. 0.10 umol/L)	0.027	0.74
Età (anni)	0.100	0.20
Sesso (maschi vs. femmine)	0.060	0.47
Modello aggiustato 2		
Cer(d18:1/16:0) (1-SD incremento, i.e. 0.10 umol/L)	0.046	0.58
Età (anni)	0.051	0.59
Sesso (maschi vs. femmine)	0.034	0.70
Storia di fumo (sì vs. no)	0.029	0.82
Precedente storia di CAD (sì vs. no)	0.157	0.08
Diabete (sì vs. no)	0.021	0.83
Ipertensione (sì vs. no)	-0.05	0.59
Dislipidemia (sì vs. no)	0.076	0.41
hs-CRP (mg/L)	0.083	0.36
e-GFR (mL/min/1.73 m ²)	-0.03	0.72
Modello aggiustato 1		
Cer(d18:1/18:0) (1-SD incremento, i.e. 0.06 umol/L)	0.106	0.18
Età (anni)	0.090	0.25

Sesso (maschi vs. femmine)	0.071	0.38
Modello aggiustato 2		
Cer(d18:1/18:0) (1-SD incremento, i.e. 0.06 umol/L)	0.134	0.12
Età (anni)	0.085	0.34
Sesso (maschi vs. femmine)	0.042	0.61
Storia di fumo (si vs. no)	0.025	0.76
Precedente storia di CAD (sì vs. no)	0.163	0.06
Diabete (si vs. no)	0.018	0.83
Ipertensione (si vs. no)	-0.06	0.53
Dislipidemia (si vs. no)	0.075	0.37
hs-CRP (mg/L)	0.054	0.53
e-GFR (mL/min/1.73 m ²)	-0.02	0.83
Modello aggiustato 1		
Cer(d18:1/20:0) (1-SD incremento, i.e. 0.04 umol/L)	0.144	0.06
Età (anni)	0.092	0.23
Sesso (maschi vs. femmine)	0.076	0.33
Modello aggiustato 2		
Cer(d18:1/20:0) (1-SD incremento, i.e. 0.04 umol/L)	0.173	0.041
Età (anni)	0.086	0.33
Sesso (maschi vs. femmine)	0.042	0.61
Storia di fumo (si vs. no)	0.020	0.80
Precedente storia di CAD (sì vs. no)	0.175	0.041
Diabete (si vs. no)	0.040	0.64

Ipertensione (si vs. no)	-0.06	0.51
Dislipidemia (si vs. no)	0.062	0.46
hs-CRP (mg/L)	0.054	0.53
e-GFR (mL/min/1.73 m ²)	-0.02	0.86
Modello aggiustato 1		
Cer(d18:1/22:0) (1-SD incremento, i.e. 0.29 umol/L)	0.185	0.020
Età (anni)	0.138	0.08
Sesso (maschi vs. femmine)	0.082	0.31
Modello aggiustato 2		
Cer(d18:1/22:0) (1-SD incremento, i.e. 0.29 umol/L)	0.239	0.005 *
Età (anni)	0.126	0.15
Sesso (maschi vs. femmine)	0.040	0.63
Storia di fumo (si vs. no)	0.033	0.68
Precedente storia di CAD (sì vs. no)	0.203	0.022
Diabete (si vs. no)	0.049	0.56
Ipertensione (si vs. no)	-0.03	0.69
Dislipidemia (si vs. no)	0.053	0.53
hs-CRP (mg/L)	0.043	0.61
e-GFR (mL/min/1.73 m ²)	-0.03	0.75
Modello aggiustato 1		
Cer(d18:1/24:0) (1-SD incremento, i.e. 1.15 umol/L)	0.171	0.032
Età (anni)	0.141	0.08

Sesso (maschi vs. femmine)	0.064	0.40
Modello aggiustato 2		
Cer(d18:1/24:0) (1-SD incremento, i.e. 1.15 umol/L)	0.225	0.009 *
Età (anni)	0.128	0.15
Sesso (maschi vs. femmine)	0.022	0.79
Storia di fumo (si vs. no)	0.032	0.69
Precedente storia di CAD (sì vs. no)	0.196	0.031
Diabete (si vs. no)	0.062	0.47
Ipertensione (si vs. no)	-0.03	0.69
Dislipidemia (si vs. no)	0.037	0.65
hs-CRP (mg/L)	0.063	0.45
e-GFR (mL/min/1.73 m ²)	-0.03	0.69
Modello aggiustato 1		
Cer(d18:1/24:1) (1-SD incremento, i.e. 0.37 umol/L)	0.092	0.25
Età (anni)	0.086	0.27
Sesso (maschi vs. femmine)	0.067	0.39
Modello aggiustato 2		
Cer(d18:1/24:1) (1-SD incremento, i.e. 0.37 umol/L)	0.104	0.21
Età (anni)	0.076	0.39
Sesso (maschi vs. femmine)	0.037	0.65
Storia di fumo (si vs. no)	0.028	0.72
Precedente storia di CAD (sì vs. no)	0.149	0.09
Diabete (si vs. no)	0.019	0.81

Ipertensione (si vs. no)	-0.04	0.62
Dislipidemia (si vs. no)	0.07	0.39
hs-CRP (mg/L)	0.069	0.42
e-GFR (mL/min/1.73 m ²)	-0.03	0.74
<p>Dimensione del campione, $n=167$. I dati sono espressi come coefficiente beta standardizzato mediante uso di analisi di regressione lineare multipla. La severità della stenosi di LAD (inclusa come variabile continua) era la variabile dipendente in tutti i modelli di regressione lineare. Ogni ceramide era espressa per ogni incremento di 1 deviazione standard (SD).</p> <p>NB: ipertensione è stata definita come PA $\geq 140/90$ mmHg o trattamento farmacologico per la stessa; il diabete è stato definito come diabete riferito diagnosticato da un medico o dall'utilizzo di farmaci ipoglicemizzanti; dislipidemia è stata definita da valori di LDL colesterolo ≥ 100 mg/dl o dal trattamento farmacologico per la stessa</p> <p>*Modello aggiustato 2: questa associazione rimaneva statisticamente significativa anche dopo ulteriore aggiustamento per molteplicità utilizzando la procedura di Benjamini-Hochberg (con un FDR di 0.05).</p>		

Tabella 4. Associazione tra ceramidi plasmatiche e presenza di stenosi $\geq 50\%$ a livello della arteria discendente anteriore (inclusa come variabile categorica) nel campione totale di soggetti partecipanti allo studio.

Analisi di regressione logistica multivariata	Odds Ratio (95% IC)	P value
Modello aggiustato 1		
Cer(d18:1/16:0) (1-SD incremento, i.e. 0.10 umol/L)	1.20 (0.86-1.67)	0.27
Età (anni)	1.01 (0.86-1.67)	0.39
Sesso (maschi vs. femmine)	1.63 (0.79-3.38)	0.18
Modello aggiustato 2		
Cer(d18:1/16:0) (1-SD incremento, i.e. 0.10 umol/L)	1.22 (0.86-1.75)	0.27
Età (anni)	1.01 (0.98-1.05)	0.41
Sesso (maschi vs. femmine)	1.53 (0.70-3.35)	0.28
Storia di fumo (si vs. no)	1.06 (0.65-1.72)	0.81
Precedente storia di CAD (si vs. no)	1.98 (0.91-4.29)	0.08
Diabete (si vs. no)	1.23 (0.52-2.91)	0.64
Ipertensione (si vs. no)	0.58 (0.24-1.40)	0.22
Dislipidemia (si vs. no)	1.37 (0.53-3.53)	0.51
hs-CRP (mg/L)	1.01 (0.99-1.02)	0.34
e-GFR (mL/min/1.73 m ²)	0.99 (0.98-1.01)	0.45
Modello aggiustato 1		
Cer(d18:1/18:0) (1-SD incremento, i.e. 0.06 umol/L)	1.29 (0.91-1.83)	0.16
Età (anni)	1.01 (0.98-1.04)	0.46

Sesso (maschi vs. femmine)	1.65 (0.80-3.39)	0.17
Modello aggiustato 2		
Cer(d18:1/18:0) (1-SD incremento, i.e. 0.06 umol/L)	1.31 (0.92-1.92)	0.13
Età (anni)	1.01 (0.98-1.05)	0.43
Sesso (maschi vs. femmine)	1.53 (0.69-3.35)	0.29
Storia di fumo (si vs. no)	1.07 (0.67-1.74)	0.77
Precedente storia di CAD (sì vs. no)	2.02 (0.93-4.40)	0.06
Diabete (si vs. no)	1.21 (0.51-2.87)	0.66
Ipertensione (si vs. no)	0.54 (0.22-1.31)	0.18
Dislipidemia (si vs. no)	1.38 (0.53-3.50)	0.50
hs-CRP (mg/L)	1.01 (0.99-1.02)	0.42
e-GFR (mL/min/1.73 m ²)	0.99 (0.98-1.01)	0.53
Modello aggiustato 1		
Cer(d18:1/20:0) (1-SD incremento, i.e. 0.04 umol/L)	1.34 (0.96-1.88)	0.08
Età (anni)	1.01 (0.98-1.04)	0.44
Sesso (maschi vs. femmine)	1.66 (0.81-3.39)	0.17
Modello aggiustato 2		
Cer(d18:1/20:0) (1-SD incremento, i.e. 0.04 umol/L)	1.39 (1.00-1.99)	0.050
Età (anni)	1.01 (0.98-1.05)	0.42
Sesso (maschi vs. femmine)	1.52 (0.69-3.31)	0.30
Storia di fumo (si vs. no)	1.06 (0.65-1.72)	0.82
Precedente storia di CAD (sì vs. no)	2.12 (0.97-4.64)	0.06

no)		
Diabete (si vs. no)	1.34 (0.56-3.22)	0.51
Ipertensione (si vs. no)	0.53 (0.21-1.29)	0.16
Dislipidemia (si vs. no)	1.29 (0.50-3.36)	0.59
hs-CRP (mg/L)	1.00 (0.99-1.02)	0.40
e-GFR (mL/min/1.73 m ²)	0.99 (0.98-1.01)	0.55
Modello aggiustato 1		
Cer(d18:1/22:0) (1-SD incremento, i.e. 0.29 umol/L)	1.43 (1.02-2.01)	0.042
Età (anni)	1.02 (0.99-1.05)	0.21
Sesso (maschi vs. femmine)	1.66 (0.81-3.41)	0.16
Modello aggiustato 2		
Cer(d18:1/22:0) (1-SD incremento, i.e. 0.29 umol/L)	1.57 (1.08-2.29)	0.017*
Età (anni)	1.02 (0.99-1.06)	0.24
Sesso (maschi vs. femmine)	1.49 (0.68-3.26)	0.32
Storia di fumo (si vs. no)	1.09 (0.67-1.79)	0.72
Precedente storia di CAD (si vs. no)	2.38 (1.07-5.32)	0.029
Diabete (si vs. no)	1.39 (0.58-3.34)	0.46
Ipertensione (si vs. no)	0.57 (0.23-1.41)	0.22
Dislipidemia (si vs. no)	1.24 (0.48-3.28)	0.66
hs-CRP (mg/L)	1.00 (0.99-1.02)	0.43
e-GFR (mL/min/1.73 m ²)	0.99 (0.98-1.01)	0.48
Modello aggiustato 1		

Cer(d18:1/24:0) (1-SD incremento, i.e. 1.15 umol/L)	1.41 (1.00-1.98)	0.05
Età (anni)	1.02 (0.99-1.05)	0.19
Sesso (maschi vs. femmine)	1.56 (0.77-3.17)	0.22
Modello aggiustato 2		
Cer(d18:1/24:0) (1-SD incremento, i.e. 1.15 umol/L)	1.59 (1.08-2.32)	0.016*
Età (anni)	1.02 (0.99-1.06)	0.21
Sesso (maschi vs. femmine)	1.39 (0.64-3.03)	0.41
Storia di fumo (sì vs. no)	1.10 (0.68-1.81)	0.69
Precedente storia di CAD (sì vs. no)	2.38 (1.07-5.33)	0.029
Diabete (sì vs. no)	1.48 (0.61-3.59)	0.38
Ipertensione (sì vs. no)	0.56 (0.23-1.39)	0.21
Dislipidemia (sì vs. no)	1.14 (0.43-3.03)	0.79
hs-CRP (mg/L)	1.00 (0.99-1.02)	0.32
e-GFR (mL/min/1.73 m ²)	0.99 (0.97-1.01)	0.43
Modello aggiustato 1		
Cer(d18:1/24:1) (1-SD incremento, i.e. 0.37 umol/L)	1.23 (0.88-1.70)	0.22
Età (anni)	1.01 (0.98-1.04)	0.52
Sesso (maschi vs. femmine)	1.59 (0.78-3.24)	0.20
Modello aggiustato 2		
Cer(d18:1/24:1) (1-SD incremento, i.e. 0.37 umol/L)	1.23 (0.87-1.75)	0.24

Età (anni)	1.01 (0.98-1.05)	0.49
Sesso (maschi vs. femmine)	1.47 (0.68-3.20)	0.33
Storia di fumo (sì vs. no)	1.09 (0.67-1.78)	0.71
Precedente storia di CAD (sì vs. no)	1.93 (0.89-4.17)	0.08
Diabete (sì vs. no)	1.23 (0.52-2.90)	0.64
Ipertensione (sì vs. no)	0.56 (0.23-1.38)	0.21
Dislipidemia (sì vs. no)	1.39 (0.54-3.58)	0.49
hs-CRP (mg/L)	1.01 (0.99-1.02)	0.32
e-GFR (mL/min/1.73 m ²)	0.99 (0.97-1.01)	0.45
<p>Dimensione del campione, $n=167$. I dati sono espressi come odds ratio e 95% intervallo di confidenza (IC) sulla base di analisi di regressione logistica multivariata. La presenza di stenosi $\geq 50\%$ a livello della LAD (inclusa come variabile categorica) era la variabile dipendente in tutti i modelli di regressione logistica. Ciascuna ceramide era espressa per ogni incremento di deviazione standard (SD).</p> <p>*Modello aggiustato 2: questa associazione rimaneva statisticamente significativa anche dopo ulteriore aggiustamento per molteplicità utilizzando la procedura di Benjamini-Hochberg (con un FDR di 0.05).</p>		

8. APPENDICE II.

TABELLE SUPPLEMENTARI

Tabella supplementare 1. Associazione tra ceramidi plasmatiche e severità angiografica della stenosi coronarica a livello della arteria discendente anteriore (LAD), dopo esclusione di pazienti con infarto miocardico acuto con elevazione del tratto ST (STEMI).

Analisi di regressione lineare	Coefficiente(β) standard	P value
Modello aggiustato 1		
Cer(d18:1/16:0) (1-SD incremento, i.e. 0.10 umol/L)	0.003	0.97
Età (anni)	0.089	0.27
Sesso (maschi vs. femmine)	0.044	0.60
Modello aggiustato 2		
Cer(d18:1/16:0) (1-SD incremento, i.e. 0.10 umol/L)	0.038	0.67
Età (anni)	0.072	0.45
Sesso (maschi vs. femmine)	0.025	0.78
Storia di fumo (sì vs. no)	0.009	0.91
Precedente storia di CAD (sì vs. no)	0.178	0.06
Diabete (sì vs. no)	0.008	0.92
Ipertensione (sì vs. no)	-0.04	0.64
Dislipidemia (sì vs. no)	0.082	0.36
hs-CRP (mg/L)	0.01	0.88
e-GFR (mL/min/1.73 m ²)	-0.02	0.79
Modello aggiustato 1		
Cer(d18:1/18:0) (1-SD incremento, i.e. 0.06 umol/L)	0.100	0.23
Età (anni)	0.079	0.33

Sesso (maschi vs. femmine)	0.067	0.42
Modello aggiustato 2		
Cer(d18:1/18:0) (1-SD incremento, i.e. 0.06 umol/L)	0.154	0.08
Età (anni)	0.063	0.50
Sesso (maschi vs. femmine)	0.040	0.64
Storia di fumo (si vs. no)	0.014	0.86
Precedente storia di CAD (sì vs. no)	0.200	0.031
Diabete (si vs. no)	0.008	0.92
Ipertensione (si vs. no)	-0.05	0.56
Dislipidemia (si vs. no)	0.090	0.30
hs-CRP (mg/L)	-0.01	0.86
e-GFR (mL/min/1.73 m ²)	-0.02	0.83
Modello aggiustato 1		
Cer(d18:1/20:0) (1-SD incremento, i.e. 0.04 umol/L)	0.156	0.06
Età (anni)	0.080	0.32
Sesso (maschi vs. femmine)	0.078	0.35
Modello aggiustato 2		
Cer(d18:1/20:0) (1-SD incremento, i.e. 0.04 umol/L)	0.213	0.024
Età (anni)	0.065	0.48
Sesso (maschi vs. femmine)	0.044	0.62
Storia di fumo (si vs. no)	0.007	0.93
Precedente storia di CAD (sì vs. no)	0.220	0.023
Diabete (si vs. no)	0.004	0.67
Ipertensione (si vs. no)	-0.06	0.51

Dislipidemia (si vs. no)	0.071	0.41
hs-CRP (mg/L)	-0.02	0.78
e-GFR (mL/min/1.73 m ²)	0.003	0.97
Modello aggiustato 1		
Cer(d18:1/22:0) (1-SD incremento, i.e. 0.29 umol/L)	0.190	0.020
Età (anni)	0.124	0.13
Sesso (maschi vs. femmine)	0.080	0.33
Modello aggiustato 2		
Cer(d18:1/22:0) (1-SD incremento, i.e. 0.29 umol/L)	0.283	0.002*
Età (anni)	0.104	0.26
Sesso (maschi vs. femmine)	0.044	0.61
Storia di fumo (si vs. no)	0.023	0.77
Precedente storia di CAD (sì vs. no)	0.259	0.006
Diabete (si vs. no)	0.053	0.54
Ipertensione (si vs. no)	-0.03	0.73
Dislipidemia (si vs. no)	0.053	0.54
hs-CRP (mg/L)	-0.05	0.58
e-GFR (mL/min/1.73 m ²)	-0.01	0.87
Modello aggiustato 1		
Cer(d18:1/24:0) (1-SD incremento, i.e. 1.15 umol/L)	0.172	0.040
Età (anni)	0.126	0.13
Sesso (maschi vs. femmine)	0.065	0.42
Modello aggiustato 2		
Cer(d18:1/24:0) (1-SD	0.254	0.005*

incremento, i.e. 1.15 umol/L)		
Età (anni)	0.103	0.27
Sesso (maschi vs. femmine)	0.023	0.79
Storia di fumo (si vs. no)	0.024	0.77
Precedente storia di CAD (sì vs. no)	0.248	0.005
Diabete (si vs. no)	0.067	0.45
Ipertensione (si vs. no)	-0.03	0.77
Dislipidemia (si vs. no)	0.035	0.69
hs-CRP (mg/L)	-0.028	0.74
e-GFR (mL/min/1.73 m ²)	-0.02	0.78
Modello aggiustato 1		
Cer(d18:1/24:1) (1-SD incremento, i.e. 0.37 umol/L)	0.086	0.31
Età (anni)	0.075	0.37
Sesso (maschi vs. femmine)	0.064	0.44
Modello aggiustato 2		
Cer(d18:1/24:1) (1-SD incremento, i.e. 0.37 umol/L)	0.127	0.16
Età (anni)	0.049	0.60
Sesso (maschi vs. femmine)	0.038	0.67
Storia di fumo (si vs. no)	0.023	0.79
Precedente storia di CAD (sì vs. no)	0.187	0.040
Diabete (si vs. no)	0.008	0.93
Ipertensione (si vs. no)	-0.04	0.66
Dislipidemia (si vs. no)	0.090	0.31
hs-CRP (mg/L)	-0.01	0.88
e-GFR (mL/min/1.73 m ²)	-0.02	0.83

Dimensione del campione, $n=152$ dopo esclusione di pazienti con STEMI acuto ($n=15$). I dati sono espressi come coefficiente beta standardizzato mediante l'uso dell'analisi di regressione multipla. La severità della stenosi di LAD (inclusa come misura continua trasformata in modo logaritmico) era la variabile dipendente in tutti i modelli di regressione lineare. Ogni ceramide era espressa come incremento di 1-deviazione standard (SD).

*Modello aggiustato 2: questa associazione rimaneva statisticamente significativa anche dopo ulteriore aggiustamento per molteplicità utilizzando la procedura di Benjamini-Hochberg (con un FDR di 0.05).

Tabella supplementare 2. Associazione tra concentrazioni di ceramidi plasmatiche e la presenza di stenosi $\geq 50\%$ a livello della arteria discendente anteriore (LAD), dopo esclusione di pazienti con infarto miocardico acuto con elevazione del tratto ST (STEMI).

Analisi di regressione logistica	Odds Ratio (95% IC)	P value
Modello aggiustato 1		
Cer(d18:1/16:0) (1-SD incremento, i.e. 0.10 umol/L)	1.16 (0.82-1.05)	0.40
Età (anni)	1.01 (0.98-1.05)	0.42
Sesso (maschi vs. femmine)	1.54 (0.71-3.34)	0.27
Modello aggiustato 2		
Cer(d18:1/16:0) (1-SD incremento, i.e. 0.10 umol/L)	1.22 (0.84-1.79)	0.29
Età (anni)	1.01 (0.98-1.05)	0.46
Sesso (maschi vs. femmine)	1.44 (0.63-3.29)	0.38
Storia di fumo (sì vs. no)	0.99 (0.60-1.62)	0.97
Precedente storia di CAD (sì vs. no)	2.07 (0.94-4.56)	0.07
Diabete (sì vs. no)	1.35 (0.54-3.33)	0.52
Ipertensione (sì vs. no)	0.58 (0.22-1.47)	0.25
Dislipidemia (sì vs. no)	1.25 (0.46-3.39)	0.66
hs-CRP (mg/L)	1.00 (0.99-1.02)	0.71
e-GFR (mL/min/1.73 m ²)	0.99 (0.98-1.01)	0.57
Modello aggiustato 1		
Cer(d18:1/18:0) (1-SD incremento, i.e. 0.06 umol/L)	1.28 (0.88-1.86)	0.19
Età (anni)	1.01 (0.98-1.04)	0.48
Sesso (maschi vs. femmine)	1.58 (0.73-3.39)	0.24
Modello aggiustato 2		

Cer(d18:1/18:0) (1-SD incremento, i.e. 0.06 umol/L)	1.36 (0.92-2.02)	0.13
Età (anni)	1.01 (0.98-1.05)	0.47
Sesso (maschi vs. femmine)	1.45 (0.64-3.31)	0.38
Storia di fumo (si vs. no)	1.00 (0.61-1.64)	0.99
Precedente storia di CAD (sì vs. no)	2.15 (0.98-4.74)	0.06
Diabete (si vs. no)	1.32 (0.54-3.27)	0.54
Ipertensione (si vs. no)	0.53 (0.20-1.36)	0.19
Dislipidemia (si vs. no)	1.29 (0.47-3.53)	0.62
hs-CRP (mg/L)	1.00 (0.99-1.02)	0.85
e-GFR (mL/min/1.73 m ²)	0.99 (0.98-1.01)	0.67
Modello aggiustato 1		
Cer(d18:1/20:0) (1-SD incremento, i.e 0.04 umol/L)	1.37 (0.96-1.94)	0.08
Età (anni)	1.01 (0.98-1.04)	0.48
Sesso (maschi vs. femmine)	1.62 (0.76-3.46)	0.22
Modello aggiustato 2		
Cer(d18:1/20:0) (1-SD incremento, i.e 0.04 umol/L)	1.49 (1.03-2.17)	0.035
Età (anni)	1.01 (0.98-1.05)	0.47
Sesso (maschi vs. femmine)	1.45 (0.64-3.32)	0.37
Storia di fumo (si vs. no)	0.98 (0.59-1.61)	0.93
Precedente storia di CAD (sì vs. no)	2.33 (1.05-5.20)	0.010
Diabete (si vs. no)	1.52 (0.61-3.83)	0.37
Ipertensione (si vs. no)	0.50 (0.19-1.31)	0.37
Dislipidemia (si vs. no)	1.18 (0.43-3.25)	0.75
hs-CRP (mg/L)	1.00 (0.98-1.02)	0.91

e-GFR (mL/min/1.73 m ²)	0.99 (0.98-1.01)	0.71
Modello aggiustato 1		
Cer(d18:1/22:0) (1-SD incremento, i.e. 0.29 umol/L)	1.45 (1.02-2.07)	0.041
Età (anni)	1.02 (0.99-1.05)	0.24
Sesso (maschi vs. femmine)	1.63 (0.76-3.48)	0.21
Modello aggiustato 2		
Cer(d18:1/22:0) (1-SD incremento, i.e. 0.29 umol/L)	1.70 (1.14-2.54)	0.010*
Età (anni)	1.02 (0.98-1.06)	0.28
Sesso (maschi vs. femmine)	1.43 (0.63-3.29)	0.39
Storia di fumo (sì vs. no)	1.02 (0.62-1.69)	0.94
Precedente storia di CAD (sì vs. no)	2.73 (1.19-6.28)	0.019
Diabete (sì vs. no)	1.63 (0.64-4.13)	0.30
Ipertensione (sì vs. no)	0.55 (0.21-1.46)	0.23
Dislipidemia (sì vs. no)	1.08 (0.38-3.00)	0.88
hs-CRP (mg/L)	0.99 (0.98-1.02)	0.93
e-GFR (mL/min/1.73 m ²)	0.99 (0.98-1.01)	0.62
Modello aggiustato 1		
Cer(d18:1/24:0) (1-SD incremento, i.e. 1.15 umol/L)	1.41 (1.00-2.00)	0.05
Età (anni)	1.02 (0.99-1.06)	0.23
Sesso (maschi vs. femmine)	1.52 (0.72-3.22)	0.27
Modello aggiustato 2		
Cer(d18:1/24:0) (1-SD incremento, i.e. 1.15 umol/L)	1.66 (1.11-2.49)	0.013*
Età (anni)	1.02 (0.98-1.06)	0.26

Sesso (maschi vs. femmine)	1.32 (0.58-3.01)	0.50
Storia di fumo (si vs. no)	1.03 (0.62-1.70)	0.92
Precedente storia di CAD (sì vs. no)	2.67 (1.16-6.11)	0.020
Diabete (si vs. no)	1.76 (0.69-4.49)	0.24
Ipertensione (si vs. no)	0.56 (0.21-1.49)	0.25
Dislipidemia (si vs. no)	0.97 (0.34-2.74)	0.94
hs-CRP (mg/L)	1.00 (0.98-1.02)	0.93
e-GFR (mL/min/1.73 m ²)	0.99 (0.98-1.01)	0.54
Modello aggiustato 1		
Cer(d18:1/24:1) (1-SD incremento, i.e. 0.37 umol/L)	1.21 (0.86-1.71)	0.27
Età (anni)	1.01 (0.97-1.04)	0.54
Sesso (maschi vs. femmine)	1.53 (0.72-3.25)	0.27
Modello aggiustato 2		
Cer(d18:1/24:1) (1-SD incremento, i.e. 0.37 umol/L)	1.26 (0.86-1.82)	0.23
Età (anni)	1.01 (0.97-1.05)	0.56
Sesso (maschi vs. femmine)	1.39 (0.62-3.15)	0.42
Storia di fumo (si vs. no)	1.03 (0.62-1.68)	0.92
Precedente storia di CAD (sì vs. no)	2.04 (0.93-4.45)	0.07
Diabete (si vs. no)	1.33 (0.54-3.28)	0.54
Ipertensione (si vs. no)	0.56 (0.21-1.43)	0.22
Dislipidemia (si vs. no)	1.30 (0.48-3.54)	0.60
hs-CRP (mg/L)	1.00 (0.98-1.02)	0.80
e-GFR (mL/min/1.73 m ²)	0.99 (0.98-1.01)	0.56
Dimensione del campione, $n = 152$, dopo esclusione di pazienti con STEMI acuto ($n=15$). I dati		

sono espressi come odds ratio e 95% intervallo di confidenza (CI) 95% intervallo di confidenza (IC) sulla base di analisi di regressione logistica multivariata. La presenza di stenosi a livello della arteria discendente anteriore $\geq 50\%$ era la variabile dipendente in tutti i modelli di regressione lineare lineare multivariata.

*Modello aggiustato 2: questa associazione rimaneva statisticamente significativa anche dopo ulteriore aggiustamento per molteplicità utilizzando la procedura di Benjamini -Hochberg (con un FDR di 0.05).

Tabella supplementare 3. Associazione tra le concentrazioni delle ceramidi plasmatiche e la severità angiografica delle stenosi coronariche valutata mediante lo *score* di Gensini dopo esclusione di pazienti con infarto miocardico acuto con elevazione del tratto ST.

Analisi di regressione logistica	Odds Ratio	95% IC	<i>P</i> value
Cer(d18:1/16:0) (1-SD incremento, i.e., 0.10 umol/L)			
Modello aggiustato 1	0.91	0.63 – 1.31	0.62
Modello aggiustato 2	1.08	0.72 – 1.62	0.69
Cer(d18:1/18:0) (1-SD incremento, i.e. 0.06 umol/L)			
Modello aggiustato 1	1.29	0.86 – 1.93	0.21
Modello aggiustato 2	1.51	1.00 – 2.42	0.054
Cer(d18:1/20:0) (1-SD incremento, i.e. 0.04 umol/L)			
Modello aggiustato 1	1.28	0.88 – 1.85	0.19
Modello aggiustato 2	1.56	1.03 – 2.32	0.034
Cer(d18:1/22:0) (1-SD incremento, i.e. 0.29 umol/L)			
Modello aggiustato 1	1.18	0.82 – 1.67	0.38
Modello aggiustato 2	1.57	1.04 – 2.39	0.031
Cer(d18:1/24:0) (1-SD incremento, i.e. 1.15 umol/L)			
Modello aggiustato 1	1.16	0.81 – 1.64	0.42

Modello aggiustato 2	1.54	1.01 – 2.31	0.047
Cer(d18:1/24:1) (1-SD incremento, i.e., 0.37 umol/L)			
Modello aggiustato 1	1.13	0.79 – 1.62	0.50
Modello aggiustato 2	1.32	0.88 – 1.99	0.17
<p>Dimensione del campione, n=152 dopo esclusione di pazienti con STEMI acuto (n=15). I dati sono espressi come odd ratio (s) e intervallo di confidenza (IC). Lo <i>score</i> di Gensini (incluso come variabile categorica, ossia, 1st terzile vs. 2nd and 3rd terzile combinati) era la variabile dipendente in tutti i modelli di regressione logistica multivariata. Ogni ceramide plasmatica era espressa per incremento di 1-SD.</p> <p>Altre covariate incluse nei modelli di regressione logistica multivariata (insieme ad ogni ceramide) erano le seguenti: <u>modello 1</u> aggiustato per età e sesso; <u>modello 2</u>: aggiustato per fumo, precedente storia di CAD; diabete (definito come diabete riferito diagnosticato da un medico o dall'utilizzo di farmaci ipoglicemizzanti), ipertensione (pressione sanguigna $\geq 140/90$ mmHg o trattamento farmacologico), dislipidemia (colesterolo LDL ≥ 2.6 mmol/L o trattamento farmacologico), valori di hs-CRP ed e-GFR_{MDRD} plasmatici.</p>			