



# Università degli Studi di Ferrara

DOTTORATO DI RICERCA IN  
"FARMACOLOGIA E ONCOLOGIA MOLECOLARE"

CICLO XXVII

COORDINATORE Prof. Antonio Cuneo

## Effetto dell'ivabradina nelle fasi iniziali e nella progressione dell'aterosclerosi

Settore Scientifico Disciplinare: MED/15

**Dottorando**

Dott. Marco Bruno Morelli

**Tutore:**

Prof. Antonio Cuneo

**Co-tutore:**

Dr.ssa Paola Rizzo

anno 2012-2014



# SOMMARIO

1. SCOPO DELLO STUDIO .....	5
2. INTRODUZIONE.....	6
2.1 La struttura delle arterie.....	6
2.2 Caratteristiche emodinamiche del sistema arterioso.....	8
2.3 Aterosclerosi: influenza dell'ESS nelle lesioni della parete arteriosa .....	12
2.3.1 Le basi dell'aterosclerosi.....	12
2.4 Ivabradina e protezione vascolare: meccanismo d'azione del farmaco.....	21
3 OBIETTIVI DELLO STUDIO.....	25
4 MATERIALI E METODI.....	26
4.5 Estrazione dell'RNA arricchito della componente endoteliale dall'arco aortico.....	31
4.6 Analisi microarray: esperimento di settaggio .....	32
4.7 Analisi <i>microarray</i> : valutazione degli effetti del trattamento.....	33
4.8 Analisi <i>en face</i> e lesione della parete dell'arco aortico: studio di settaggio .....	35
4.9 Analisi <i>en face</i> e lesione della parete dell'arco aortico: valutazione degli effetti del trattamento.....	36
Farmaco utilizzato .....	37
5. RISULTATI E DISCUSSIONE.....	38
5.1 Ivabradina ed espressione genica: studi di settaggio .....	38
5.2 Ivabradina ed espressione genica: valutazione degli effetti del trattamento.....	42
5.3 Ivabradina e progressione aterosclerotica: studi di settaggio .....	54
5.4 Ivabradina e progressione aterosclerotica: valutazione degli effetti del trattamento.....	58
6. CONCLUSIONI .....	60
7. DATI SUPPLEMENTARI.....	61



# 1. SCOPO DELLO STUDIO

Numerosi studi condotti sull'uomo e su animali hanno evidenziato una relazione tra elevata frequenza cardiaca (HR) e maggiore propensione allo sviluppo di placche aterosclerotiche in regioni arteriose caratterizzate da flusso emodinamico disturbato (come ad esempio l'arco aortico) [1–4]. Farmaci bradicardizzanti, tra cui l'ivabradina, sono stati impiegati in modello animale di dislipidemia per verificare se la riduzione della HR comportasse una minore propensione allo sviluppo di lesioni aterosclerotiche in diversi distretti arteriosi[2,5,6]. Tuttavia, gli studi finora condotti erano rivolti nel determinare l'effetto degli agenti bradicardizzanti in animali, spesso di età avanzata, in cui il danno aterosclerotico era già in corso di formazione ed accelerato dalla somministrazione di elevate quantità di grassi con la dieta [7,8].

Il nostro studio ha voluto indagare l'effetto protettivo dell'ivabradina rispetto all'alterazione dell'espressione genica endoteliale nell'arco aortico di topi dislipidemici (ApoE<sup>-/-</sup>) nella fase precoce del danno vasale, e in condizioni di decorso aterosclerotico non accelerato (dieta non arricchita in grassi).

Inoltre abbiamo indagato se la somministrazione di ivabradina, fin dalle prime settimane di vita, è in grado di ridurre la progressione delle lesioni aterosclerotiche.

## 2. INTRODUZIONE

### 2.1 La struttura delle arterie

L'arteria è un vaso specializzato per il trasporto del sangue in senso centrifugo, cioè dal cuore verso i tessuti più distali del corpo. La struttura delle arterie è costituita da tre strati concentrici, o tuniche, disposte dal lume verso l'esterno del vaso nel modo seguente: una tonaca intima, una tonaca media e una tonaca avventizia. La struttura e composizione delle tre tuniche è diversa in base al calibro delle arterie e ciò ne determina le caratteristiche passive (elasticità e distensibilità) e attive (contrattilità).

La tonaca intima è costituita da tre strati sovrapposti: un monolayer di cellule endoteliali (EC) o endotelio che si affaccia sul lume del vaso, un sottostante strato di tessuto connettivo lasso denominato lamina basale, e un terzo strato di tessuto connettivo elastico denominato membrana elastica interna.

L'endotelio è un epitelio pavimentoso semplice, riveste l'intero sistema circolatorio e si trova a diretto contatto con il sangue con da cui è in grado di scambiare sostanze nutritive e metaboliti attraverso la membrana cellulare. Permettere il passaggio diretto dal lume ai tessuti vasali sottostanti di cellule (ad es. per chemiotassi leucocitaria) ma anche di molecole come lipoproteine e grassi, mentre lo strato sottoendoteliale può rappresentare un deposito di materiali assorbiti. Dunque l'endotelio gioca un ruolo critico nel regolare l'entrata e l'uscita ed il metabolismo delle lipoproteine e di altri agenti che possono partecipare alla formazione di lesioni a carico della parete vasale.

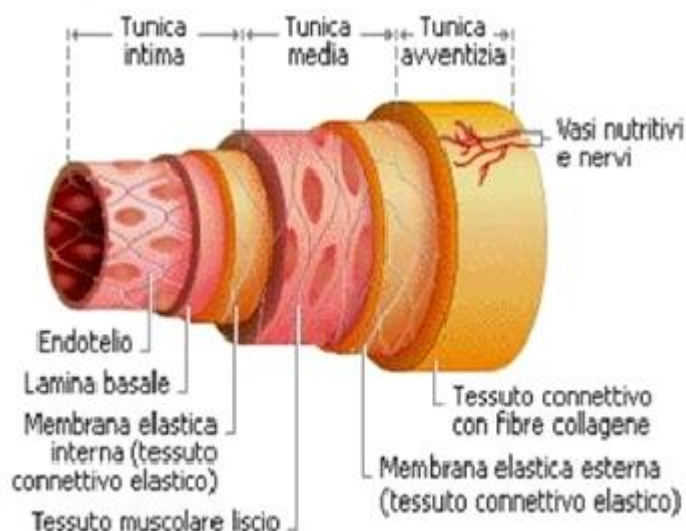
Non presenta grande resistenza agli insulti meccanici ma ha una notevole capacità di rigenerazione. Le cellule endoteliali delle arterie modificano la loro forma in base alle condizioni emodinamiche. Nelle regioni arteriose con flusso laminare presentano forma allungata e appaiono più grandi con disposizione allineata nella direzione del flusso, mentre nelle regioni di flusso disturbato presentano forma poligonale e più piccola, e non si dispongono in particolari orientamenti.

La lamina basale è costituita da fibroblasti e dalle fibre di collagene e poggia sulla lamina elastica che separa idealmente la tonaca intima della media. La lamina elastica contribuisce all'elasticità del vaso ed è fenestrata per favorire il passaggio delle sostanze nutritive dal sangue alla tonaca media.

La tonaca media è lo strato più spesso della parete arteriosa, è costituita da strati concentrici di elastina, separati da sottili strati di tessuto connettivo, fibre di collagene e cellule muscolari lisce (SMC). Le SMC, oltre a sintetizzare fibre elastiche e collagene, determinano le proprietà meccaniche della parete arteriosa e sono attivamente coinvolte

nei processi metabolici che contribuiscono al tono della parete. Questa tonaca vasale, infatti, è responsabile del mantenimento entro un certo *range* di valori della pressione arteriosa a fluttuazioni del volume ematico e garantisce una maggiore continuità del flusso sanguigno tra una gittata cardiaca e la successiva, dunque determina la *compliance* (o capacità) arteriosa. Queste proprietà sono determinate dai filamenti di actina presenti nelle SMC che si contraggono in risposta alla depolarizzazione della membrana cellulare e generano tensione. Nelle grandi arterie le SMC tendono ad essere allineate longitudinalmente, con fibre di collagene che intrecciano strettamente ad esse. Le fibre di elastina, che si interpongono tra le SMC sono relativamente estensibili e permettono la contrazione e la distensione della parete dell'arteria in relazione alla pressione del flusso sanguigno durante il ciclo cardiaco. Verso la porzione esterno del vaso le SMC sono circondate da una comune membrana elastica fenestrata, che separa idealmente la tonaca media dalla avventizia.

La tonaca avventizia è lo strato più esterno delle arterie, fornisce protezione delle tuniche sottostanti e permette l'ancoraggio delle arterie a tessuti e organi. È costituita da tessuto connettivo contenente fibre sparse di elastina e di collagene, ma data la limitata elasticità di queste strutture questo strato pone un limite alla dilatazione del vaso. Nei grandi vasi la tonaca avventizia è decorsa da plessi nervosi, vasi linfatici e capillari. In particolare, l'avventizia delle arterie di grosso calibro riceve le sostanze nutritive dai "vasa-vasorum", un microcircolo che si dirama fino a raggiungere ed irrorare la tonaca media.



**Figura 1:** rappresentazione schematica della struttura della parete di una arteria

La descrizione qui riportata della struttura delle arterie è stata elaborata dalle seguenti fonti: Bloom & Fawcett. Istologia - Mc Graw Hill, Anatomia Umana di Frederic H. Martini - Edises-.

## 2.2 Caratteristiche emodinamiche del sistema arterioso

### 2.2.1 Tipologie di flusso arterioso e definizione di Endothelial Shear Stress (ESS)

Nel sistema arterioso umano a velocità di flusso sanguigno fisiologiche, quindi a valori di numero di Reynold ( $Re$ )  $< 2000$  (fatto eccezione del tratto ascendente dell'aorta che raggiunge mediamente valori intorno ai  $6000 Re$  [9]), sono presenti tre condizioni emodinamiche: il flusso (o regime) laminare indisturbato (o più semplicemente laminare), il flusso laminare disturbato (o più semplicemente disturbato), e il flusso turbolento. Il flusso laminare si instaura nei tratti arteriosi relativamente dritti (a geometria lineare), quindi con l'asse centrale del vaso allineato con la direzione del flusso ematico[9,10]. In questa condizione emodinamica le molecole di sangue (o lamine in cui può essere suddiviso il fluido) si muovono parallelamente tra loro con velocità massima lungo l'asse centrale dell'arteria, tuttavia l'energia cinetica delle lamine diviene sempre minore dal centro del lume alla parete dell'arteria seguendo l'asse trasversale al flusso.[9,11] Questo fenomeno, che determina il caratteristico profilo parabolico del regime laminare indisturbato, è dovuto alla forza di attrito tangenziale, definita anche *shear stress* ( $SS$ ), che si instaura tra la parete arteriosa e le lamine di sangue che scorrono a contatto con essa. Le particelle al centro del vaso si muovono, dunque, più velocemente in quanto risentono in misura minore dell'effetto dissipativo dell'energia cinetica, al contrario a ridosso della parete vasale, dove le forze di attrito (o  $SS$ ) sono molto alte, l'effetto dissipativo della energia cinetica diviene maggiore [11,12]. Dato che nei vasi sanguigni la superficie che si oppone al movimento del sangue è costituita da un *monolayer* di cellule endoteliali, la forza di resistenza allo scorrimento del flusso prende il nome di *endothelial shear stress* (ESS) [12].

Dato che L'ESS definisce una forza di attrito tangenziale che si instaura su una superficie, la sua magnitudo, ovvero il valore di intensità della forza, viene espressa utilizzando il  $\text{dyne/cm}^2$ :  $10 \text{ dyne/cm}^2 = 1 \text{ Pa} = 1 \text{ N/cm}^2$ . Si noti che il  $\text{dyne/cm}^2$  è una unità di misura riconducibile alla pressione, dato che può essere convertito in Pascal; dunque l'ESS può essere anche definito come una pressione tangenziale alla parete del tubo (vaso arterioso) prodotta dallo scorrimento di lamine di fluido (sangue) tra loro parallele e avanti velocità allineata con la direzione del flusso [13].

In base a quanto detto, si evince che in condizione di flusso laminare indisturbato si determina una condizione di *high ESS* (hESS), ovvero le forze di attrito si esercitano efficacemente e presentano valori elevati, che in molti distretti arteriosi superano i  $20 \text{ dyne/cm}^2$ . Tali valori sono da considerarsi sempre positivi, per via dell'allineamento del



vettore velocità e del vettore della forza esercitata dal flusso sulla parete vasale con la direzione di scorrimento delle lamine [14].

Il flusso disturbato si instaura nelle regioni arteriose in cui sono presenti curvature pronunciate, biforcazioni o giunzioni a T, diramazioni di un vaso principale nei suoi rami collaterali (geometria complessa) o improvvise variazioni del diametro del vaso a causa di parziali ostruzioni o aneurismi [9,15,16]. Questo flusso è caratterizzato da una forte instabilità nell'andamento delle lamine del fluido (ovvero il sangue), che non scorreranno più con elevata probabilità parallelamente una rispetto all'altra, determinando un profilo di flusso parabolico per via della maggiore dissipazione della velocità passando dal centro alle pareti del vaso (come nel regime laminare) [12]. Il flusso disturbato assume, piuttosto, un profilo di flusso schiacciato, in cui permane solo una parziale distribuzione laminare delle molecole del sangue in alcuni punti [12]. Nel flusso disturbato diventa, quindi, preponderante la componente costituita da lamine aventi punti di separazione in diverse direzioni con formazione di ricircoli e moti vorticosi a forma elicoidale o a spirale, che spesso confluiscono verso la parete del vaso [17,18]. Una propagazione del flusso arterioso con questo andamento causa la mancata instaurazione di efficaci forze di attrito tra il sangue e le pareti vasali, con conseguente caduta dei valori di ESS. In particolare si distinguono due tipologie di valori di ESS generati dal regime disturbato: il low ESS (lESS) e l'oscillatory ESS (oESS) [9].

Il lESS è generato da flussi arteriosi che presentano zone di separazione delle lamine ma in cui permane un andamento unidirezionale, ovvero non si manifestano componenti circolari, vorticosi o retrograde del flusso. lESS presenta valori di magnitudo molto bassi, solitamente compresi tra i 4 e i 12 dyne/cm<sup>2</sup>, ma sempre positivi per via dell'allineamento del vettore velocità e del vettore della forza esercitata sulla parete vasale rispetto alla direzione del flusso (o verso dello scorrimento) [9,19,20].

L'oESS è generato da flussi arteriosi disturbati in cui predominano le componenti bidirezionali, che culminano in zone di ricircolo e formazione di vortici o flussi rotatori. L'oESS presenta una magnitudo che in uno stesso punto della regione arteriosa considerata può assumere sia valori debolmente positivi, compresi tra i 4 e i 12 dyne/cm<sup>2</sup>, che debolmente negativi e compresi entro lo stesso *range*, tra i -4 e i -12 dyne/cm<sup>2</sup> [4,9,19]. Questa natura ambivalente delle forze in gioco è dovuta alle improvvise inversioni del vettore velocità e del vettore della forza esercitata sulla parete vasale rispetto alla direzione del flusso (o verso dello scorrimento).

La terza tipologia di flusso riscontrabile nell'albero arterioso umano, ovvero il regime turbolento, rappresenta una condizione emodinamica inusuale in condizioni fisiologiche. Studi hanno evidenziato che in soggetti sani il flusso turbolento è misurabile solo in condizioni di intenso esercizio o sforzo fisico, ed è circoscritto al solo tratto ascendente

dell'aorta e in alcune arterie del sistema nervoso centrale, in corrispondenza della fase sistolica del ciclo cardiaco [4,9] [21]. In condizioni patologiche il flusso turbolento è stato descritto a valle di stenosi arteriose severe o in corrispondenza di regioni aneurismatiche. Data la scarsa rilevanza di questo tipo di flusso nell'albero arterioso umano, pochi studi sono stati condotti su questa condizione emodinamica, ed erano concentrati principalmente sulla misurazione strumentale di questo tipo di flusso con anemometri laser doppler o con ecodoppler in soggetti patologici e sani.

Tra i lavori che contribuirono maggiormente a chiarire gli aspetti fin qui descritti, vanno ricordati quelli di Ku DN, Zarins CK e Giddens DP, che studiarono, nella prima metà degli anni '80, le caratteristiche emodinamiche e gli effetti sulla parete vasale del flusso arterioso presente nella biforcazione del seno carotideo umano. Questi autori ebbero, inoltre, il merito di studiare nel dettaglio un aspetto in precedenza già sollevato ma poco indagato. Nei loro studi, Zarins CK, Giddens DP e Ku DN utilizzarono modelli artificiali di biforcazione carotidea umana e misurarono valori molto positivi (fino a 50 dynes/cm<sup>2</sup>) di hESS durante tutta la fase diastolica, che incrementavano ulteriormente insieme alla velocità del flusso durante la fase sistolica nei tratti a regime laminare (geometria vasale lineare) [4,22]. Di converso nei punti di flusso disturbato (geometria vasale complessa) durante la fase sistolica vi era un aumento della velocità del sangue con conseguente decremento dei valori di IESS e oESS, che risultavano già bassi o negativi quando misurati in fase diastolica [4,22]. Altri autori replicarono studi di questo tipo in diversi distretti arteriosi (ad es. albero coronarico), confermando che la natura pulsatile del flusso aumenta ulteriormente l'instabilità emodinamica nelle regioni vasali a geometria complessa, a causa delle variazioni cicliche di volume e accelerazione del sangue nelle arterie durante il ciclo cardiaco [4,23–25]. Ciò conferisce un andamento pulsatile del high ESS e molto instabile del low and oscillatory ESS.

### **2.2.2 Definizione di Tensile Stress**

Lo *stress tensile* (TS), definito come la pressione trasmurale (o stress circonferenziale) imposta dal sangue sulla parete arteriosa, è una forza emodinamica che può influenzare la fisiologia arteriosa ed è generata dal transitorio aumento della pressione che si esercita sulla parete arteriosa a causa del volume sistolico espulso con l'eiezione cardiaca [19,23,26]

Dunque la magnitudo, ovvero l'intensità, del TS subisce variazioni cicliche raggiungendo l'intensità massima durante la fase di sistole [26,26].

Gli studi in vivo condotti su uomo ed animali indicano, che seppur con ruolo minore rispetto alle forze di ESS, il TS può esercitare degli effetti negativi sui processi

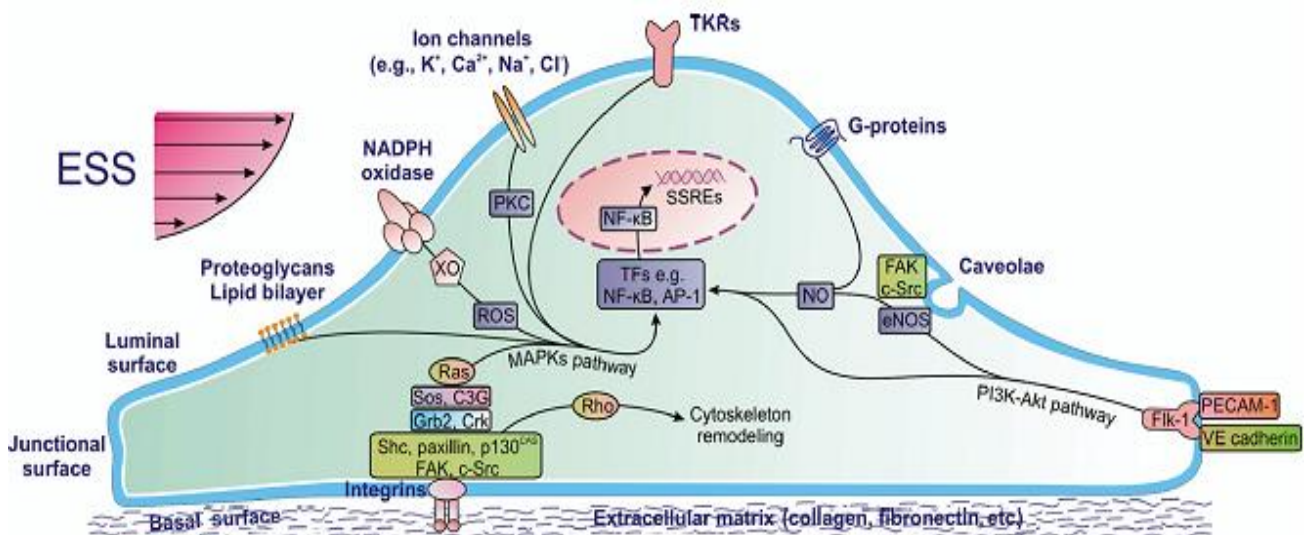
patofisiologici a carico delle pareti arteriose. Questo si verifica in particolare in condizioni patologiche o scompensi cardiaci già presenti e non ben controllati e che possono indurre moderata-media tachicardia, ad esempio nell'uomo una frequenza cardiaca >70 bpm (battiti per minuto) può costituire un meccanismo compensatorio nel tentativo di risolvere un calo dell'output cardiaco [27]. Si ritiene, dunque, che un aumento significativo del HR a riposo possa determinare alti livelli di stress meccanico sulle pareti arteriose (*"fatigue effect"*), specie se in presenza di ipertensione arteriosa [28,29]. Studi condotti su scimmie con elevato HR (indotto tramite condizioni di stress psicologico) alimentate con dieta ricca in grassi e normale, portarono a modeste o poco chiare evidenze sul contributo del TS nello sviluppo delle lesioni della parete arteriosa. Negli animali la presenza di elevata HR, anche in assenza di dieta grassa, comportava lesioni endoteliali confinate alle regioni in cui è noto l'instaurarsi di forze di ESS non protettive (geometria complessa), mentre l'endotelio di regioni arteriose a geometria lineare e prive di biforcazioni appariva non lesionato [30]. Al contrario studi clinici evidenziarono che soggetti con elevata HR e ipertensione, presentavano rigidità delle pareti arteriose la cui progressione accelerava con l'età, a sostegno di un probabile coinvolgimento del TS nel processo degenerativo a carico delle principali arterie [31,32].

### **2.2.3 Dall'emodinamica all'espressione genica endoteliale**

Come discusso in precedenza, i flussi emodinamici presenti nelle diverse regioni arteriose determinano l'instaurarsi di forze di ESS, che in base alla loro intensità vengono definite *high ESS*, *low ESS* e *oscillatory ESS* [9].

Le cellule endoteliali (EC) risentono delle differenti forze di ESS, rispondendo in modo diverso in base alla stimolazione ricevuta, grazie alla presenza di una serie di "sensori" delle forze di flusso, ovvero meccanorecettori posti sulla membrana cellulare, come ad esempio: canali ionici mecano-sensibili, proteine G, recettori tirosin chinasi (TRK), NADPH ossidasi [33] (figura 2). Queste proteine di membrana "sensori del flusso" modulano una serie di effettori intracellulari che convergono principalmente nel *pathway* delle proteine chinasi attivate dai mitogeni (MAP chinasi, o MAPK) o nella modulazione della sintasi endoteliale dell'ossido nitrico (eNOS), con conseguente produzione o soppressione di ossido nitrico (NO) [34]. Inoltre le forze di ESS, sollecitando direttamente la struttura citoscheletrica delle cellule endoteliali, trasmettono stimoli meccanici che percorrono tutta la cellula e che vanno ad attivare glicoproteine transmembranarie chiamate integrine ed altri meccanosensori, presenti sulla superficie basale e giunzionale della cellula [35]. Le integrine, se attivate da opportuni stimoli di ESS, possono fosforilare

una serie di tirosin chinasi intracellulari (come la *focal adhesion kinase* o FAK o la proteina tirosina-chinasi proto-oncogena, o c-Scr) che convergono i loro segnali sulle Ras-GTPasi la cui attività gioca un ruolo chiave nell'attivazione delle MAP chinasi [36,37]. Inoltre le integrine attivano vie di segnalazione coinvolte nel rimodellamento del citoscheletro e ciò spiega perché le cellule endoteliali acquistano, sia in vivo che in vitro, una morfologia molto differente in base alle condizioni di flusso presenti [36,38]. L'attivazione o lo spegnimento del pathway delle MAP chinasi così come quella del NO o altri ancora, in base alle vie di segnalazione attivate dalle diverse forze di ESS che agiscono sulle cellule endoteliali, si riflette sul tipo di fattori di trascrizione (TF) fosforilati e quindi reclutati. I fattori di trascrizione possono legare *positive or negative shear stress responsive elements* (SSRE), ovvero sequenze presenti sui promotori dei geni indotti dal ESS (geni meccanosensibili) [24,39]. In base al tipo di SSRE legate dai fattori di trascrizione, viene indotta o soppressa l'espressione di vari geni che promuovono un fenotipo protettivo o pro-lesivo nelle cellule endoteliali.



**Figura 2:** rappresentazione dei meccanosensori di membrana e dei principali pathway endoteliali influenzati dalle forze di ESS. Si noti i flussi emodinamici possono influenzare l'attività trascrizionale di NF-kB, principalmente influenzando il pathway delle MAP chinasi o l'attività dell'enzima eNOS.

## 2.3 Aterosclerosi: influenza dell'ESS nelle lesioni della parete arteriosa

### 2.3.1 Le basi dell'aterosclerosi

L'aterosclerosi è una malattia sistemica multifocale e progressiva che interessa le tonache intima e media delle arterie di grosso e medio calibro, con formazione di placche focali

costituite da tessuto fibroso e materiale lipidico. Questo processo patologico dà luogo a una vasta sintomatologia in base al distretto arterioso interessato e si manifesta tardivamente rispetto alla sua insorgenza. La prima descrizione del processo aterosclerotico risale al 1755 ad opera del fisiologo svizzero Albrecht von Haller, che nell'opera *Opuscula Pathologica* propose il termine "ateroma", dal greco "athere" cioè "pappa", ad indicare il materiale grasso, poltaceo, contenuto nelle placche da lui identificate. Nel 1829 il chirurgo e patologo francese Jean Lobstein introdusse il termine "arteriosclerosi" nel suo *Traité d'Anatomie Pathologique*, per descrivere l'anatomia di arteriopatie in cui Lobstein documentava macroscopici processi di inspessimento della parete e che definì sclerotiche, dal greco "scleros", cioè "indurimento". L'attuale termine "aterosclerosi" è stato invece avanzato nel 1904 al XXI congresso di medicina interna da Felix Marchand, che unì le parole "athere" e "scleros", per sottolineare la presenza di un core lipidico nelle zone di inspessimento della parete arteriosa. Marchand fu il primo a capire che il processo patologico dell'aterosclerosi avviene a livello dell'intima vasale, e indicò questo fenomeno come base eziologica di gran parte delle lesioni ostruttive che si verificano nelle arterie [40] [41].

Dalle prime descrizioni dell'aterosclerosi ai giorni nostri, una vasta quantità di studi sono stati condotti sulle cause e sui meccanismi patofisiologici responsabili della generazione e progressione delle lesioni. In base alle conoscenze attuali i fattori considerati proaterogeni vengono divisi in due classi principali: sistemici ed emodinamici [41].

Tra i principali fattori sistemici troviamo: l'età e il sesso del soggetto, le caratteristiche genetiche, la presenza di malattie cardiovascolari, ormonali e metaboliche (come l'ipertensione, l'ipercolesterolemia, iperlipidemia, diabete, ipotiroidismo) e lo stile di vita (tra cui dieta ricca in grassi, obesità, sedentarietà, fumo, stress) [27] [42] [[43–45].

I fattori emodinamici, largamente influenzati dai fattori sistemici, consistono nelle forze di attrito tangenziali all'endotelio (ESS), determinate dal flusso arterioso, e stress tensile (TS), imposto in seguito alla fase sistolica; tuttavia l'ESS sembra esercitare il ruolo principale in senso ateroprotettivo o aterogenico [25].

Durante gli anni '60 grazie all'attività di ricerca di vari autori, tra cui McGill HC Jr e Strong JP, emersero le prime osservazioni sulle cause ed evoluzione delle lesioni aterosclerotiche, e sulla peculiare caratteristica di queste lesioni di presentarsi principalmente in siti preferenziali di danno, ponendo le basi per ciò che anni più tardi divenne una evidenza [46–48]. Dunque i processi aterosclerotici non tendono ad essere ubiquitari in tutto il sistema arterioso ma, sia nell'uomo che nelle cavie, si sviluppano per lo più in specifici siti, quali: le coronarie, l'arco aortico, l'aorta addominale, le carotidi (in particolare nella biforcazione del seno carotideo), il circolo di Willis [25].

Nel 1969 Caro GC et al. pubblicò il primo lavoro in cui evidenziò una correlazione tra la distribuzione spaziale delle diverse forze di ESS e la localizzazione di lesioni ateromatose precoci nell'uomo; ciò diede il via ad una vasta serie di studi, volti a delineare i meccanismi con i quali l'emodinamica predispone all'aterosclerosi [16]. Oggi, a più di 40 anni dalle prime osservazioni di Caro, molti degli eventi molecolari che portano alla generazione e alla progressione delle lesioni aterosclerotiche sono stati identificati, e sono state chiarite le basi molecolari che permettono alle forze imposte dal flusso ematico di spegnere o accendere specifici geni, regolando l'omeostasi endoteliale [16].

Di seguito verranno trattati nel dettaglio gli eventi molecolari della aterosclerosi, focalizzando l'attenzione sul ruolo pro-aterogenico o anti-aterogenico svolto dalle forze di ESS.

### **2.3.2 Le fasi del processo aterosclerotico**

L'aterosclerosi è un processo patologico progressivo e discontinuo, che presenta una reversibilità entro la fase precoce della lesione, ovvero dopo la formazione della stria lipidica. La reversibilità della fase precoce è fortemente influenzata dalle condizioni presenti [49–51]; fattori pro-aterogenici tenderanno a far evolvere la stria lipidica in lesioni avanzate, che alterano irreversibilmente e in modo via via maggiore gli strati più profondi della parete arteriosa [45,52,53]. Le fasi della aterosclerosi possono essere così riassunte [54]:

- 1. fase iniziale:** alterazione dell'espressione genica e perdita dell'omeostasi endoteliale, con conseguente iperproliferazione delle EC e perdita di integrità della superficie (pavimentazione) vasale;
- 2. fase intermedia (lesione reversibile):** infiltrazione delle lipoproteine nella lamina basale seguito da processi di lipoperossidazione, attivazione della risposta infiammatoria, chemiotassi dei leucociti e differenziazione dei monociti/macrofagi in *foam cells*: formazione della stria lipidica;
- 3. fase avanzata:** migrazione e proliferazione delle cellule muscolari lisce con produzione di collagene e matrice extracellulare (ECM), alterazione della struttura della parete vasale e formazione del rivestimento fibrotico (placca);
- 4. fase finale:** calcificazione e degenerazione della placca con conseguente aumento del rischio trombogeno.

### 2.3.3 Gli eventi della fase iniziale ed il ruolo delle forze di ESS

La fase iniziale del danno aterosclerotico è fortemente influenzata dai fattori sistemici dell'individuo e dalle forze di ESS presenti nel sistema arterioso. Nelle normali condizioni fisiologiche le cellule endoteliali sintetizzano ossido nitrico (NO) in seguito alla espressione e all'attivazione dell'enzima eNOS. L'ossido nitrico è una molecole chiave nella regolazione del tono vasale, grazie alla diffusione passiva dall'endotelio alle cellule della muscolatura liscia della tonaca media, dove stimola la produzione di cGMP tramite attivazione dell'enzima guanilato ciclas [19,24]. Elevati livelli di cGMP portano all'attivazione della proteina chinasi GMPc-dipendente (PKG) che fosforila una serie di target, come ad esempio canali ionici, portando al rilassamento della cellula muscolare [54]. Inoltre NO determina forte attività anti-infiammatoria, anti-apoptotica, anti-mitogenica e anti-trombotica, principalmente sempre grazie all'attivazione della PKG in seguito all'innalzamento dei livelli di cGMP. PKG attivata un pathway di segnalazione che culmina con la fosforilazione di fattori di trascrizione, e conseguente regolazione della espressione genica. L'insaturazione di alti livelli di ESS (o più precisamente di hESS pulsatile) nelle regioni arteriose di flusso laminare, determina un potente stimolo per una continua produzione di NO da parte dell'endotelio. Infatti hESS agendo sulle strutture meccanosensoriali delle cellule endoteliali, dunque attivando una serie vie di segnalazione cellulare, up-regola l'espressione genica di eNOS e ne promuove l'attivazione post-trascrizionale tramite la modulazione di chinasi cellulari. Ciò comporta marcati effetti atero-protettivi per la parete vasale [24,55].

A livello arterioso, nelle regioni a flusso disturbato, un ruolo chiave nella predisposizione ai processi aterogenici viene svolta dal *low and oscillatory* ESS. Ad esempio, IESS e oESS tramite attivazione dei recettori trans-membranari denominati integrine- $\beta_1$  e conseguente attivazione delle FAK e fosforilazione della chinasi c-Src, determinano sostenuta attivazione proteolitica dei fattori di trascrizione *sterol regulatory elements binding proteins* (SREBP) [24,56]. Al contrario, elevate forze di ESS generate dal flusso di tipo laminare, determinano solo una transiente attivazione delle SREBP [55]. Le SREBP sono una famiglia di fattori di trascrizione (TF) che dalla membrana del reticolo endoplasmatico (ER) vengono trasportati alla membrana golgi, dove subiscono un taglio proteolitico che libera la sub-unità attiva, denominata *SREBP cleavage-activating protein* (o SCAP). Questa sub-unità migra nel nucleo, dove funge da fattore di trascrizione legandosi alle *serum response element* (SRE), una classe di SSRE ovvero di elementi regolatori trascrizionali responsivi allo *shear stress*. Nel nucleo la sub-unità attiva delle SREBP, ovvero SCAP, regola la trascrizione dei geni del recettore delle LDL (o Ldlr) e degli enzimi colesterolo sintasi e acidi grassi sintasi. L'espressione di questi geni, in un

contesto di iperlipidemia metabolica (fattore di rischio sistemico), determina un elevato *uptake* delle LDL circolanti e una maggiore sintesi di LDL e di trigliceridi nelle EC, che provoca ritenzione dei lipidi all'interno delle cellule endoteliali. Inoltre le SREBP quando attivate, determinano sostenuta trascrizione di interleuchina 8 (IL-8) e, di conseguenza, inducono stimoli pro-infiammatori e arruolamento nell'intima dei leucociti circolanti [36,57,58]. In un quadro di alterazione lipidica, anche l'aumento delle LDL ossidate (oxLDL) nel sangue risulta contribuire alle fasi iniziali del danno endoteliale. Fattori sistemici predisponenti l'aterosclerosi, come le dislipidemie o la dieta molto ricca in grassi, sono tra le maggiori cause di aumento delle oxLDL circolanti. L'interazione di oxLDL con le cellule è mediata da diversi recettori; nei macrofagi predominano i membri della famiglia dei recettori scavenger delle oxLDL, mentre le cellule endoteliali internalizzano le oxLDL principalmente tramite il legame con il recettore lectina-simile delle LDL ossidate di tipo 1 (LOX-1), sintetizzato dal gene denominato Olr1. Il legame tra LOX-1 e le oxLDL nelle cellule endoteliali innesca, tramite interazione conformazionale tra LOX-1 receptor e target intracellulari, una moltitudine di segnali che coinvolgono le MAPK, le proteine chinasi C (PKC) e altre chinasi cellulari [59–63]. Il risultato di questa attivazione consiste nell'aumentata espressione di fattori pro-apoptici e nella produzione di anione superossido ( $O_2^-$ ) tramite la NADPH ossidasi con conseguente perossidazione dei lipidi e formazione di radicali liberi e decremento di NO endoteliale. La deplezione di NO endoteliale, in seguito al legame tra LOX-1 e oxLDL, si realizza principalmente tramite due eventi: l'elevata espressione di caveolina I che determina l'inibizione di eNOS e la modulazione ed aumentata espressione di PKC, la cui attivazione prolungata causa disattivazione della eNOS e l'inibizione della sua espressione genica [62,64]. Dunque, in regioni arteriose in cui si instaura *low and oscillatory* ESS vi è una ridotta produzione di NO endoteliale, che in concomitanza con l'espressione di fattori pro-apoptici e l'aumento di stress ossidativo, esporrà le regioni arteriose con flusso disturbato ad una maggiore responsività verso i fattori di rischio aterosclerotico. Un'altra conseguenza della perdita dell'omeostasi endoteliale, dovuto all'instaurarsi di forze di IESS e oESS, è l'aumentata divisione mitotica in seguito alla modulazione del pathway delle MAPK [65]; divisioni mitotiche che vengono stimulate anche dal più alto tasso di apoptosi delle EC nelle zone di flusso disturbato. Gli accentuati processi mitotici nelle zone pro-aterogeniche vengono confermati dalla morfologia che acquisiscono le EC in questi siti arteriosi [64]. Ma non solo l'elevata frequenza di replicazione determina la morfologia delle EC, ma anche la minore efficacia con cui le forze di ESS si trasmettono attraverso la struttura citoscheletrica della cellula, che induce una forma poligonale delle EC nelle zone di flusso disturbato [40,62,64]. Al contrario nelle regioni arteriose in cui si instaura un regime laminare le EC, aventi una frequenza replicativa minore, appaiono di grandi dimensioni ed



allungate, o fusiformi, allineate con la direzione del flusso laminare [55,66]. La morfologia cellulare, inoltre, influenza le *tight junctions* (chiamate anche *occluding junctions*) che si formano tra EC adiacenti. Tali giunzioni, la cui funzione è quella di dare continuità strutturale al *monolayer* endoteliale, possono presentarsi meno organizzate a causa dei frequenti eventi mitotici, e possono manifestarsi discontinuità della pavimentazione endoteliale a causa degli elevati eventi apoptotici [62,67,68]. Questi *gap* della superficie endoteliale possono costituire l'ingresso preferenziale delle LDL dal sangue nella tonaca intima, determinando accumulo in corrispondenza della lamina basale, specie se presenti fattori sistemici che determinano elevati livelli di lipidi circolanti [9,69]

#### **2.3.4 Gli eventi della fase intermedia ed il ruolo delle forze di ESS**

L'ingresso delle LDL nella parete vasale avviene principalmente per diffusione passiva attraverso le giunzioni tra le EC. In un primo momento sono riscontrabili LDL poco ossidate, incapaci di indurre un efficace dei leucociti, in particolare della componente monolitica [9,70]. Tuttavia, una volta accumulate nello spazio sub-endoteliale (lamina basale) le LDL possono subire diversi processi di modificazione tra cui l'ossidazione, la lipolisi, e la proteolisi. L'ossidazione avviene in maniera progressiva e viene indotta dalle specie reattive dell'ossigeno (ROS) che contribuiscono alla formazione delle cellule schiumose e all'induzione dell'infiammazione [70,71]. Si è visto che il *low and oscillatory* ESS promuove la produzione di ROS, ed in particolare l'ossidazione delle LDL nell'intima dei vasi arteriosi, tramite aumentata espressione e attivazione post-trascrizionale di due enzimi largamente responsabili delle reazioni ossidative della cellula, ovvero la NADPH ossidasi e la xantina ossidasi. Inoltre, un aumento delle LDL ossidate potrebbe verificarsi tramite una diminuzione di specie ROS *scavengers* cellulari, quali il manganese superossido dismutasi e il glutatione, a causa dall'instaurarsi di forze di IESS e oESS [64,66]. L'aumento di ROS correlato a questi processi cellulari determina la degradazione dell'NO endoteliale, contribuendo a ridurre la biodisponibilità di ossido nitrico nelle zone vasali esposte a flusso disturbato. La formazione di ROS sostenuta dalla NADPH ossidasi e dalla xantina ossidasi, nonostante sia confinato nelle EC, riesce a influenzare le strutture più interne delle tonaca intima principalmente reclutando e dirigendo verso la lamina basale i leucociti circolanti. Ciò è possibile perché le LDL ossidate inducono l'espressione di molecole di adesione sulla superficie delle cellule endoteliali e di molecole pro-infiammatorie, tra cui citochine e chemochine, che vengono secrete e fungono da chemoattrattori per i leucociti circolanti [72]. Infatti, l'ingresso dei monociti e dei linfociti T nelle fasi precoci di sviluppo dell'aterosclerosi è mediato principalmente dal *vascular cell adhesion molecole-1* (VCAM-1), dell'*intercellular adhesion molecole-1* (ICAM-1) e dalla E-

selectina, molecole di adesione che vengono indotte in seguito all'ossidazione delle LDL nelle cellule endoteliali. In particolare la regolazione trascrizionale del gene VCAM-1 è mediato dal fattore di trascrizione *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* (NF-κB), attivato dai fosfolipidi ossidati e dalle aldeidi a catena corta derivanti dall'ossidazione delle lipoproteine [64]. Inoltre, NF-κB una volta attivato si sposta nel nucleo, e sovra-esprime i geni per le citochine pro-infiammatorie come l'interleuchina-1β (IL-1β), il fattore di necrosi tumorale-α (TNF-α), e i geni codificanti le citochine chemoattrattrici (o chemochine) come la proteina chemoattrattore dei monociti di tipo 1 (MCP-1), l'interleuchina-8 (IL-8) e l'interferone gamma (IFN-γ); IFN-γ contribuisce al reclutamento dei linfociti [73,74]. Tutti questi fattori pro-infiammatori e chemoattrattori sono presenti in elevate quantità nell'ateroma.

Le cellule della risposta immune, in seguito all'adesione alle EC, entrano nell'intima mediante la diapedesi attraverso le *tight junction* endoteliali. Una volta nell'intima i monociti maturano nei macrofagi, che in presenza di LDL altamente ossidate attuano processi di fagocitosi delle lipoproteine diventando in questo modo cellule schiumose; così definite per il loro particolare aspetto al microscopio [55,72]. Tale processo è mediato da una serie di recettori *scavenger* cellulari, tra cui i più importanti sono il scavenger receptor A (SR-A), il CD36 e il CD68, che riconoscono ligandi di diversa natura, tra cui le LDL ossidate. Le cellule schiumose e i macrofagi presenti nella stria lipidica in corso di formazione possono produrre, oltre a numerose specie reattive dell'ossigeno, fattori di crescita e citochine come il fattore stimolante i granulociti macrofagi (GM-CSF), implicati nella progressione dell'infiammazione e complicazione della lesione aterosclerotica [64]. Oltre ai ROS, l'ossidazione delle LDL si realizza e amplifica tramite l'azione di enzimi come la mieloperossidasi (MPO), contenuta nei leucociti polimorfonucleati, e la fosfolipasi secretoria di tipo 2 (sPLA2) espressa, tra gli altri, dai macrofagi e piastrine e secreta in seguito stimoli infiammatori.

### **2.3.5 Gli eventi della fase avanzata ed il ruolo delle forze di ESS**

Durante questa fase si verificano una serie di eventi che portano alla perdita di organizzazione della tonaca media e determinano un fenotipo invasivo, proliferativo e secretorio delle cellule muscolari lisce vascolari (VSMC) nella tonaca intima. In particolare, in seguito agli eventi di infiammazione e infiltrazione leucocitaria a livello della membrana basale, citochine ed altri fattori di crescita secreti dai macrofagi e dai linfociti T inducono la migrazione dalle VSMC dalla tonaca media verso la tonaca intima. È stato dimostrato che il *low and oscillatory* ESS induce l'espressione a livello endoteliale del: fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF) sia nella isoforma A che B, del fattore di

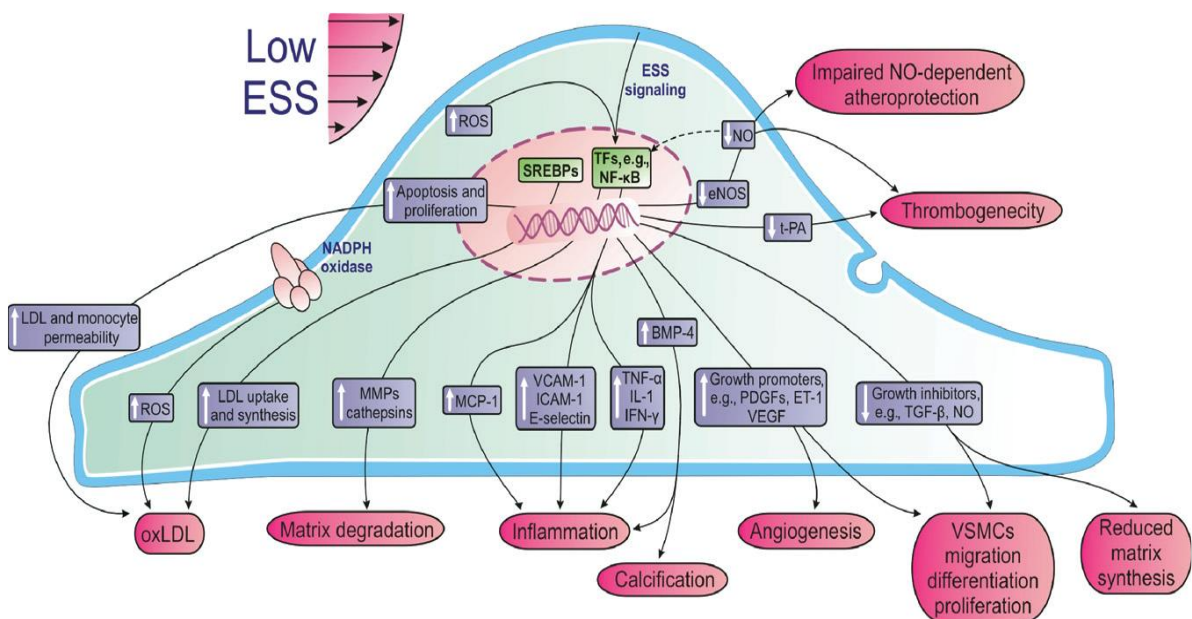
crescita dell'endotelio vascolare (VEGF) e dell'endotelina 1 (ET-1), che rappresentano potenti mitogeni per le VSMC [62,75].

Inoltre il IESS e oESS riducono l'espressione dell'inibitore dell'attivatore tissutale del plasminogeno di tipo 1 (PAI-1) endoteliale (conosciuto anche come serpin E1), ovvero un inibitore della migrazione chemiotattica delle VSMC, inoltre deprimono nelle EC la biodisponibilità del NO e la sintesi del fattore di crescita trasformante beta (TGF- $\beta$ ), due importanti soppressori della crescita, differenziazione e migrazione delle VSMC [55]. Questa condizione di netto sbilanciamento verso gli stimoli di tipo chemiotattico e proliferativo/differenziativo con conseguente riduzione di quelli inibitori (tipico delle regioni arteriose interessate da danno aterosclerotico) promuove la migrazione delle VSMC dalla loro sede nella tonaca media verso all'intima del vaso. Ciò comporta alterazione della struttura della parete vasale e rottura della membrana elastica interna. Nella tonaca intima le VSMC in fase di proliferazione differenziano in senso secretorio, determinando la sintesi di collagene e altre proteine della matrice extracellulare [64,69]. Nel corso del tempo le VSMC migrate e differenziate nella tonaca intima creano, insieme ai fibroblasti, un cappuccio fibroso attorno al nucleo lipidico infiltrato (o *core* lipidico) contenente massiccia infiltrazione immunitaria, che ha la funzione di isolare il materiale trombogenico dalle piastrine circolanti. Il cappuccio fibroso attorno al nucleo lipidico, costituiscono la cosiddetta placca aterosclerotica precoce. Il cappuccio fibroso non è una componente statica ma, piuttosto, una struttura dinamica che subisce continui processi di rimodellamento [76]. Le metalloproteinasi della matrice extracellulare (MMP), insieme ad altre proteasi cellulari, sono responsabili della degradazione del collagene e delle componenti della matrice extracellulare, mentre le cellule muscolari nella tonaca intima, sotto gli stimoli pro-infiammatori, sintetizzano gli elementi della matrice. La stabilità della placca è, quindi, associata all'equilibrio tra questi due opposti processi [77] [78].

### **2.3.6 La fase finale: evoluzione della placca aterosclerotica**

L'ateroma, ovvero la placca avente colorazione bianca o giallastra caratterizzate da superficie luminale dura e bianca (capsula fibrosa) che separa il sottostante *core* lipidico e che protrude nel lume del vaso, tipicamente subisce un aggravamento con casistica molto elevata di manifestazioni più o meno gravi di tipo clinico, causate da lesioni complicate o occludente del vaso. È stato dimostrato che l'evoluzione della placca non avviene in maniera costante, ma attraverso una serie di passaggi discontinui e con esiti diversi. Di seguito verranno brevemente elencate e discusse alcune tipiche evoluzioni della lesioni aterosclerotica.

- **Calcificazione della placca:** processo in cui cellule simil-osteocitarie producono una rete proteica che viene successivamente calcificata, portando alla formazione di una struttura, o cappuccio, rigido che stabilizza la placca [79].
- **Neo-vascularizzazione ed emorragia intrapacca:** all'interno della placca si formano una serie di vasi di piccolo calibro grazie ad al processo di angiogenesi supportato dalle cellule muscolari e dai macrofagi, attraverso la liberazione di fattori di crescita tra cui il: fattore di crescita dei fibroblasti (FGF) e il VEGF. Tuttavia i nuovi vasi possono facilmente andare incontro a rottura portando ad una emorragia intrapacca [78]. La fuoriuscita di sangue determina trombosi *in situ* che, in seguito al rilascio di una serie di fattori di crescita come la trombina ed il PDGF, causa ulteriore induzione della migrazione e della proliferazione delle VSMC [80].
- **Ulcerazione o rottura della placca:** è determinato dal progressivo assottigliamento del cappuccio fibroso ad opera, principalmente, delle metallo-proteinasi prodotte dai macrofagi e dalle VMSC, sotto lo stimolo infiammatorio [81]. La rottura della placca porta a diretto contatto i fattori circolanti della coagulazione con i fattori tissutali contenuti nella placca stessa, con formazione di trombi o di emboli [80]. Inoltre, anche in assenza di rottura della placca possono verificarsi eventi trombotici, in particolare in seguito alla perdita del *monolayer* endoteliale nel sito di formazione della lesione aterosclerotica, con conseguente esposizione diretta del collagene sub-endoteliale con il flusso sanguigno. Ciò provoca la formazione di trombi attraverso l'attivazione della cascata coagulativa.



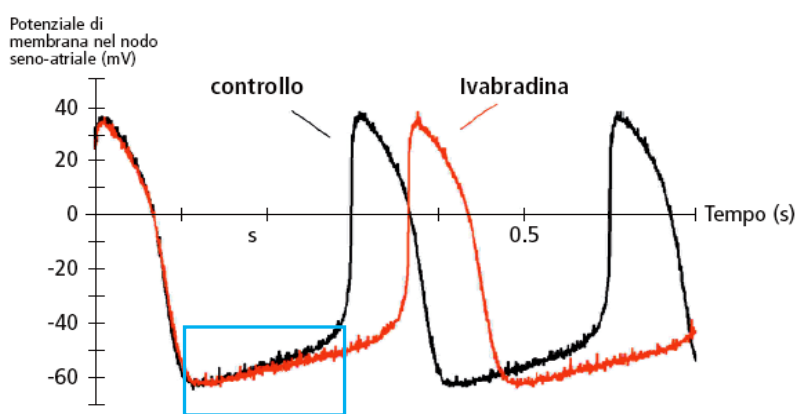
**Figura 3:** rappresentazione degli effetti dell'esposizione delle cellule endoteliali a forze di low Endothelial Shear Stress (IESS)

## 2.4 Ivabradina e protezione vascolare: meccanismo d'azione del farmaco

### 2.4.1 Ivabradina e canali HCN: inibizione della corrente pacemaker (I<sub>f</sub>)

L'ivabradina è un farmaco inibitore reversibile altamente selettivo e dose-dipendente della corrente *funny* (I<sub>f</sub>), denominata anche corrente *pacemaker* cardiaca [82,83]. La I<sub>f</sub> agisce nel nodo seno-atriale (NSA) determinando la frequenza con cui si generano i potenziali d'azione cardiaci nel tempo (figura 4a). Questi eventi depolarizzanti propagandosi lungo il tessuto di conduzione cardiaco, imporranno al cuore la velocità con cui contrarsi. L'ivabradina è un farmaco già in uso nella pratica clinica, ed indicato nel trattamento sintomatico dell'angina pectoris cronica stabile negli adulti con coronaropatia e normale ritmo sinusale e frequenza cardiaca  $\geq 70$  bpm. Inoltre ed è indicato nell'insufficienza cardiaca cronica (in classificazione NYHA, *New York Heart Association*, da II a IV) con disfunzione sistolica, in pazienti con ritmo sinusale e la cui frequenza cardiaca sia  $\geq 75$  bpm, in associazione con la terapia convenzionale o nel caso la terapia convenzionale sia controindicata. Funzionalmente l'ivabradina è inibitore reversibile della I<sub>f</sub> grazie alla sua capacità di stabilire interazioni con la porzione interna del poro dei canali attivati dalla iperpolarizzazione leganti i nucleotidi ciclici (*hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels*, o HCN) (figura 4b) [84,85]. Questi sono canali ionici voltaggio-dipendenti attivati da stimoli iperpolarizzanti e modulati dai nucleotidi ciclici. Infatti l'adenosina monofosfato ciclico (AMPc) o la guanosina monofosfato ciclico (GMPc) legandosi ad una particolare sub-unità intracellulare del canale, ne aumentando la probabilità di apertura in seguito a stimoli iperpolarizzanti [86–88]. I canali HCN presentano struttura tetrameric, ovvero sono composti da subunità, o monomeri, che si dispongono a formare una struttura proteica quaternaria di forma circolare che costituisce il corpo del canale e che delimita un poro centrale. Attraverso il poro del canale si ha passaggio di una corrente mista Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>, ovvero la corrente pacemaker cardiaca, in cui è favorito energeticamente il passaggio dello ione K<sup>+</sup> rispetto al Na<sup>+</sup>, coerentemente con la presenza di un motivo GYG nel poro del canale, che costituisce il filtro di selettività degli ioni K<sup>+</sup>. Tra le isoforme di canali HCN finora note, il canale HCN4 è il più rappresentativo sulla membrana delle cellule del nodo seno-atriale. Una volta che l'ivabradina è presente nell'ambiente intracellulare del NSA è spinta nel suo dominio di legame all'interno dei canali HCN dalla corrente K<sup>+</sup> *outward*, generata dallo stato di depolarizzazione cellulare; Infatti tale corrente utilizza anche la conduttanza dei canali HCN per uscire dalle cellule del NSA. Al contrario, l'ivabradina viene rimossa dal poro dei canali HCN durante la fase di ripolarizzazione del

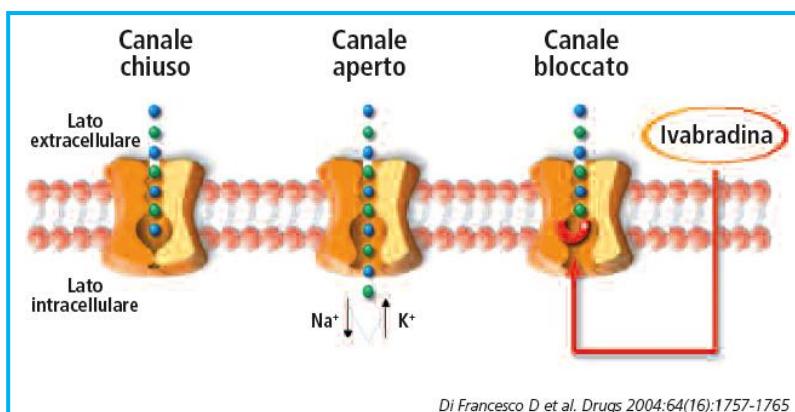
NSA, in cui si instaura una corrente  $\text{Na}^+$  *inward*, che passa attraverso i canali HCN per entrare nelle cellule del NSA. Questa corrente cationica entrante è responsabile della spontanea depolarizzazione fino all'attivazione delle conduttanze calcio e la generazione del potenziale d'azione nel SNA. Tuttavia, sebbene l'ivabradina non blocchi la permeazione del canale irreversibilmente, rallenta la corrente  $\text{Na}^+$  entrante, rallentando la graduale risalita del potenziale di membrana fino all'apertura dei canali  $\text{Ca}^{2+}$  voltaggio-dipendenti [89]. L'ivabradina agisce entrando nel canale HCN quando questo si trova nel suo stato conformazionale aperto (stato-dipendenza del farmaco)[90]. E' noto che il canale HCN si apre durante la fase di ripolarizzazione del potenziale di membrana e si chiude durante la depolarizzazione, questo significa che l'interazione tra l'ivabradina e il sito di legame non dipende solo dallo stato del canale, ma anche dalla loro frequenza di chiusura/apertura, dunque, è legato al valore stesso della HR (frequenza-dipendenza del farmaco)[86,87]. Queste caratteristiche farmacodinamiche, conferiscono all'ivabradina la capacità di ridurre la frequenza cardiaca solamente ad elevate HR, quando i canali HCN cambiano stato conformazione con elevata frequenza. Al contrario in presenza di bassa HR l'inibizione della corrente  $I_f$ , tramite il legame dell'ivabradina ai canali HCN, risulta molto ridotta [65,90]. L'ivabradina, essendo un inibitore specifico della corrente  $I_f$ , non interagisce con altre tipologie di canali ionici presenti nel cuore, quindi, non altera la conduzione cardiaca e non ha effetti sulla contrattilità miocardica [90].



**Figura 4a:** L'effetto dell'ivabradina nella generazione nel tempo dei potenziali d'azione nel nodo seno atriale (NSA), il principale *pacemaker* cardiaco. La parte evidenziata dal riquadro indica la fase in cui si attiva la  $I_f$ , ovvero dalla fine della fase di ripolarizzazione fino alla generazione delle correnti  $\text{Ca}^{2+}$ .

Di Francesco D et al. *Drugs* 2004;64(16):1757-1765

**Figura 4b:** L'ivabradina determina una selettiva inibizione della corrente funny ( $I_f$ ) legandosi in modo reversibile al poro dei canali HCN, aumentando il tempo necessario alle cellule del NSA per depolarizzarsi fino alla soglia di generazione del potenziale d'azione.



Di Francesco D et al. *Drugs* 2004;64(16):1757-1765

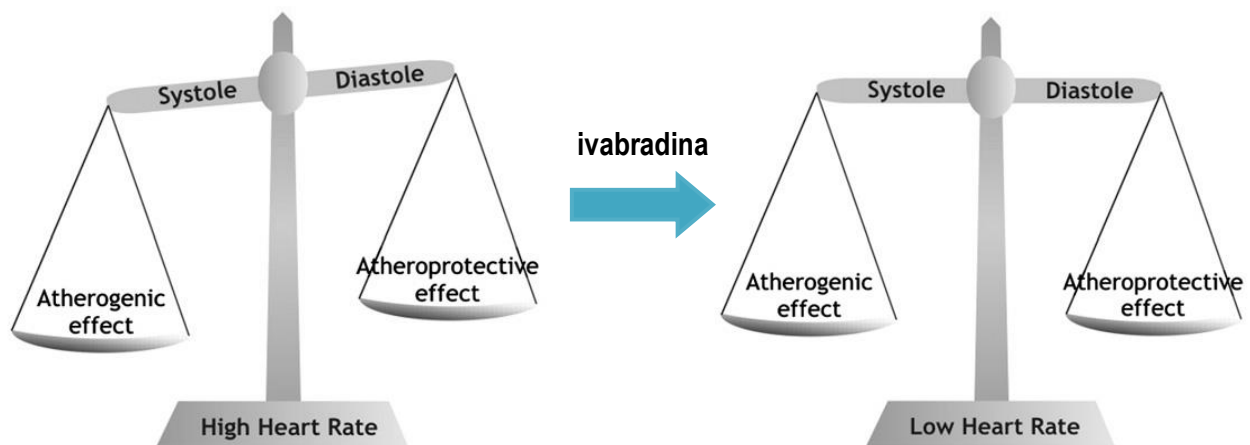
## 2.4.2 Ivabradina negli studi *in vivo*

In molti studi condotti in vivo su animali sono stati testati gli effetti dell'ivabradina come agente protettivo a livello cardiaco e nella diminuzione dello sviluppo di placche aterosclerotiche in presenza di disfunzioni metaboliche o induzione di fattori di stress. Negli esperimenti in vivo, gli effetti vascolari dell'ivabradina erano associati ad una riduzione dello stress ossidativo vascolare (diminuzione di attività NADPH ossidasi [91]) diminuzione della chemochina pro-infiammatoria MCP-1 [91] [92] e della citochina pro-infiammatoria TNF- $\alpha$ , di IL-6 e di TGF- $\beta$ , ed espressione AT1-R [91,92]. Effetti vascolari dell'ivabradina non sono correlati con una riduzione dei livelli di colesterolo e trigliceridi, in quanto il farmaco non altera il profilo dei lipidi circolanti. Inoltre, a concentrazioni rilevanti terapeutiche, l'ivabradina fornita ex vivo (cioè direttamente incubate con arterie isolate) non ha avuto effetti sulla funzionalità vascolare. È, inoltre, interessante notare che gli effetti protettivi dell'ivabradina sulla disfunzione endoteliale non potevano essere riprodotti ex vivo. Presi insieme, questi risultati suggerivano che un effetto diretto dell'ivabradina sui vasi è improbabile, e supportano l'ipotesi della riduzione della frequenza cardiaca come principale meccanismo di azione del farmaco.

A sostegno di questa ipotesi, i dati provenienti dalla letteratura riportano l'effetto negativo dell'elevata frequenza cardiaca nella patogenesi dell'aterosclerosi. In un esperimento con scimmie cynomolgus alimentate con dieta grassa, gli individui che presentano elevata frequenza cardiaca manifestavano lesioni aterosclerotiche dell'arteria coronarica due volte più estese rispetto agli animali con normale HR [93]. In accordo con queste osservazioni, la riduzione della frequenza cardiaca a riposo con metoprololo (farmaco  $\beta$ -bloccante), rallentava la disfunzione endoteliale nelle scimmie cynomolgus psicologicamente stressate [94,95], mentre la riduzione della frequenza cardiaca a riposo per ablazione chirurgica del nodo seno-atriale, rallentava il processo aterosclerotico nelle scimmie cynomolgus nutriti con una dieta ricca di grassi [96,97].

Gli effetti protettivi a livello vascolare della riduzione della frequenza cardiaca, non indotta da lavoro fisico, rimangono ancora da chiarire. Risulta evidente che la riduzione della HR indotta dall'azione dell'ivabradina, determina un aumento della fase diastolica nel ciclo cardiaco a fronte di una fase di sistole che rimane inalterata; aumenta, dunque, il periodo speso dal cuore in diastole nell'unità di tempo considerato. Inoltre, aumentando la fase diastolica si verificherà un'augmentata esposizione delle regioni arteriose caratterizzate da complessa geometria vasale ad un flusso avente velocità minore e, quindi, minore grado di disturbo emodinamico (flusso "diastolico"). Possiamo, anche, affermare che un flusso sanguigno avente scarso grado di disturbo imporrà forze di ESS più elevate rispetto ad un flusso altamente disturbato tipico della fase sistolica (flusso "sistolico").

Dagli studi finora condotti in uomo si ritiene che l'effetto dell'elevata frequenza cardiaca a riposo (ovvero un innalzamento della HR > 70 bpm, non a seguito di lavoro o esercizio fisico) [90], manifesta un effetto lesivo per la parete arteriosa, principalmente localizzata nelle regioni a complessa geometria vasale [26]. Queste regioni sono, infatti, costitutivamente esposte a flusso emodinamico disturbato per via delle loro caratteristiche morfologiche. Tuttavia, mentre il flusso sanguigno che si manifesta durante la sistole avrà un grado di instabilità e di disturbo molto elevato (valori di ESS molto bassi ed oscillatori) [4,26], l'emodinamica della fase diastolica presenta un minore livello di disturbo e nel flusso si ritrovano alcune componenti (lamine) che si muovono parallelamente una sull'altra, anche se in misura ridotta (valori di ESS più elevati rispetto al flusso "sistolico") [4,26]. In base a queste osservazioni appare chiaro quanto una maggiore esposizione al flusso "diastolico" rispetto a quello "sistolico" possa contribuire a preservare o ridurre il danno vasale in regioni arteriose prone ai fenomeni aterosclerotici. L'effetto bradicardizzante dell'ivabradina determina una minore esposizione della parete arteriosa al flusso sistolico, non riducendo la durata della sistole cardiaca ma aumentando il tempo impiegato dal cuore per effettuare la fase diastolica (nell'unità temporale considerata) [26] [98]. Questa la riduzione dell'esposizione del flusso sistolico, nell'unità di tempo considerata, unitamente ad una prolungata fase di diastole e, dunque, all'aumento del periodo di tempo in cui le pareti vasali sono interessate da un flusso meno disturbato, è al momento l'ipotesi maggiormente accettata sull'azione atero-protettiva esercitata dall'ivabradina verso le regioni vasi a geometria complessa, quindi ateroprone [98].



**Figura 5:** L'ipotesi attualmente più accreditata riguardo il meccanismo di protezione del sistema arterioso dovuto dalla diminuzione della HR, verte sulla minore esposizione al flusso "sistolico" altamente disturbato. Il "bilanciamento" dell'effetto aterogenico del flusso sistolico non si esplica, nel caso del trattamento con l'ivabradina, nella diminuzione della durata della fase di sistole cardiaca, ma con un allungamento (nell'unità di tempo) della fase diastolica. In tal modo la maggiore esposizione dei vasi arteriosi ad un flusso diastolico può "bilanciare" gli insulti vasali indotti dal flusso sistolico altamente disturbato.



### 3 OBIETTIVI DELLO STUDIO

Gli obiettivi del nostro studio sono la:

1. valutazione dell'effetto del trattamento con ivabradina, somministrata dalle prime settimane di vita, nel determinare un cambiamento dell'espressione genica in senso atero-protettivo, contrastando la tendenza alla precoce e progressiva perdita dell'omeostasi e conseguente attivazione endoteliale, caratteristica dei topi dislipidemici
2. valutazione dell'efficacia dell'ivabradina, somministrata dalle prime settimane di vita, nell'esplicare un'azione protettiva a livello dell'arco aortico nei confronti della progressione delle lesioni di tipo aterosclerotico, non accelerata dalla somministrazione di dieta ricca in grassi.

## 4 MATERIALI E METODI

### 4.1 Topo ApoE<sup>-/-</sup> come modello animale di dislipidemia

Per il nostro lavoro, sia negli studi di settaggio che negli studi di confronto tra gruppi di trattamento per determinare l'effetto del farmaco, abbiamo utilizzato il topo maschio avente *strain: B6.129P2-Apoetm1Unc/J*. Questo animale è omozigote (doppio negativo) per una mutazione nel gene *ApoE* sul cromosoma 7, quindi presenta assenza di apolipoproteina E funzionante. Insieme alle apolipoproteine di tipo A, B e C ed ai fosfolipidi l'apolipoproteina E forma i chilomicroni, particelle che veicolano nel flusso circolatorio i trigliceridi ed il colesterolo. L'apolipoproteina E viene riconosciuta legata ad un recettore specifico, presente sulle cellule dei tessuti che utilizzano i trigliceridi ed il colesterolo per i loro processi biologici (come quello muscolare) e sulle cellule epatiche che procedono con lo smaltimento del colesterolo e dei trigliceridi in eccesso. Pertanto, l'apolipoproteina E è essenziale per il normale catabolismo e processazione dei chilomicroni e dei relativi componenti; l'inattivazione di questa apolipoproteina nel topo determina marcato aumento dei livelli di colesterolo totale del plasma, che vengono influenzati da età o sesso, e leggero aumento dei livelli di trigliceridi. I topi *B6.129P2-Apoetm1Unc/J* sviluppano con l'età xantomi cerebrali per via dell'accumulo di lipidi e colesterolo nel sistema nervoso centrale e lesioni precoci di tipo aterosclerotico nelle pareti vasali, in particolare in caratteristiche regioni arteriose prone al danno aterosclerotico, come le carotidi e l'arco aortico.

### 4.2 Anestesia e sacrificio

L'anestesia ed il sacrificio degli animali utilizzati negli studi di seguito riportati è stata svolta in conformità con il regolamento dell'Università di Ferrara e con l'approvazione del comitato etico universitario. La procedura prevedeva il raggiungimento di un profondo ed irreversibile stato di incoscienza determinato da overdose di farmaco anestetico, seguito da arresto cardio-circolatorio e morte, con assenza di dolore e sofferenza da parte dell'animale. La somministrazione dei farmaci avveniva via intramuscolo o intraperitoneale e prevedeva una dose di Dex Domitor (Orion Pharma, 0,5 mg/ml soluzione iniettabile) pari a 20mg/kg e una dose di Zoletil (Zoletil 100 Vibrac, 50 mg/ml di Tiletamina + 50 mg/ml di Zolazepam) pari a 90mg/kg.

### **4.3 Monitoraggio della frequenza cardiaca (HR)**

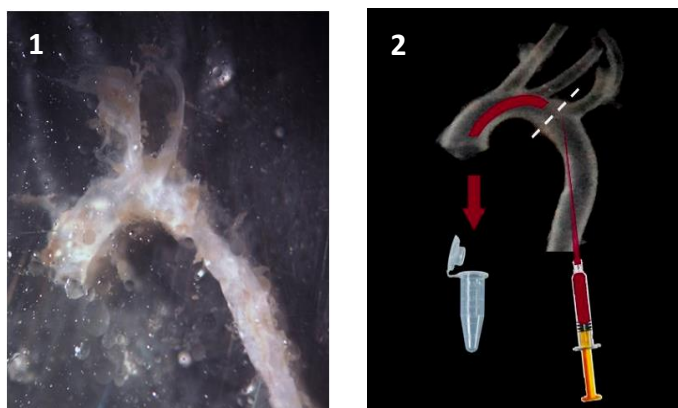
La frequenza cardiaca è stata misurata in diversi gruppi di animali, nel corso dello studio, tramite utilizzo di ecocardiografo (Vivid ECG, GE Healthcare Worldwide) e relativa sonda pediatrica ad ultrasuoni (Vivid cardiovascular ultrasound 12S R-S, GE Healthcare Worldwide). La tecnica di acquisizione dei tracciati per il monitoraggio dell'andamento cardiaco prevedeva l'applicazione di una debole pressione da effettuare con la sonda appoggiata sulla gabbia toracica dell'animale, previa aggiunta di gel per ecografia. Il monitoraggio della HR è stato condotto con l'animale in stato di completa vigilanza, dato che la modalità di misurazione era totalmente indolore e l'utilizzo di farmaci anestetici, che alterano il battito cardiaco, poteva determinare alterazioni e artefatti nelle registrazioni. Inoltre l'esposizione a ripetute anestesi poteva essere pericoloso per l'animale. Durante il monitoraggio della HR l'animale è stato mantenuto in posizione supina e la durata delle registrazioni non superava i 30 sec, per non alterare la frequenza cardiaca a causa della pressione sul torace applicata con la sonda, o per via dello stress psicologico provato dall'animale. Le singole sessioni di 30 sec di registrazione sono state ripetute almeno 3 volte per ogni topo, lasciando alcuni minuti di pausa tra una registrazione e l'altra, per non indurre un accumulo di stress. Per poter avere una buona conduzione degli ultrasuoni emessi dalla sonda, dunque una buona qualità delle registrazioni ecocardiografiche, il torace veniva depilato con modalità indolore 2-3 giorni prima della misurazione.

### **4.4 Espianto dell'aorta di topo**

In seguito ad anestesia e sacrificio dell'animale, tramite la procedura sopra descritta, si è proceduto con l'immobilizzazione del corpo dell'animale ed esecuzione di due tagli longitudinali ai lati della gabbia toracica. Una volta aperta e la gabbia toracica ed esposto il cuore è stato possibile visualizzare l'aorta, previo spostamento o rimozione degli organi addominali. In questa fase è stato inserito nel ventricolo sinistro cardiaco di un ago ipodermico di 23 Gauge, collegato ad una sacca di soluzione fisiologica a 4°C. Si è proceduto, quindi, con il lavaggio del sangue dai vasi sanguigni e dagli organi tramite perfusione a velocità controllata con soluzione fisiologica, per circa 5-7 min. L'efflusso della soluzione immessa nel ventricolo sinistro avveniva attraverso la l'arteria femorale, sezionata in entrambe le zampe posteriori. Ultimata la completa eliminazione del sangue, ovvero all'ottenimento di un efflusso di colore rosa pallido, l'aorta poteva essere trattata con due distinte metodiche in base alla tipologia di esperimento da effettuare e, quindi, ai campioni che si desiderava ottenere.

#### 4.4.1 Protocollo di eluizione dell'arco aortico

In seguito all'eliminazione del sangue dal corpo dell'animale tramite perfusione con fisiologica, l'aorta è stata espantata insieme al cuore. Ciò avveniva tramite accurata rimozione delle aderenze tra il tessuto connettivo e lipidico peri-aortico e la colonna vertebrale, seguita dal taglio delle carotidi al di sopra dell'arco aortico. In seguito l'aorta è stata immersa in una petri contenente la soluzione RNAlater (*RNA stabilization solution*, Ambion, cat.No. AM7021), ed è stata separata dal cuore tramite taglio eseguito poco al di sotto delle valvole aortiche. Ciò ha consentito una buona perfusione dell'RNAlater all'interno del vaso, aspetto non secondario dato che l'RNAlater è una soluzione in grado di proteggere l'RNA rallentandone la degradazione. E' stato, dunque, possibile eseguire, tramite visualizzazione del campione allo stereomicroscopio (Nikon, mod. SMZ745T 6x-50x) la pulizia dell'aorta dallo spesso rivestimento adiposo e connettivo che la ricopre, senza incorrere nella degradazione dei trascritti genici endoteliali. Una volta che l'aorta risultava completamente pulita, ed era ben visibile la tonaca avventizia esterna, si è proceduto con una variante della metodica di perfusione descritta da Krenek P [99] (figura 6). Tale metodica consiste nella rimozione del tratto toracico a 5-7 mm dalla fine della regione di curvatura e nell'inserimento di un micro-puntale avente un diametro inferiore ad 1 mm (Microloader, tip, 0.5–20 µl, Eppendorf) attraverso la breve porzione del tratto toracico rimasto non tagliato, fino a raggiungere della carotide succlavia sinistra nell'arco aortico. Da quel punto è stata infusa una soluzione di lisi cellulare a base di fenolo (TRIZol Reagent, Phenol 50%-Guanidine Thiocyanate Solution, cat.No 15596, Life Technologies). La soluzione perfondeva tutto l'arco aortico, dal punto di inserimento del puntale fino al punto di inizio dell'arco aortico, ovvero l'apertura valvolare originariamente connessa al ventricolo sinistro, da cui sono state accuratamente rimosse le valvole aortiche e ogni traccia di tessuto cardiaco. Al termine della eluizione della superficie luminale (endoteliale) dell'arco aortico, la soluzione fenolica contenente l'RNA endoteliale è stata raccolta in una provetta RNase free, e conservato a -80°C in attesa di procedere con purificazione dell'RNA e la sua convalida.



**Figura 6:** (a sinistra) Aorta di topo ApoE<sup>-/-</sup> (10<sup>o</sup> settimana di vita) nella fase finale della pulizia dal tessuto adiposo che la ricopre, in RNAlater. Si notano le carotidi che originano dalla curvatura maggiore dell'arco. (a destra) rappresentazione della tecnica di eluizione attraverso l'arco aortico con soluzione fenolica, per l'estrazione selettiva dell'RNA endoteliale.

#### 4.4.2 Protocollo di analisi *en face* dell'endotelio

In seguito alla completa eliminazione del sangue tramite infusione di soluzione fisiologica, il corpo dell'animale veniva nuovamente perfuso a velocità controllata per 10 min con formalina al 10% neutra tamponata (Bio Optica, cat. No 05-01005Q), immessa nel sistema circolatorio attraverso il ventricolo sinistro tramite ago 23 Gauge collegato ad una sacca di perfusione. Con questa procedura l'aorta veniva efficacemente fissata, in tal modo il campione non subiva fenomeni di degradazione tissutale durante le successive procedure sperimentali. Terminata la procedura di fissazione, l'arco aortico è stato espantato grazie al taglio delle carotidi al di sopra dell'arco aortico e attraverso attenta rimozione delle aderenze tra il tessuto connettivo e lipidico peri-aortico e la colonna vertebrale. Tramite osservazione del campione allo stereomicroscopio (Nikon, mod. SMZ745T 6x-50x), è stato possibile eseguire la rimozione del cuore e procedere con la pulizia dell'aorta dal rivestimento adiposo e connettivo che la ricopriva, senza incorrere nella degradazione tissutale del campione. In seguito l'arco aortico è stato sezionato e separato dalla aorta toracica, ed è stato tagliato in senso longitudinale lungo la sua curvatura maggiore. In tal modo è stato possibile far assumere forma planare al vaso, consentendo una migliore esposizione dell'arco aortico alle soluzioni utilizzate per gli *staining*. L'arco aortico così ottenuto è stato posto in un tubo eppendorf da 2ml (in cui vengono eseguite le tutte le fasi delle colorazioni) ed esposto per 30 min a 0.1% Triton X-100 (BioChemica, Euroclone, EMR237500) in PBS (la soluzione risultante prende il nome di *washing buffer*, o WB), per consentire la permeabilizzazione del campione. Per effettuare il bloccaggio dei siti aspecifici, che possono dare interferenza con le successive colorazioni anticorpali, è stato utilizzato il siero fetale bovino, o BSA, al 2% (BSA *heat shock fraction, protease free*; Sigma Aldrich, cat. No. A3294), addizionato con 0.1% Triton X-100 in PBS (la soluzione risultante prende il nome di *blocking buffer*, o BB). Il campione è stato esposto per 90 min a temperatura ambiente (T.A) con il *blocking buffer*. In seguito si è proceduto con la diluizione 1:100 in *blocking buffer* dell'anticorpo primario (ab.1°) *Rat monoclonal VE-cadherin* (Purified Rat Anti-Mouse CD144, BD Pharmingen, cat. No. 555289), posto a contatto con il campione a 4°C per almeno 8 ore. Successivamente l'eccesso di anticorpo primario non legato al *marker* endoteliale *VE-cadherin* è stato eliminato con 1 lavaggio in WB e 2 lavaggi in PBS. La marcatura del complesso *VE-cadherin* – ab.1° è stata ottenuta aggiungendo al campione una diluizione 1:500 dell'anticorpo secondario (ab.2°) Alexa Fluor 546 Goat Anti-Rat IgG (Life Technologies, cod. A11081), applicato per 90 min a 4°C, previa breve centrifugazione a 13000 rpm per 5 min a 4°C. L'emissione/eccitazione del ab.2° coniugato alla tetrametilrodamina (TRITC) era pari a 557/576 nm. In seguito all'eccesso di anticorpo secondario è stato eliminato

tramite la stessa tipologia di lavaggi eseguiti con l'anticorpo primario. Per alcuni dei nostri campioni di arco aortico l'unica colorazione effettuata era quella per *VE-cadherin*, quindi ultimata la marcatura con l'Ab.2° i campioni sono stati chiusi con la superficie luminale (o endoteliale) dell'arco rivolta verso in vetrino coprioggetto, ovvero verso l'osservatore. La efficace chiusura del vetrino coprioggetto ed il mantenimento del campione nelle corrette condizioni di idratazione e pH è stata garantita dall'utilizzo di un reagente denominato ProLong Gold Antifade Mountant (Life Technologies, P36934).

In alcune prove da noi condotte in seguito alla colorazione con l'Ab.2° si è proceduto con il saggio TUNEL (*In situ cell death detection kit, fluorescein*; Roche, cat. No. 11 684 795 910). Questo saggio enzimatico permetteva l'individuazione delle cellule apoptotiche, tramite esposizione dell'arco aortico ad una soluzione denominata *TUNEL-reaction mixture*. Questo composto conteneva i nucleotidi marcati con fluoresceina (dUTP-fluoresceina, eccitazione/emissione pari a 490/525 nm) e l'enzima dUTP-transferasi (deossi-nucleotidil transferasi da timo di vitello) per il trasferimento dei nucleotidi marcati nei siti di danno a singola o doppia elica del DNA. I campioni di aorta sono stati incubati con *TUNEL-reaction mixture* a 37°C per 60 min, al termine dei quali l'eccesso della soluzione è stata eliminata con 1 lavaggio in WB e 2 lavaggi in PBS. Terminato il saggio TUNEL i campioni sono stati chiusi con Pro-Long Gold Antifade Mountant. L'arco aortico veniva sempre posizionato con la superficie luminale (endoteliale) del vaso rivolta verso il vetrino coprioggetto, ovvero verso l'osservatore, in modo da poterla analizzare successivamente al microscopio. In ulteriori prove da noi condotte su archi aortici, abbiamo identificato le lesioni ateromatose con il colorante Nile Red (Life Technologies, cat. No. N-1142, eccitazione/emissione pari a ~552/636 nm) affine alle *core* lipidico presente nelle lesioni aterosclerotiche. Questo tipo di colorazione non era compatibile con la presenza di *staining* anticorpale per Ve-Cadherin e saggio TUNEL, per via della fasi di permeabilizzazione del campione e bloccaggio dei siti aspecifici in cui viene usato il detergente Triton X-100, contenuto nelle soluzioni BB e WB. L'utilizzo di soluzioni detergenti, come il *washing buffer*, determina solubilizzazione delle strutture lipidiche con conseguente sottostima o perdita delle lesioni aterosclerotiche. Dunque, i campioni dedicati alla colorazione con Nile Red hanno subito solo iniziale lavaggio del sangue con soluzione fisiologica e successiva fissazione con formalina al 10% neutra tamponata, tramite perfusione a velocità controllata per 10 min. Completata la fase di fissazione con formalina e pulizia dell'aorta in PBS, si è riposto l'arco aortico in un tubo eppendorf da 2 ml. Sono stati effettuati tre lavaggi del campione con PBS e si è proceduto con la colorazione Nile Red a T.A per 30 min, previa diluizione del colorante alla concentrazione finale di 25 ng/ml. In seguito è stato eliminato l'eccesso di Nile Red tramite tre lavaggi in

PBS, ed il campione è stato montato su vetrino da microscopia con ProLong Gold antifade, mantenendo la superficie luminale del vaso rivolta verso il vetrino coprioggetto. Tramite microscopio confocale a scansione (LSM510; ZEISS), sono state analizzate le superfici luminali degli archi aortici sottoposti ai diversi tipi di colorazioni finora descritte. Per ogni campione sono state acquisite 15 immagini della superficie endoteliale, in posizioni *random*, con ingrandimento 40X.

#### **4.5 Estrazione dell'RNA arricchito della componente endoteliale dall'arco aortico**

Per effettuare l'estrazione dell'RNA arricchito della componente endoteliale da arco aortico, abbiamo messo a punto la variante del metodo descritto da Krenek [99]. Tale tecnica è stata descritta in precedenza, nel paragrafo 4.1. Diverse prove sperimentali sono state effettuate al fine di identificare il corretto volume di soluzione fenolica, ed il tempo ottimale di eluizione dell'arco aortico, in modo tale da ottenere una efficiente lisi e raccolta della componente dell'endoteliale senza intaccare gli strati sub-intimali dell'aorta. Dall'analisi RT-PCR, condotte per la ricerca dei trascritti di geni marker dell'endotelio e della muscolatura liscia vasale nei diversi lisati di aortici di topi WT (C57BL6/J), è stato valutato che volumi maggiori di 350 µl di soluzione fenolica, fatti fluire attraverso l'arco per un tempo superiore a 30 sec, causavano lisi dell'intera struttura dell'aorta. Al contrario volumi minori di 350 µl di soluzione di lisi eluiti per tempi pari o inferiori a 30 sec, hanno fornito una resa esigua di RNA (dati non mostrati). Una efficace estrazione dell'RNA endoteliale (o comunque della porzione intimale dell'aorta), che non intaccava eccessivamente la tonaca media aortica, è stata ottenuta con una perfusione continua di 350 µl di *buffer* di lisi per 30 sec. Come previsto, per via della selettività di questo metodo di estrazione, da ogni singolo arco la resa in RNA era compresa tra 150 e 600 ng, ovvero una resa minore rispetto agli studi in cui veniva lisata una identica porzione di aorta. Le analisi *real time* (RT) PCR sui trascritti genici relativi alla proteina ribosomiale L13 (RPL13), Hey1, eNOS e *calponin-related protein* (SM22) marker delle cellule vascolari muscolari lisce, ottenuti tramite purificazione dell'RNA dai lisati aortici, eseguita con kit fornito di colonnine ad elevata affinità per l'RNA che permettevano la purificazione fino ai miRNA (miRNeasy Micro Kit; Qiagen, cat.No. 217084). L'analisi dei dati di RT-PCR ha dimostrato che i trascritti genici ricercati sono stati correttamente e selettivamente amplificati, e che il campione presentava arricchimento dell'RNA endoteliale.

#### 4.6 Analisi microarray: esperimento di settaggio

Sia per questo studio preliminare sull'espressione genica che per gli studi sull'effetto dell'ivabradina (trattato di seguito), era bilanciata per roditori e non era arricchita in lipidi. Per stabilire le fasi temporali delle prime variazioni di espressione genica endoteliale nell'arco aortico abbiamo proceduto con uno studio di *time course* basato sull'espianto dell'aorta da 4 gruppi di topi ApoE<sup>-/-</sup> (n=16), sacrificati a 4 diversi *time point*: 6, 7, 8 e 10 settimane di età. Per questo esperimento, come per tutti gli esperimenti da noi condotti per verificare gli effetti dell'ivabradina in arco aortico, gli animali erano sottoposti a dieta normale (Harlan Teklad Rodent Diet 2018), ovvero non veniva fornito cibo arricchito in lipidi. La tecnica di espianto e perfusione nell'arco aortico è stata eseguita con la stessa modalità descritta nei paragrafi 4.3 e 4.3.1. L'integrità e la resa dell'RNA è stata determinata tramite l'Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies). In seguito alla convalida della qualità, 140 ng totali di RNA estratto dagli archi aortici di due ApoE<sup>-/-</sup> (70 ng per ciascun arco), appartenenti allo stesso gruppo di età, sono stati caricati in un pozzetto del chip macroarray (Agilent Whole Mouse Gene Expression Microarray #G4122F, Agilent Technologies, Palo Alto, CA). Infatti, dato che ciascun gruppo di età era formato da 4 topi, il caricamento dell'RNA estratto dagli archi aortici come "pool di due archi" è stato eseguito in doppio, così da occupare tutti gli otto pozzetti di cui era composto il chip. Di seguito lo schema dell'organizzazione del chip microarray per l'analisi dell'espressione genica per ogni fascia di età.

ApoE <sup>-/-</sup> mice	Microarray Chip	
6 weeks old (n=4)	ApoE 1 + ApoE 2	ApoE 3 + ApoE 4
7 weeks old (n=4)	ApoE 5 + ApoE 6	ApoE 7 + ApoE 8
8 weeks old (n=4)	ApoE 9 + ApoE 10	ApoE 11 + ApoE 12
10 weeks old (n=4)	ApoE 13 + ApoE 14	ApoE 15 + ApoE 16

Il livello di l'espressione genica è stata stimata in base alla differenza di intensità a singola fluorescenza (data dalla sonda cianina 3- CTP) tra gli stessi gruppi di geni. L'RNA da noi estratto è stato copiato in cRNA in presenza di cianina 3- CTP (Perkin-Elmer Life Sciences) per effettuare la marcatura, utilizzando il *Low RNA Input Linear Amplification Kit* (Agilent Technologies). L'ibridizzazione di su chip è stata condotta a 65°C per 17 ore.



Immagini a 5  $\mu\text{m}$  di risoluzione di ogni pozzetto del chip sono state generate dall'Agilent scanner e i segnali raccolti tramite software Agilent 10.5, ottenendo in questo modo i dati grezzi del segnale letto nel chip microarray. Il segnale risultante dal chip è stato poi analizzato tramite il software GeneSpring GX 11 (Agilent Technologies).

Differenze di espressione genica tra i gruppi di interesse sono stati selezionati per un *fold change*  $\geq 1.5$  volte e per un valore di *p-value cut-off*  $\leq 0,05$  nell'*unpaired t test*. Il raggruppamento gerarchico dei valori di espressione ottenuti è stato effettuato utilizzando la correlazione Manhattan come misura di somiglianza.

#### **4.7 Analisi *microarray*: valutazione degli effetti del trattamento**

Per lo studio sugli effetti dell'ivabradina abbiamo utilizzato 24 topi ApoE  $-/-$  maschi, suddivisi in due gruppi principali: un gruppo di 12 ApoE  $-/-$  trattati con 30mg/Kg/die di farmaco a partire dalla 6° settimana di vita, e un gruppo formato dai restanti 12 ApoE  $-/-$  non sottoposti ad alcun trattamento (gruppo di controllo). Gli animali sono stati stabulati in gabbie adatte a contenere 3 individui e tutti erano posti nelle medesime condizioni di luce, temperatura e umidità e cibati con dieta standard. Il trattamento farmacologico veniva fornito tramite acqua di abbeveraggio contenuta nella borraccia di abbeverazione presente in ogni gabbia. Sono stati monitorati i livelli di consumo dell'acqua e, nel gruppo trattato, l'ivabradina è stata ri-somministrata settimanalmente tramite ricarica delle borracce, dopo aver aggiustato la dose sul peso aggiornato degli animali. Il giorno precedente l'inizio del trattamento, ovvero allo scadere della 5° settimana di età, è stata monitorata la HR basale (*base line*) in un gruppo di 12 ApoE  $-/-$  selezionato in modo *random* dai 24 animali di partenza. Questi 12 ApoE  $-/-$  formarono il gruppo dei trattati, e vennero sacrificati ad 8 settimane ( $n=6$ ) e a 10 settimane ( $n=6$ ) di vita. Trascorsi 11 giorni di assunzione di ivabradina (ovvero a 3 giorni dalla prima data di sacrificio), 6 topi ApoE  $-/-$  provenienti dal gruppo dei 12 animali sotto trattamento farmacologico sono stati selezionati (in modo *random*), marcati e nuovamente monitorati con ecocardiografia, per verificare se vi era riduzione della frequenza cardiaca rispetto alla *base line*. Le misurazioni indicarono una HRRm dopo 11 giorni di ivabradina pari a  $17.4\% \pm 2$  (*base line* =  $727 \pm 8$  bpm, 11° giorno di ivabradina =  $601 \pm 9$  bpm;  $p\text{-value} < 0.0001$ ) (Grafico 3, riportato in "Dati supplementari"). Al raggiungimento della 8° settimana di vita i 6 ApoE  $-/-$  selezionati e marcati sono stati sacrificati, insieme a 6 ApoE  $-/-$  prelevati in modo *random* dal gruppo di controllo ottenendo, tramite perfusione con soluzione di lisi cellulare, un totale di 12 campioni di RNA arricchiti nella componente endoteliale degli archi aortici. Le tecniche di misurazione della HR, di espianto e perfusione nell'arco aortico sono state eseguite con la stessa modalità descritte nei paragrafi 4.2, 4.3, 4.3.1 .

Identiche procedure operative sono state effettuate sugli ApoE<sup>-/-</sup> rimanenti, 6 trattati e 6 non trattati. Il monitoraggio della HR del gruppo trattato fu eseguito al 25° giorno di somministrazione del farmaco, ovvero a tre dal sacrificio come con il gruppo precedente. Rispetto alla misurazione della *base line*, la HRRm ottenuta era pari al 23% ± 2 (*base line* = 727 ± 5 bpm, 25° giorno di ivabradina = 560 ± 13 bpm; p-value < 0.0001) (Grafico 3, in “Dati supplementari”).

In seguito all'estrazione dell'RNA arricchito nella componente endoteliale dai 12 ApoE<sup>-/-</sup> sacrificati a 10 settimane di età, si è proceduto con l'allestimento di due chip microarray (un chip dedicato agli ApoE sacrificati ad 8 settimane ed uno per quelli a 10 settimane). L'ammontare di 70 ng di RNA ricavato dall'estrazione dell'endotelio di arco aortico è stato riunito in “*pool* di due archi” raggruppati in base all'età e al trattamento (ivabradina o controllo), ottenendo un importo finale di 140 ng di RNA da caricare nel chip microarray.

Il cDNA è stato ibridato su chip modello *Agilent Whole mouse Gene Expression microarray* (# G4122F, Agilent Technologies, Palo Alto, CA), lo stesso modello impiegato per il precedente l'esperimento di *time point*. Sono stati, dunque, caricati triplicati (n = 6 topi) sia per la condizione di trattamento che per quella di controllo, divisi in due chip differenti in base all'età del sacrificio (chip per 8° settimana e chip per 10° settimana), come di seguito riportato.

ApoE <sup>-/-</sup> mice	Microarray Chip	
Group (n=6):	ApoE 1 + ApoE 2	ApoE 3 + ApoE 4
8 weeks old UNTREATED	ApoE 5 + ApoE 6	ApoE 7 + ApoE 8
8 weeks old TREATED	ApoE 9 + ApoE 10	ApoE 11 + ApoE 12

ApoE <sup>-/-</sup> mice	Microarray Chip	
Group (n=6):	ApoE 13 + ApoE 14	ApoE 15 + ApoE 16
10 weeks old UNTREATED	ApoE 17 + ApoE 18	ApoE 19 + ApoE 20
10 weeks old TREATED	ApoE 21 + ApoE 22	ApoE 23 + ApoE 24

Come per l'esperimento precedente di *time point*, l'espressione genica è stata stimata in base alla differenza di intensità a singola fluorescenza (data dalla sonda cianina 3- CTP) tra gli stessi gruppi di geni. L'RNA da noi estratto è stato copiato in cDNA in presenza di cianina 3-CTP (Perkin-Elmer Life Sciences) per effettuare la marcatura, utilizzando il *Low RNA Input Linear Amplification Kit* (Agilent Technologies). L'ibridizzazione di su chip è stata condotta a 65°C per 17 ore. Immagini a 5 µm di risoluzione di ogni pozzetto del chip sono state generate dall'Agilent scanner e i segnali raccolti tramite software Agilent 10.5, ottenendo in questo modo i dati grezzi del segnale letto nel chip microarray. Il segnale risultante dal chip è stato poi analizzato tramite il software GeneSpring GX 11 (Agilent Technologies).

Differenze di espressione genica tra i gruppi di interesse sono stati selezionati per un *fold change*  $\geq 1.5$  volte e per un valore di p-value cut-off  $\leq 0,05$  nell'*unpaired* t test. Il raggruppamento gerarchico dei valori di espressione ottenuti è stato effettuato utilizzando la correlazione Manhattan come misura di somiglianza.

#### **4.8 Analisi *en face* e lesione della parete dell'arco aortico: studio di settaggio**

Per lo studio preliminare abbiamo utilizzato un gruppo di 7 topi ApoE<sup>-/-</sup> maschi alimentati con dieta standard e sacrificati alla 16° settimane di vita, in cui abbiamo indagato la superficie luminale dell'arco aortico tramite analisi *en face*. L'integrità e morfologia del *monolayer* endoteliale è stato valutato grazie a colorazione anticorpale per la *VE-cadherin*, proteina *marker* delle cellule endoteliali, e la presenza di nuclei apoptotici è stata indagata tramite saggio TUNEL. Per poter operare un confronto attendibile tra l'entità del danno vascolare rilevato con il nostro *staining* e i dati presenti in letteratura su ApoE<sup>-/-</sup>, abbiamo condotto un esperimento in parallelo su un secondo gruppo di 7 topi a cui è stata somministrata una dieta ricca in colesterolo (*high cholesterol diet*; Charles River) per 8 settimane dalla 8° fino alla 16°, età del sacrificio.

Inoltre, abbiamo implementato un nuovo gruppo di 7 animali sacrificati alla 24° settimana di vita e alimentati con dieta standard, per verificare la presenza ed estensione delle lesioni delle pareti dell'arco aortico tramite analisi *en face*.

Per confermare la natura aterosclerotica delle lesioni nell'arco aortico, abbiamo eseguito una colorazione con il *Nile Red*, colorante affine alle strutture lipidiche, di 3 archi aortici di topi ApoE<sup>-/-</sup> sacrificati alla 24° settimana di vita, cibati con dieta normale. La presenza di zone positive al *Nile red* (*core* lipidici situati nella parete vasale) è stata indagata grazie all'analisi *en face* dell'arco aortico.

Nessuna procedura sperimentale è stata variata tra questi due nuovi gruppi di animali sacrificati a 24 settimana di età e i due gruppi iniziali, sacrificati a 16 settimane di vita; quindi dalla procedura di sacrificio alla colorazione anticorpale per *VE-cadherin* e saggio TUNEL, sono state eseguite le stesse procedure riportate nel paragrafo 4.3.2 . Di seguito viene riportato lo schema sperimentale.

ApoE <sup>-/-</sup> mice	En face analysis	
Group: Norm. diet <span style="display: inline-block; width: 15px; height: 15px; background-color: yellow; border: 1px solid black; margin-left: 5px;"></span>	7 ApoE <sup>-/-</sup> , 16 w.o	v. s. 7 ApoE <sup>-/-</sup> , 16 w.o
High cholesterol <span style="display: inline-block; width: 15px; height: 15px; background-color: lightgreen; border: 1px solid black; margin-left: 5px;"></span>	7 ApoE <sup>-/-</sup> , 24 w.o	
Nile red <span style="display: inline-block; width: 15px; height: 15px; background-color: pink; border: 1px solid black; margin-left: 5px;"></span>	3 ApoE <sup>-/-</sup> , 24 w.o	

Una volta effettuato lo *staining* anticorpale per *VE-cadherin* associato al saggio TUNEL o la colorazione Nile red, gli archi aortici dei tre gruppi di animali (riportati nello schema sperimentale) sono stati indagati tramite analisi *en face* eseguita al microscopio confocale (LSM510; ZEISS) a 10 e 40X di ingrandimento.

#### 4.9 Analisi *en face* e lesione della parete dell'arco aortico: valutazione degli effetti del trattamento

Per lo studio principale riguardante gli effetti dell'ivabradina in seguito a trattamento, sono stati utilizzati 16 topi ApoE<sup>-/-</sup> maschi alimentati con dieta standard, divisi nel gruppo trattato (n=10) e controllo (n=6). La dose di ivabradina pari a 30mg/kg/die è stata somministrata tramite acqua di abbeveraggio a partire dalla 6° settimana di età, ed era uguale a quella impiegata nell'esperimento principale di *microarray*. Inoltre, avevamo già accertato la validità di tale dose nell'indurre una sostenuta riduzione delle frequenza cardiaca (vedi il paragrafo 5.1.3 in "risultati e discussione"). Gli animali sono stati stabulati in gabbie adatte a contenere fino a 4 individui e tutti erano posti nelle medesime condizioni di luce, temperatura e umidità e cibati con dieta standard. Il trattamento farmacologico veniva somministrato attraverso l'acqua di abbeverazione contenuta in borracce presenti in ogni gabbia. Sono stati monitorati i livelli di consumo dell'acqua, e nel gruppo trattato veniva ricaricata settimanalmente l'intera scorta di acqua, dopo aver aggiustato la dose sul peso aggiornato degli animali. Allo scadere della 5° settimana, prima della divisione degli animali nei gruppi trattamento e controllo, si è proceduto con la selezione *random* di 10 ApoE<sup>-/-</sup> per la misurazione della HR basale (*base line*) tramite

ecocardiografia, da cui è risultata una HR media pari a  $716 \pm 9,1$  bpm (tecnica di misurazione riportata nel paragrafo 4.2). Gli animali selezionati hanno formato, quindi, il gruppo dei trattati dato che gli stessi ApoE<sup>-/-</sup> sono stati monitorati dopo due settimane di assunzione del farmaco (8° settimana di vita), ed è risultata una HR media pari a  $547 \pm 19.1$  bpm. Il trattamento con ivabradina dopo 14 giorni ha determinato, quindi, una riduzione delle frequenza cardiaca media (*mean heart rate reduction, HRRm*) pari al  $23,6 \pm 3 \%$  (Grafico 4, in “Dati supplementari”).

In accordo con l’analisi *en face* preliminare, che ha indicato l’età idonea per l’identificazione delle lesioni aterosclerotiche, raggiunta la 24° settimana di vita gli animali trattati con ivabradina e non, sono stati sacrificati per poter procedere con la perfusione e fissazione dei vasi. A seguire sono stati espianati gli archi aortici ed effettuato lo *staining* anticorpale per *VE-cadherin* (tecnica di espianto e *staining* riportata nei paragrafo 4.3 e 4.3.2). Al termine dello *staining* sono state analizzate le superfici luminali di tutti gli archi utilizzando il microscopio confocale a scansione (LSM510; ZEISS). Per ogni campione sono state acquisite 15 immagini (40X *magnification*). Di seguito viene riportato lo schema sperimentale.

ApoE <sup>-/-</sup> mice	En face analysis	
Group: Ivabradina <span style="color: yellow;">■</span> Control <span style="color: green;">■</span>	10 ApoE <sup>-/-</sup> , 24 w.o	6 ApoE <sup>-/-</sup> , 24 w.o

### Farmaco utilizzato

Il farmaco utilizzato in tutti i gruppi di animali trattati in questo studio corrispondeva a ivabradina cloridrato (*ivabradine hydrochloride*) in polvere, altamente solubile allo stato puro (senza presenza di eccipienti), avente peso molecolare pari a: 468.58514 g/mol

Il farmaco era fornito dal produttore: Les Laboratoires Servier 50, rue Carnot 92284 Suresnes cedex - Francia

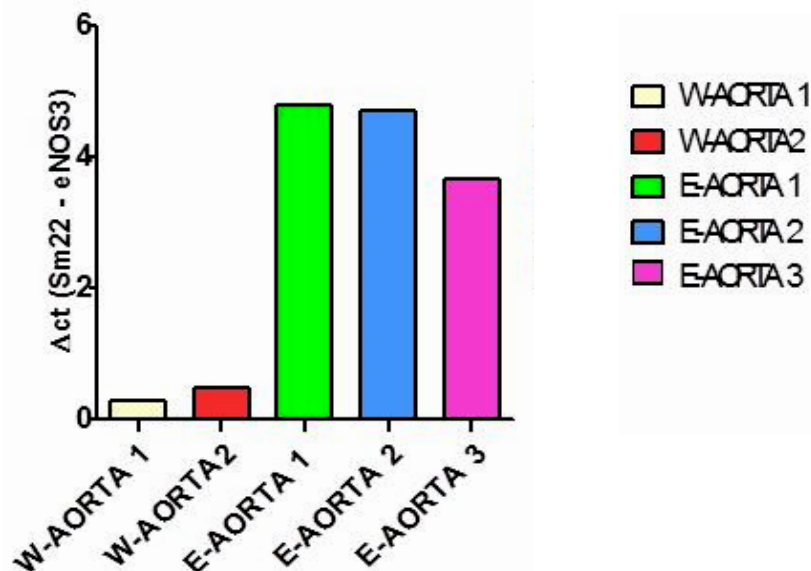
Nome alternativi del farmaco: Coralan, Procoralan; Ivabradine HCl; 2H-3-Benzazepin-2-on; Ivabridine hydrochloride; Ivabradine hydrochlorid; Ivabradine hydrochloride; Ivabradine HCl; (Procoralan); 3-[3-[[[(3,4-diMethoxybicyclo[4.2.0]octa-1,3,5-trien-7yl)Methyl]Methylamino]propyl]-1,3,4,5-tetrahydro-7,8-diMethoxy-, Monohydrochloride.

## 5. RISULTATI E DISCUSSIONE

### 5.1 Ivabradina ed espressione genica: studi di settaggio

#### 5.1.1 Estrazione dell'RNA arricchito della componente endoteliale dall'arco aortico: validazione

Sono state condotte analisi di RT-PCR su RNA purificato da lisati della tonaca intima, quindi, contenenti principalmente la componente endoteliale dell'arco aortico di topi WT. Da tali analisi è stato confermato un notevole arricchimento dei trascritti genici del *target* endoteliale eNOS, a fronte di una scarsa amplificazione delle sequenze di RNA per il gene Sm22, *target* delle cellule muscolari lisce. Tale differenza nella quantità dei trascritti per eNOS e SM22 nei lisati di arco aortico era esprimibile come  $\Delta ct$  (differenza del numero di cicli di amplificazione per eNOS e SM22). Le analisi RT-PCR condotte su RNA purificato da lisati ottenuti da triturazione meccanica dell'intero arco aortico, hanno evidenziato una quantità simile dei trascritti per il gene eNOS e SM22, indice di una assenza di arricchimento della componente endoteliale e muscolare (grafico 5).



**Grafico 5:** Arricchimento di eNOS3 (marker endoteliale) rispetto a Sm22 (marker delle VSMC) valutabile tramite il  $\Delta ct$ , si evidenzia che solo nei campioni ricavati con la tecnica di eluizione dell'aorta. Campioni di RNA purificati in seguito a triturazione dell'intero arco aortico non presentano arricchimento di marker endoteliale rispetto a quello muscolare. (W-AORTA = RNA da tutto l'arco aortico, E-aorta: RNA da endotelio solo).

### 5.1.2 *Time course* della modificazione dell'espressione in senso aterogenica nell'arco aortico di topi ApoE<sup>-/-</sup> dalla 6° alla 10° settimana di vita

Al fine di verificare se a 10 settimane di vita nei topi ApoE<sup>-/-</sup> alimentati con dieta normale vi fosse evidenza dei primi processi di aterosclerosi, abbiamo analizzato le differenze di espressione dell'endotelio dell'arco aortico tra i gruppi sacrificati a 6 e 10 settimane di vita. Il numero totale di geni modulati in modo significativo tra questi due *time point* era 1080 (*fold change* avente *cut off* pari a 2.0). Fra questi geni, 308 erano down-regolati e 92 sono stati up-regolati più di 4 volte. Questi stessi geni mostravano, al contrario, una espressione variabile tra i gruppi di topi a 7 e 8 settimane di vita. L'analisi dei *pathway* tra le 6 e 10 settimane ha evidenziato differenze nella modulazione del ciclo cellulare (6 *pathway*), adesione cellulare (4 *pathway*), risposta immunitaria (8 *pathway*), aterosclerosi (1 *pathway*) e apoptosi (2 *pathway*).

*Down-regolazione* a 10 settimane della ciclina B1, chinasi ciclina-dipendente 1 (cdk1) e survivina (un inibitore della caspasi 9) suggerisce che l'apoptosi nell'endotelio si verifichi a causa dell'arresto del ciclo cellulare nella fase G2/M. Un aumento di apoptosi a 10 settimane è suggerito anche da un incremento di Phap1, uno stimolatore della via apoptotica mitocondriale. Abbiamo trovato differenze significative nell'espressione di geni per i recettori delle chemochine e dei loro ligandi (CCL3, CCR7, CCR9, Ccr11), per le interleuchine e dei loro recettori (Il10ra, Il17rb, Il18bp, Il5ra, IL7R) e per la metalloproteinasi 9 (MMP9).

Abbiamo anche controllato i geni corrispondenti alle sequenze di cDNA che hanno un forte segnale di ibridazione e che hanno mostrato cambiamenti dell'espressione ai diversi *time point*, anche se il software utilizzato per l'analisi del microarray non sempre ha valutato statisticamente significatività tale variazione di espressione. Utilizzando questo approccio abbiamo identificato ulteriori recettori delle chemochine e loro ligandi (CCL17, CCL4, Cxcl17, CCR6, CCR9, CXCR2, CXCR5) e interleuchine e loro recettori (IL1B, Il10ra, Il17rb, Il18bp, Il20rb, Il25). Di notevole interesse è la forte *down-regolazione*, pari a 29 volte, del gene per CcCa3 (canale del calcio - cloro attivato 3), in quanto la via di segnalazione del calcio è nota per influenzare la suscettibilità aterosclerosi [100] e CcCa1 (canale del calcio - cloro attivato 1) ha dimostrato di regolare la permeabilità al calcio delle cellule endoteliali [101]. Inoltre, la metalloproteinasi 12 (MMP12) associata all'inizio dell'aterosclerosi [102] appariva up-regolata di 3 volte nel gruppo di animali di 10 settimane rispetto a quello di 6, al contrario, non abbiamo rilevato cambiamenti nell'espressione di ICAMs, VCAMs e MCP-1 a 10 settimane. Tra gli altri geni modulati abbiamo identificato: *ATP-binding cassette - sub-family B* (MDR / TAP) - member 1A (Abcb1a), sinaptogirina 1 (syng1), proteina *ring finger* 149 (rnf149), lipocalina 2 (lcn-2),

interleuchina recettori 7 e 10 (IL7r e Il10r), oncogene del sarcoma virus di harvey (Hras1), extra cellular proteinase inhibitor (Expi), ATP-binding cassette - sub-family C - member 3 (Abcc3). Tutti questi geni erano stati precedentemente associati allo sviluppo di aterosclerosi sia nella condizione di dieta ricca in grassi che normale in ApoE +/- da Tabibiazar et al. Anche l'interleuchina 1 b (Il1b) appariva up-regolata (2.27-volte) come osservato nei corpi *Weibel-Palade* delle cellule endoteliali in seguito a stimolo infiammatorio [103]

La sovrapposizione tra i geni da noi identificati come diversamente espressi nel tempo con quelli considerati implicati in senso aterosclerotico e lesivo per le EC in altri lavori, è una conferma del nostro algoritmo e della nostra metodologia e analisi.

L'analisi statistica dei cambiamenti di espressione genica tra le 6 e 7 settimane di vita (Figura 3, a sinistra) ha identificato 603 geni (*fold change cut-off: 2*). Fra questi geni, 105 erano *up-* o *down-*regolati più di 4 volte. Sono stati trovati modificati pathway relativi alla: risposta immunitaria (10 *pathway*) di cui 2 erano associati all'oncostatina M, coinvolta nella progressione dell'aterosclerosi [104,105]; all'aterosclerosi (1 *pathway*), all'adesione cellulare (1 *pathway*).

E' interessante notare che tra i geni che variano di espressione a 7 settimane, sono stati identificati up-regolati il recettore per chemochine (Ccr1) e suoi ligandi (CCL11, Ccl12), e *down-*regolata la caderina1 (CDH1). Chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL2, chiamato anche MCP-1) presentava up-regolazione, ma non ICAM e VCAM. Slep1 (che codifica per una proteina formata da complement binding motifs), il fattore di von Willebrand *type A domain* (vWF-A), Epidermal Growth Factor (EGF) e EGF-like calcium binding, erano up-regolati a di 2.2 volte a 7 settimane.

L'analisi statistica dei cambiamenti nell'espressione genica a 8 settimane rispetto a 6 settimane ha mostrato 538 geni coinvolti (*fold change cut-off: 2*), 84 dei quali erano up- o down-regolato più di 4 volte. Tra le vie cellulari trovate alterate vi erano quelle della risposta immunitaria (18 *pathway*), dell'aterosclerosi (1 *pathway*), dell'adesione cellulare (3 *pathway*) e dell'apoptosi (1 *pathway*). Tra i geni endoteliali che risultano variare di espressione a 8 settimane abbiamo individuato up-regolazione di Chemokine (C-C motif) ligand 8 e Chemokine (C-C motif) receptor 1 (rispettivamente Ccl8 e Ccr1) e anche CCL2 (o MCP-1) risultava up-regolato, mentre CCR7 presentava down-regolazione. Non abbiamo rilevato cambiamenti della espressione genica di ICAM e VCAM a 8 settimane.

Molti dei geni aventi una diversa espressione a 7 settimane presentavano un andamento simile nell'espressione a 8 settimane (398 geni), che veniva mantenuto anche a 10 settimane. All'interno di questo gruppo aventi livelli di espressione paragonabili tra 7, 8, e 10 settimane, vi erano 40 geni up- o down-regolati più di 4 volte. Alcuni di questi geni erano recettori per le chemochine ed i loro leganti (Ccl8, Ccr1, CCR10, CCR7).



Risulta interessante che tra le sequenze geniche up-regolate ai diversi *time point* vi era il von *Willebrand factor - A domain containing 3B* (Vwa3b-003). E' stata anche trovata up-regolazione del recettore del fattore attivante le piastrine (Ptafr), che ha dimostrato di riuscire a dissociare le *tight junction* delle cellule endoteliali [106]. Dunque, già dalla 7° settimana di età abbiamo trovato cambiamenti nell'espressione di un numero significativo di geni implicati nella morte cellulare e nell'infiammazione. Inoltre, abbiamo appurato che alcuni dei geni ad alterata espressione manifestavano lo stesso andamento tra la 7° e 8° settimana, ma il numero più consistente di geni indice di danno endoteliale e aventi i più alti cambiamenti nel grado di espressione, sono stati da noi identificati alla 10° settimana di età.

### **5.1.3 Determinazione della dose di ivabradina per l'ottenimento di una sostenuta attività bradicardizzante**

Esperimenti preliminari sono stati condotti per verificare se vi era sostenuta attività bradicardizzante, ovvero se si verificava una condizione di sostenuta riduzione della HR media, o HRRm, che doveva essere compresa entro un *range* che andava dal 16 e 23%, in base ad recenti studi su modello animale presenti in letteratura.

Inizialmente abbiamo indagato gli effetti della somministrazione per 6 giorni di 15 mg/kg/die di ivabradina; tale dose è stata scelta in quanto si colloca tra due diversi dosaggi utilizzati in due successivi studi in cui veniva ridotta la HR in ApoE<sup>-/-</sup>. La dose minore utilizzata nel primo studio, pari a 10 mg/kg/die, riduceva l'HR del 13,4% [107], mentre la dose più alta utilizzata nello studio successivo, pari a 20 mg/kg/die, riduceva l'HR del 23% [108]. Il primo monitoraggio è stato eseguito con un gruppo di 7 topi ApoE<sup>-/-</sup> aventi 6 settimane di età, da cui è risultata una HR media pre-trattamento (o basale) pari a 709 ± 12 bpm ed una HR media post-trattamento (al termine dei 6 giorni di somministrazione di farmaco) pari a 636 ± 20 bpm ovvero una riduzione media della frequenza cardiaca (HRRm) del 10% ± 3 (grafico 1.1 e 1.2 in "Dati supplementari"). Abbiamo osservato delle fluttuazioni della HRR% per alcuni animali, che sono da imputare a una differente assunzione di farmaco nei primi giorni di trattamento, in base alla propensione individuale all'abbeveraggio. Dunque nei primi giorni di trattamento la dose di farmaco capaci di esplicitare una HRRm del 10% ± non veniva raggiunta con la medesima tempistica tra i singoli animali. Inoltre, nella misura della HR ha influenzato anche il diverso grado di stress e la conseguente risposta fisiologica, legata l'individualità dell'animale. Dato che la dose pari a 15 mg/kg/die non aveva indotto in nessun animale una riduzione della HR compresa tra il 16 ed il 20%, condizione da noi ritenuta indice di sostenuta attività bradicardizzante, in base ai dati pubblicati, abbiamo deciso di utilizzare

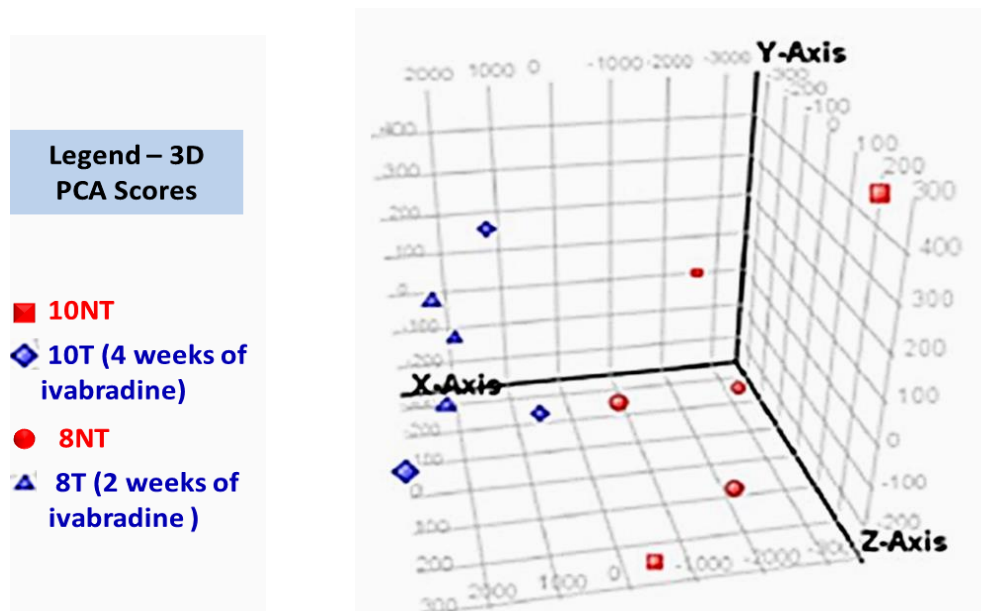
un diverso dosaggio di ivabradina. Nel secondo monitoraggio effettuato in un nuovo gruppo di 7 ApoE<sup>-/-</sup>, sono state mantenute inalterate tutte le procedure sperimentali eseguite con il primo gruppo di topi. Dato che la dose iniziale pari a 15mg/kg/die ipotizzavamo riducesse la HR di circa il 18%, mentre nelle nostre condizioni sperimentali la riduzione ottenuta è stata di circa 1,8 volte inferiore all'atteso, si è incrementato di 1,8 volte la dose di ivabradina da somministrare per portare poter determinare una HRRm del 18%. Tuttavia, per semplicità di calcolo, il nuovo dosaggio di farmaco anziché pari a 27 mg/kg/die è stato arrotondato a 30mg/kg/die, dato che la riduzione del 18% della HR poteva essere superata, in conformità con lo studio inizialmente considerato. Al termine del trattamento di 6 giorni con il secondo gruppo di ApoE<sup>-/-</sup>, è stata misurata una HR media di  $602 \pm 12$  bpm rispetto a quella iniziale pre-trattamento pari a  $748 \pm 7$  bpm, ovvero si è ottenuta una HRRm pari al  $19,5\% \pm 2$  (grafico 2.1 e 2.2 in "Dati supplementari"). Nonostante alcune fluttuazioni delle HRR% in alcuni individui, ascrivibili alle stesse considerazioni formulate per il primo gruppo di topi, il nuovo dosaggio di ivabradina ha determinato una sostenuta attività bradicardizzante, come indicato dalla HRRm che si è attestata tra il 16 ed il 20%. Tale *range* di riduzione della HR, oltre ad essere stato raggiunto dalla media delle misurazioni del secondo gruppo monitorato, risulta compresa nelle HRR% di ciascun animale.

## **5.2 Ivabradina ed espressione genica: valutazione degli effetti del trattamento**

### **5.2.1 Modulazione dell'espressione genica dipendente dell'ivabradina in senso atero-protettiva nell'endotelio dell'arco aortico**

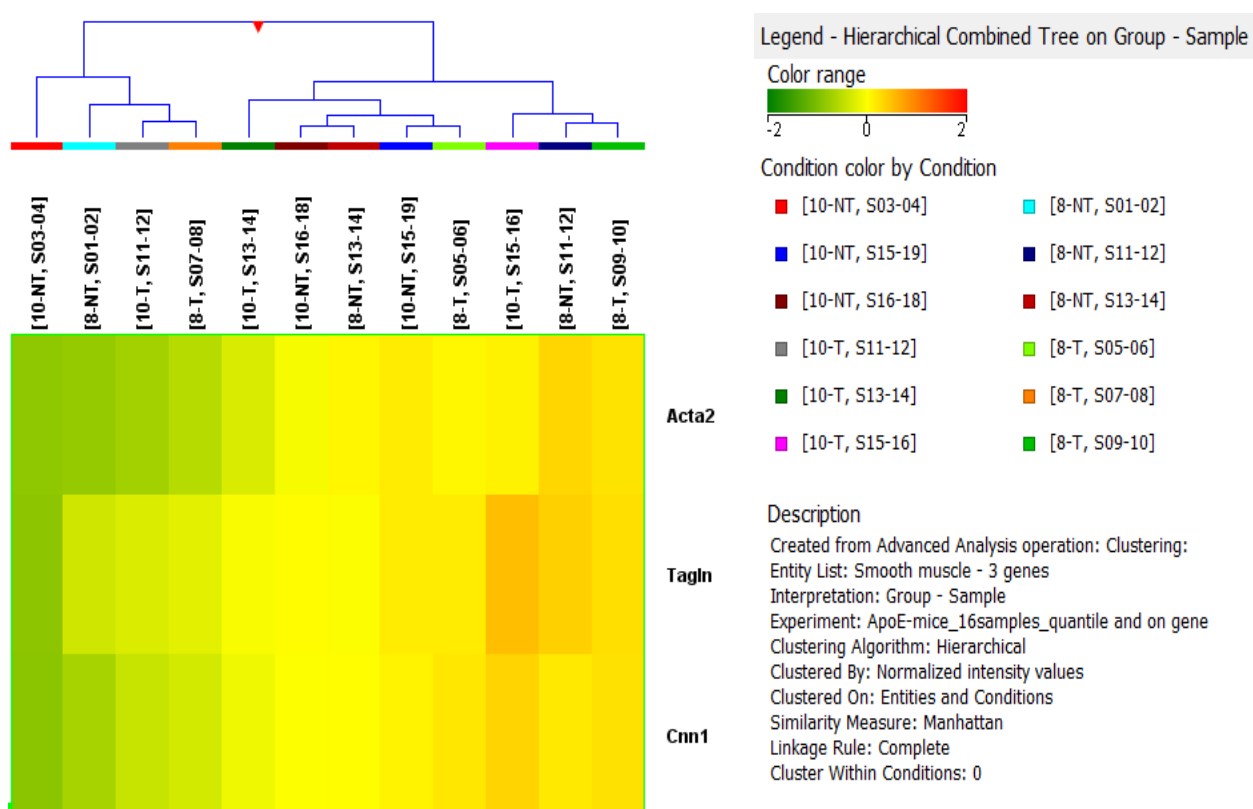
L'esperimento di *time course* ci ha fornito l'evoluzione del profilo di espressione genica endoteliale nelle prime settimane di vita, mentre i diversi monitoraggi della HR ha permesso di identificare la dose di ivabradina che consentiva una sostenuta riduzione della HR nelle nostre condizioni sperimentali. Grazie a questi dati preliminari, abbiamo delineato le condizioni ottimali per lo studio dell'efficacia del trattamento con ivabradina in senso atero-protettivo, tramite analisi dell'espressione genica endoteliale nell'arco aortico di topi ApoE<sup>-/-</sup>. Abbiamo, quindi, deciso di utilizzare animali aventi 10 settimane di età per via del più alto numero di geni endoteliali, coinvolti in apoptosi e infiammazione, trovati fortemente modificati nei valori di espressione rispetto alle altre età analizzate (6, 7, 8 settimane). Inoltre abbiamo scelto una età intermedia tra le 6 e le 10 settimana di vita, pari a 8 settimane, per verificare se la modificazione dell'espressione genica veniva

mantenuta durante le quattro settimane di trattamento e se era coerente con l'effetto farmacologico dell'ivabradina, o se le variazioni del profilo genico erano dovute solamente all'aumentare dell'età. Nonostante l'esperimento preliminare di *time point* abbia indicato che il profilo atero-genico assunto dall'endotelio dell'arco aortico a 8 settimane non si discostava in modo rilevante rispetto a 7 settimane, la scelta delle 8 settimane di età consentiva una durata più lunga di somministrazione del farmaco con conseguente stabilizzazione della sostenuta HRR. Inoltre la 8° settimana di vita corrispondeva esattamente al periodo intermedio per valutare degli effetti del trattamento sul profilo genico endoteliale. Ottenuti i risultati di espressione genica nel gruppo di topi ApoE<sup>-/-</sup> trattati fino alla 8° e 10° settimana rispetto al gruppo non trattato e sacrificato alle medesime età, è stata condotta la *principal component analysis* (PCA) a tre componenti. Questa analisi ha permesso di determinare se la modulazione dell'espressione genica osservata poteva essere attribuita al trattamento con ivabradina o semplicemente alla diversa età (fase di crescita) in cui sono stati indagati gli effetti del farmaco o, anche, a entrambe queste condizioni considerate insieme. I risultati di dell'analisi PCA (figura 7) indicano che la modificazione dell'espressione genica da noi riscontrata in seguito al trattamento è dovuta al trattamento con ivabradina e non è dipendente dell'età dell'animale. Ciò ha fornito il razionale per poter confrontare l'espressione genica tra gli animali: ApoE<sup>-/-</sup> 8T + 10T (gruppo trattato) ed il gruppo ApoE<sup>-/-</sup> 8NT + 10NT (gruppo non trattato).



**Figura 7:** nella rappresentazione grafica della PCA sono visibili due gruppi (punti rosso e blu) posti in due distinte aree del grafico, corrispondenti agli animali trattati con ivabradina e messi a confronto con i non trattati (blu vs rosso). Le diverse età all'interno di ciascun gruppo di trattamento (triangoli vs rombi e cerchi vs quadrati) sono distribuite in modo casuale nello spazio 3D, quindi la modulazione genica nei diversi gruppi dipende solo dal trattamento.

Per garantire che le differenze nell'espressione genica tra i due gruppi, T e NT, non fossero dovute a differente contributo di mRNA derivante dalla muscolatura liscia vasale (erroneamente estratta durante le procedure di eluizione dell'aorta), una *clustering analysis* è stata condotta sui livelli di espressione di tre geni specifici delle cellule muscolari vascolari: Acta2, Cnn1 e Tagln (o SM22). Come riportato in figura 8, la disposizione dei livelli di espressione per ciascuno di questi tre geni considerati indicava una distribuzione casuale della componente muscolare all'interno dei gruppi T e NT sia a 8 che a 10 settimane. Dunque non vi era correlazione tra il livello di espressione dei geni delle VMSC ed il gruppo di trattamento.

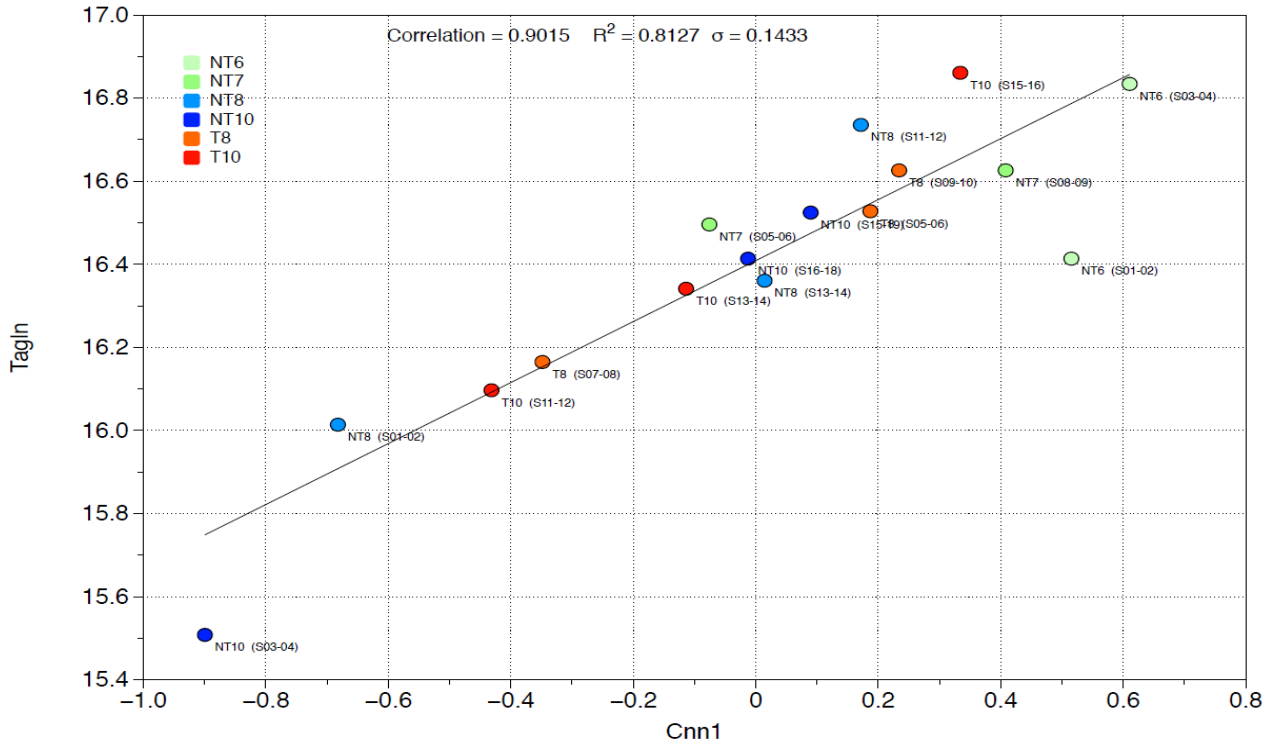


**Figura 8:** *clustering analysis* condotta sui livelli di espressione di: Acta2, Cnn1 e Tagln (o SM22), *marker* specifici delle VSMC. I livelli di espressione per ciascuno di questi tre geni indicava una distribuzione casuale della componente muscolare, quindi, non vi era correlazione tra il livello di espressione dei geni delle VMSC ed il gruppo di trattamento.

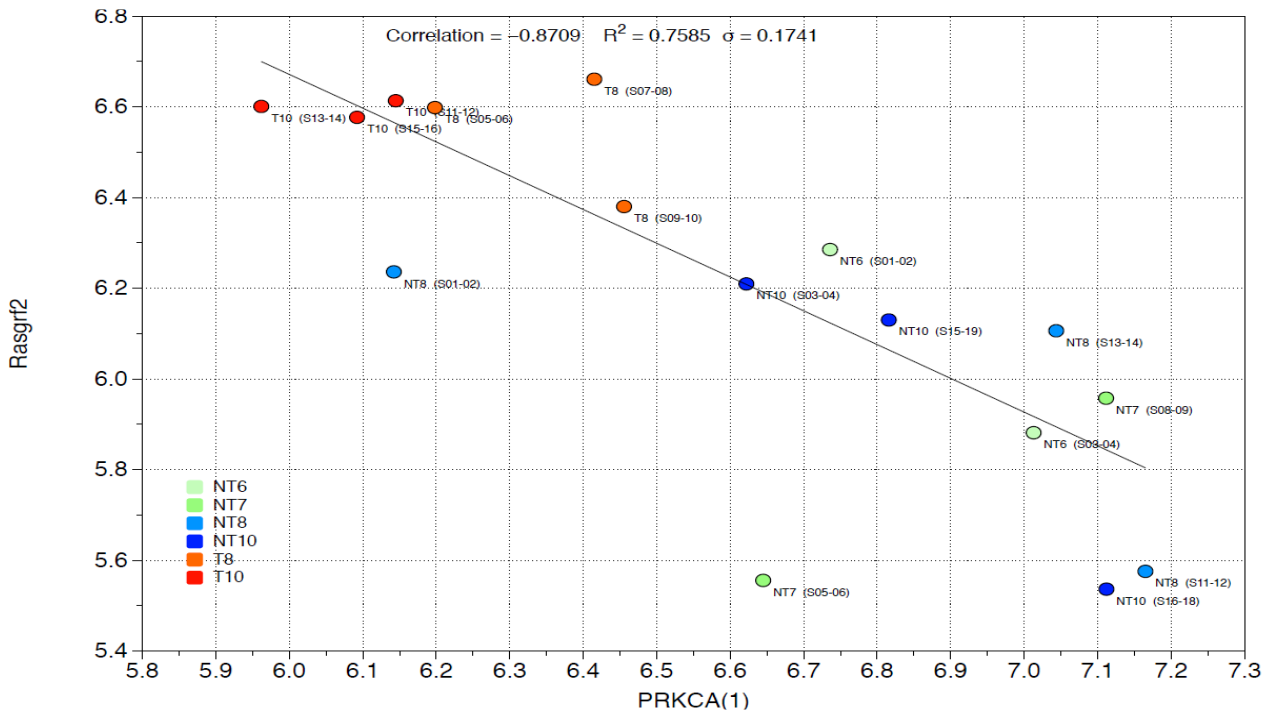
In aggiunta sono state condotte tre ulteriori analisi di correlazioni tra i livelli di espressione dei geni di interesse. La prima analisi (grafico 6) ha mostrato una correlazione positiva tra i geni Tagln e Cnn1, marker tipici della muscolatura liscia.

La seconda analisi (grafico 7) presenta una correlazione negativa tra i geni Rasgrf2 e PRKCA che risultano modulati dal trattamento farmacologico.

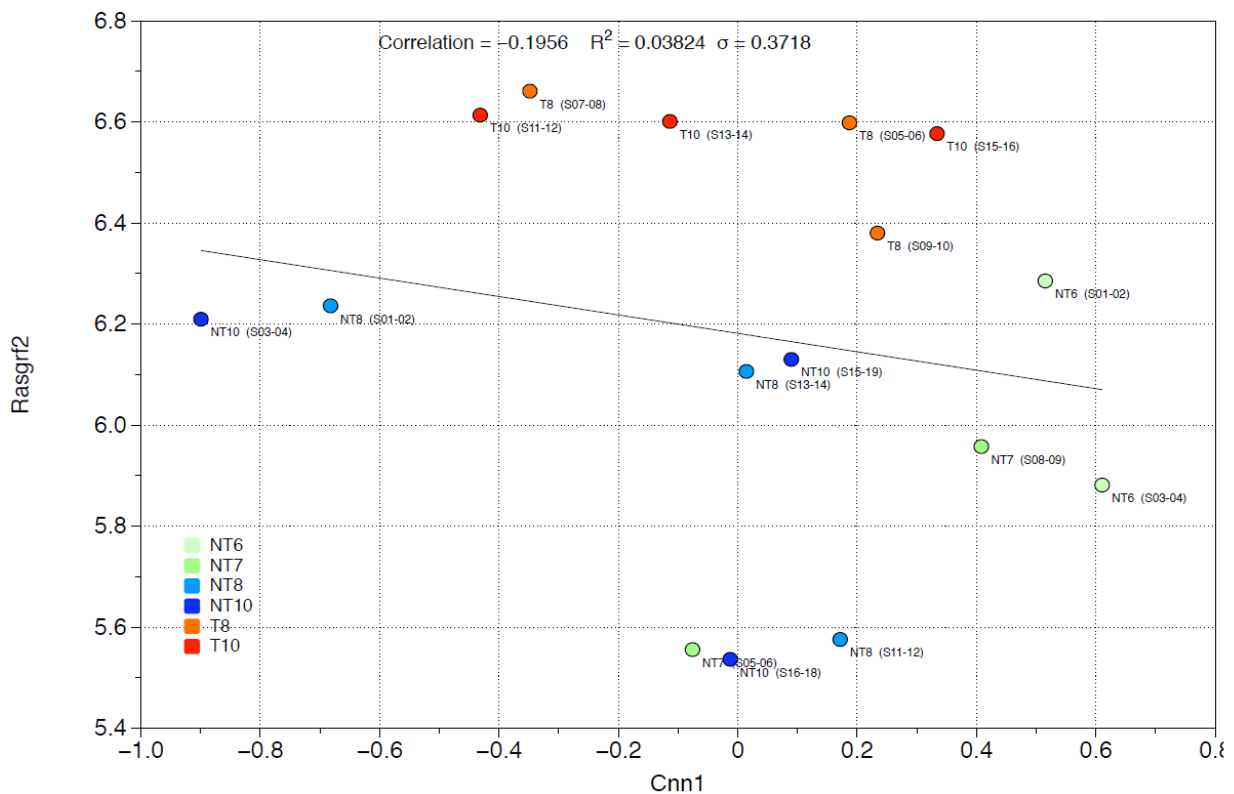
La terza analisi (grafico 8) indica assenza di correlazione tra il gene *Rasgrf2* la cui espressione è modulata dall'ivabradina e il gene *Cnn1* marker delle VSMC, che è presente a livelli casuali nei diversi *pool* di animali.



**Grafico 6:** correlazione positiva tra i geni *Tagln* e *Cnn1*.



**Grafico 7:** correlazione negativa tra i geni *Rasgrf2* e *PRKCA*.



**Grafico 8:** assenza di correlazione tra il gene Rasgrf2 la cui espressione è modulata dall'ivabradina e il gene Cnn1 marker delle VSMC,

Sulla base di queste valutazioni si evince che tra i diversi *pool* di animali, indipendentemente dall'età del sacrificio e della somministrazione del trattamento, vi è casuale contributo (arricchimento) di trascritti *maker* del tessuto muscolare vasale. Nonostante la presenza di un differente contributo di RNA della tonaca muscolare aortica tra i *pool* degli animali utilizzati nello studio, non appare esserci alcuna correlazione con la modulazione dell'espressione genica endoteliale rilevata con l'analisi microarray dei trascritti genici. Dunque, il profilo genico endoteliale viene modulato unicamente dal trattamento farmacologico senza essere influenzato da artefatti legati alla procedura sperimentale. Alla luce di queste considerazioni è stato possibile operare un confronto tra il profilo di espressione genica dei gruppi trattato e non trattato indipendentemente dalle due diverse età degli animali, dato che l'analisi PCA aveva confermato che la variazione di espressione genica tra il gruppo trattato e non trattato non è età-dipendente. Dal confronto del gruppo trattato (T) 8 + 10 settimane e il gruppo non trattato (NT) 8 + 10 settimane, abbiamo trovato che il trattamento con ivabradina modifica in modo significativo ( $p\text{-value} \leq 0.01$ ,  $\text{fold-change} \geq 1,5$ ) l'espressione di 930 sequenze geniche di cui 630 *up*-regolate e 300 *down*-regolate.

La *heatmap* di *clustering* gerarchico di espressione genica dei campioni provenienti da topi non trattati e trattati con ivabradina è mostrato in figura 9 nei "Dati supplementari".

### 5.2.2 Analisi dei singoli geni endoteliali

Per identificare i geni endoteliali potenzialmente legati all'infiammazione, ai processi di apoptosi e alla progressione aterosclerotica, è stata condotta una ricerca bibliografica tramite database Pubmed (US National Library of Medicine National Institutes of Health, <http://ncbi.nlm.nih.gov>). E' stata, quindi, ricercata un'associazione tra le 930 sequenze geniche che erano modulate dal trattamento ed i termini "aterosclerosi", "infiammazione" e "*shear stress*" nei lavori pubblicati.

Alcuni dei geni rispondenti ai criteri di ricerca da noi fissati e che presentavano elevato grado di modulazione in seguito al trattamento ed erano coinvolte in aspetti critici per il nostro studio, sono stati riportati di seguito.

### 5.2.3 Geni chiave nei processi pro-aterosclerotici modulati dal trattamento farmacologico

- **Nppc** (peptide natriuretico atriale, di tipo 1) risultava down-regolato 5.7 volte in seguito a trattamento farmacologico con ivabradina. Il gene NppC trascrive per il peptide natriuretico di tipo C (o CNP). Questo peptide presenta due molecole ad esso strutturalmente e funzionalmente correlate, ovvero il peptide natriuretico atriale di tipo A (o ANP) ed il peptide natriuretico di tipo B (o BNP), espressi rispettivamente dai geni NppA e NppB. CNP ha un effetto paracrino a livello vasale e integra le azioni endocrine di ANP e BNP nel mantenimento dell'omeostasi endoteliale, e nella regolazione del tono vasale, mentre a livello cardiaco determina l'attenuazione dell'ipertrofia e dei processi fibrotici a carico della parete muscolare (Lumsden, Khambata, e Hobbs 4080-88). Diversi lavori indicano che CNP può mobilitare le cellule endoteliali e favorire la re-endotelizzazione dei vasi sanguigni danneggiati, coerentemente con la sua attività pro-angiogenica [109] [110]. Altri studi hanno dimostrato che il CNP viene specificamente espresso e secreto a livello endoteliale in seguito a danno vasale e, quindi, in risposta a diversi mediatori dell'infiammazione tra cui: le citochine pro-infiammatorie come il fattore di necrosi tumorale (TNF $\alpha$ ) e l'interleuchina 1 (Il1), la tossina lipopolisaccaride batterica LPS ed il TGF- $\beta$  [111]. NppC risulta *up*-regolato in lesioni aterosclerotiche coronariche di pazienti asintomatici [112] ed è presente ad alti livelli nel siero dei pazienti in età avanzata con *coronary artery*

*desease* (o CAD) [113]. Invece, il miglioramento clinico e funzionale dopo allenamento fisico controllato in pazienti con scompenso cardiaco, è associato alla diminuzione della concentrazione di CNP circolante [114]. Ciò potrebbe essere dovuto ad una minore espressione di NppC a seguito di una condizione di ridotta infiammazione e compromissione cardiovascolare. Per questo motivo, data la possibile espressione di CNP in relazione al grado di danno vascolare, tale peptide potrebbe essere un *marker* di disfunzione vascolare, anche se il significato clinico dei livelli di CNP circolanti rimangono ancora da chiarire [115]. Inoltre, è stato anche osservato che la secrezione di CNP da parte dell'endotelio è modulata dalle forze di *shear stress* [109]. In base a quanto finora esposto, abbiamo ipotizzato che l'effetto bradicardizzante dell'ivabradina abbia ridotto il grado di disturbo del flusso arterioso nell'arco aortico (parziale aumento delle forze di ESS). Ciò avrebbe determinato una minore compromissione endoteliale e, quindi, una ridotta espressione di NppC (possibile marker di danno vascolare) nei topi trattati.

- **Olr1** (recettore (lectina-simile) delle lipoproteine ossidate a bassa densità, di tipo 1) a bassa densità, il cui prodotto proteico è il recettore di membrana denominato Lox1, appariva *down*-regolato 3.2 volte in seguito a trattamento con ivabradina. Dalla letteratura è noto che Lox1 non è espresso in cellule endoteliali sane, ma è indotto da elevati livelli di LDL ossidate circolanti, dalle citochine infiammatorie e dalle forze di *low* e *oscillatory* shear stress [60,116], Questo recettore media l'assorbimento di oxLDL, molecole che inducono fenomeni di aggregazione di leucociti nello spazio sub-endoteliale e conseguenti eventi che possono condurre a disfunzioni endoteliali e, quindi, elevati livelli di espressione Olr1 sono fortemente associati ad insorgenza e progressione aterosclerotica [75]. Alla luce di queste osservazioni, abbiamo ritenuto plausibile che un abbassamento dei livelli di questo trascritto genico sia fortemente indicativo di un possibile miglioramento dell'omeostasi endoteliale e di una protezione verso lo sviluppo di lesioni vasali.
- **Serpib5** (*serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade B, member 5*), chiamato anche maspin, veniva *down*-regolato 5.02 volte in seguito al trattamento farmacologico. Maspin è un potente inibitore dell'angiogenesi, regola l'adesione delle cellule endoteliali e la loro migrazione [117]. E' secreto a livello basale nel plasma la cui concentrazione di attesta introno ai 0.95nM, ma la sua elevata espressione in cellule tumorali vascolari innesca i processi apoptotici [118].



Dunque, si può ipotizzare che una riduzione dell'espressione del gene SerpinB5, in seguito al trattamento, possa ridurre l'induzione dell'apoptosi.

- **Gjb3**, indicato anche come connexina 31, veniva *down*-regolato di 4.40 volte dal trattamento farmacologico. La connexina 31 fa parte di una famiglia di proteine che compongono le giunzioni delle cellule endoteliali e delle VSMC; tali giunzioni sono implicate nella trasmissione di segnali per il coordinamento di vasocostrizione e vasodilatazione [119]. Una *up*-regolazione di questa famiglia di geni si riscontra in modelli animali soggetti a ipertensione e sono coinvolti nell'ispessimento patologico delle pareti dell'aorta. Inoltre, esperimenti *ex vivo* su aorta e carotidi di topi WT esposte ad sostenuti livelli di Angiotensina II, presentavano elevati livelli di alcuni componenti della famiglia delle connexine.
- **ADAMTS** (*A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs*) di tipo 7 e 8 vengono *down*-regolati dal trattamento farmacologico rispettivamente di 2.7 e 4.7 volte. Questi geni sono dipendenti dallo *shear stress* e sono indotti dalle citochine infiammatorie. In particolare ADAMTS 7 appare *up*-regolato dal TNF $\alpha$  e dal PDGF, ovvero la sua espressione viene indotta in seguito a segnali infiammatori e proliferativi. Inoltre ADAMTS 7 induce degradazione delle glicoproteine della matrice extracellulare, importanti per l'integrità dei vasi sanguigni [9,19].
- **Ldlr1** (recettore delle lipoproteine a bassa densità 1) risultava *down*-regolato 2.1 volte in seguito al trattamento con ivabradina. Ldlr 1 è espresso dalle SREBP attivate in seguito a deplezione di steroli e dal *low and oscillatory* ESS, che determina prolungata attivazione delle SREBP [57]. Dunque il trattamento con ivabradina potrebbe diminuire il grado di disturbo del flusso nell'arco aortico, con conseguente aumento dei valori di ESS e, dunque, minore espressione del Ldlr a seguito della minore attivazione delle SREBP. Ciò contribuisce ad un minore *uptake* delle LDL circolanti nei topi trattati e, dunque, riduce la tendenza a fenomeni di accumulo intracellulare di lipidi nelle cellule endoteliali [9]

#### 5.2.4 Classificazione dei pathway modulati dall'ivabradina e analisi per arricchimento

Le 930 sequenze geniche da noi trovate differenzialmente espresse in seguito alla somministrazione di ivabradina sono state analizzate utilizzando il *database* DAVID, Bioinformatics Resources 6.7 (National Institute of Allergy and Infectious Diseases NIAID, NIH). In tal modo è stato possibile identificare i *pathway* arricchiti, ovvero quei *pathway* ritenuti influenzati dal farmaco perché costituiti da un numero significativo di geni trovati modulati dal trattamento.

Un pathway è considerato “arricchito” se è più fortemente rappresentato, nella lista dei geni differenzialmente espressi, di quanto sarebbe previsto solo in base al numero totale di geni nel pathway in rapporto al numero di geni del microarray [120]. Tra i *pathway* trovati significativamente arricchiti tramite il database DAVID, quelli corrispondenti a Notch, alle MAP chinasi e agli steroli risultano particolarmente interessanti per le funzioni che sovrintendono nell'endotelio vasale, e sono di seguito trattati. Inoltre, tramite ricerca nel *database* Pubmed (US National Library of Medicine National Institutes of Health, <http://ncbi.nlm.nih.gov>) e nel *database* della Boston University (<http://www.bu.edu/nf-kb/gene-resources/target-genes>), dalla lista delle 930 sequenze geniche differenzialmente espresse dal trattamento abbiamo identificato 20 geni modulati dall'angiotensina II (AngII) e da NF-κB, e abbiamo indagato la regolazione fisiologica di questi geni indotta dai due fattori di rischio vascolare, rispetto alla regolazione data dal trattamento.

#### 5.2.5 Pathway di Notch

L'analisi DAVID ha identificato il pathway di Notch tra quelli significativamente arricchiti (tabella 2 in “Dati supplementari”). Il trattamento con ivabradina induceva *up*-regolazione dei recettori Notch1, *down*-regolazione del suo ligando di membrana Jagged2, *up*-regolazione di Maml3 e RBP-jk due co-attivatori che costituiscono i complessi trascrizionali legati da Notch attivato (*Notch intracellular domain*, o NICD) a livello nucleare. La inattivazione in eterozigosi di *Notch1* e RBP-jk è stata correlata con la formazione di lesioni avanzate della parete aortica e delle valvole aortiche di topo [121]. Inoltre, abbiamo trovato *up*-regolazione dell'espressione del gene per Hes5 pari 3.4 volte nei topi trattati rispetto ai non trattati. Hes5 è un bersaglio trascrizionale di Notch, e rappresenta uno dei maggiori trasduttori dei segnali di attivazione di Notch nello sviluppo vascolare cerebrale [122]. Tramite ricerche in letteratura abbiamo identificato due geni aggiuntivi *target* di Notch, differenzialmente espressi dal trattamento: Nanog, un regolatore della trascrizione genica che appare sotto-regolato dal flusso disturbato (Kuo YC, Chang TH), veniva *up*-

regolato 2.5 volte in seguito a trattamento e Tlx2, un elemento legante il DNA che regola l'espressione genica, *down*-regolato 7 volte. Nel carcinoma mammario Nanog è indotta da Notch1 [123]. Risulta interessante che nelle cellule microgliali Nanog va ad inibire l'espressione di citochine pro-infiammatorie indotte dall'endotossina LPS, tramite blocco del *pathway* di NF-kB [124]. Tlx2 viene, invece, inibito dalla attivazione di Notch1 nei neuroni sensoriali epidermici di amphioxus [125]. Tlx2 è indotta dal *pathway* di BMP2/SMAD [126] che viene attivato dal AngII in HUVEC [127] e che agisce attraverso il *pathway* di NF-kB [117]. E' riportato in letteratura che l'attivazione di Notch1 in macrofagi di topo e umani (rispettivamente le linee HEK293T e RAW264.7) inibisce l'attività di ERK1/2, con conseguente inattivazione della trascrizione delle citochine infiammatorie dipendente da NF-kB [117]. Inoltre, nelle cellule Jurkat (linfociti T immortalizzati) Notch1 lega al p50 nel nucleo inibendo l'attività trascrizionale di NF-kB [128,129]. E' interessante notare che esperimenti condotti in vitro, su cellule staminali di topo (cellule MGZ5 ES), hanno dimostrato che l'espressione di Notch aumenta all'aumentare delle forze di ESS applicate alle cellule (0, 1.5, 5, 10 dyne/cm<sup>2</sup>) e all'aumentare del tempo di applicazione del flusso laminare [130]. Sulla base dei lavori pubblicati e dai nostri dati sperimentali, possiamo ipotizzare che l'attivazione di Notch nell'arco aortico dei topi trattati con ivabradina sia dovuta ad una diminuzione del flusso disturbato, conseguente alla riduzione della HR. L'attivazione di Notch nell'arco aortico potrebbe determinare una inattivazione delle chinasi ERK1/2, contribuendo all'inibizione della trascrizione dei geni pro-infiammatori e pro-apoptotici sostenuta da NF-kB.

### 5.2.6 Pathway delle MAP chinasi

L'analisi DAVID identifica il pathways delle MAPK come significativamente modulato dal trattamento con ivabradina (tabella 1 in "Dati supplementari"). La modulazione della via delle MAP chinasi in seguito a trattamento era riscontrabile dalla *down*-regolazione di Prkca, Grb2, M-Ras, A-Raf, che poteva riflettersi in una possibile inibizione dei segnali fosforilativi che portano all'attivazione di ERK1/2. Ciò potrebbe configurare un profilo genico atero-protettivo dato che studi condotti su cellule endoteliali umane da cordone ombelicale (HUVEC), indicano che la fosforilazione di ERK1/2 porta ad attivazione di Nf-kB e instaurazione di uno stato infiammatorio per l'endotelio. Inoltre, in condizioni di esposizione delle cellule HUVEC a *low shear stress*, ovvero a valori pari a 12 dyn/cm<sup>2</sup>, è stata riportata l'attivazione di ERK1/2 [65].

### 5.2.7 Pathway metabolico degli steroli

L'analisi DAVID identifica l'arricchimento dei *pathway* metabolici degli steroli, che viene significativamente modulato dal trattamento. Delle 930 sequenze geniche modulate dall'ivabradina, 11 geni sono coinvolti in questo pathway (Tabella 3 in "Dati supplementari"), tra i quali il recettore delle LDL (gene *Ldlr*) e la colesterolo 25-idrossilasi (gene *Ch25h*), rispettivamente *down*-regolati 2.1 e 3.3 volte nei topi trattati rispetto ai non trattati. Questi geni vengono trascritti dal fattore di trascrizione SREBP di tipo 1, che regola i geni coinvolti nel metabolismo dei lipidi [9,56]. La famiglia dei fattori trascrizionali SREBP (formata da SREBP1a, SREBP1c e SREBP2) viene attivata dallo stato di deplezione cellulare di steroli e dalle forze di *shear stress*. E' riportato in letteratura che in cellule endoteliali il flusso laminare induce solo un'attivazione transitoria di SREBP1, mentre il flusso disturbato (condizione emodinamica a livello aortico) l'ivabradina potrebbe migliorare) ne causa un'attivazione prolungata [56]. Inoltre il gene *Ch25h*, che risulta essere *down*-regolato dal trattamento, è implicato nei processi infiammatori e nella regolazione dell'omeostasi del colesterolo [131].

### 5.2.8 L'ivabradina antagonizza la modulazione genica dell'Angiotensina II

L'angiotensina II (AngII) è un ormone derivato da una serie di tagli proteolitici di peptidi pro-ormoni precursori, che agisce per via endocrina, autocrina e paracrina a livello vascolare. Tra le principali funzioni di AngII vi è l'aumento della pressione del sangue, determinata da stimolazione della contrazione delle cellule muscolari lisce delle arterie, e aumento della frequenza dei battiti e della forza di contrazione cardiaca. Insieme a questi effetti, una stimolazione protratta nel tempo di AngII causa disfunzione endoteliale attraverso: induzione di ROS, attivazione di NF- $\kappa$ B con conseguente espressione di citochine pro-infiammatorie quali TNF $\alpha$  e IL-1,6,8, aumentata espressione di molecole di adesione endoteliale, induzione di maggiore espressione del fattore pro-infiammatorio Cyclooxygenase2 (COX2) [132].

Inoltre, studi condotti in vitro ed in vivo hanno dimostrato che i livelli di angiotensina II sono influenzati dallo *shear stress*. L'esposizione, per tempi diversi, dell'endotelio di arteria polmonare e di aorta ad elevate forze di ESS (flusso laminare), determina una riduzione tempo dipendente dell'mRNA dell'enzima convertitore dell'angiotensina (ACE) e della sua attività proteolitica, con conseguente riduzione della quantità di ormone attivo [34,133]. Risulta interessante notare che tra le 930 sequenze geniche modulate da ivabradina, farmaco che ipotizziamo aumenti i valori di ESS nelle regioni arteriose a geometria complessa, abbiamo individuato un totale di 20 geni che vengono modulati dal

trattamento in direzione opposta (*down*-regolati) rispetto all'attivazione determinata da AngII e Nf-kB (tabella 4 e tabella 5 in "Dati supplementari"). L'individuazione della funzione e regolazione di questi geni regolati da AngII e NF-kB, è stata possibile tramite *database* Pubmed (US National Library of Medicine National Institutes of Health, <http://ncbi.nlm.nih.gov>).

Le osservazioni da noi raccolte indicano che il trattamento con ivabradina *down*-regola 7 geni pro-infiammatori e pro-apoptotici indotti da AngII, tra i quali Tlx2, Olr1, Ldlr, e *up*-regola i geni Rgs4 e Pde3a inibitori di AngII (tabella 4 e schema 1 in "Dati supplementari").

### **5.2.9 L'ivabradina antagonizza l'espressione genica sostenuta da NF-κB**

NFκB (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) è un complesso trascrizionale multiproteico che, in risposta a diverse condizioni patogeniche, regola una serie di geni target. Viene, infatti, attivato da svariati mediatori dell'infiammazione, tra cui: l'interleuchina-1 ed il fattore di necrosi tumorale alfa (TNFα), le specie reattive all'ossigeno (ROS) e le LDL ossidate, le endotossine batteriche) Nelle cellule endoteliali NF-κB risulta maggiormente disponibile (prono) nella trascrizione dei suoi geni target in corrispondenza delle regioni arteriose a flusso disturbato (bassa intensità di ESS), ovvero le nelle zone a geometria complessa che presentano alta probabilità di generare placche aterosclerotiche (regioni ad elevata probabilità aterosclerotica, HP) ([134]). Inoltre l'attivazione di Nf-kB richiede attività fosforilativa da parte di ERK1/2 (Alonso et al. 166-76). Tale attività fosforilativa è ipotizzabile risentisse della *down*-regolazione di alcune chinasi poste a monte di ERK1/2, da noi riscontrate *down*-regolate in seguito al trattamento. Inoltre una maggiore attivazione di Notch1 dovuta alla somministrazione di ivabradina, potrebbe aver influenzato la via di fosforilazione che culmina su ERK1/2 [117]

A sostegno di questa possibile minore attivazione di NF-κB dipendente dal trattamento, tra le 930 sequenze trovate modulate dalla somministrazione di ivabradina abbiamo individuato *down*-regolazione di 11 geni, presenti nel *database* della *Boston University* (<http://www.bu.edu/nf-kb/gene-resources/target-genes>), *up*-regolati dall'attività trascrizionale di NF-κB (tabella 5 in "Dati supplementari")

## 5.3 Ivabradina e progressione aterosclerotica: studi di settaggio

### 5.3.1 Determinazione dell'esordio della disfunzione endoteliale nell'arco aortico di topi ApoE<sup>-/-</sup>

Per effettuare lo studio sui possibili effetti protettivi dell'ivabradina nella progressione dell'aterosclerosi nell'arco aortico di topi ApoE<sup>-/-</sup>, abbiamo prima determinato l'età in cui le lesioni della parete vasale erano identificabili tramite analisi *en face* dell'arco aortico (come descritto in "materiali e metodi"). Tali lesioni potevano presentarsi come aree endoteliali apoptotiche di diversa estensione (disfunzione endoteliale), tipiche degli stadi precoci dell'aterosclerosi, oppure come estese lesioni aterosclerotiche di grado avanzato, che interessavano gli strati profondi della parete arteriosa.

I lavori pubblicati non ci hanno suggerito una precisa tempistica riguardante l'evoluzione dell'aterosclerosi nell'arco aortico di topi ApoE<sup>-/-</sup> nelle nostre condizioni sperimentali. I dati presenti in letteratura, infatti, si concentravano principalmente sulle valvole aortiche e, nella quasi totalità degli studi, il cibo somministrato era arricchito in grassi (*western-type diet*). Dai dati raccolti abbiamo inizialmente ipotizzato un esordio delle lesioni nell'arco aortico entro la 16<sup>°</sup> settimana di vita, in presenza di dieta standard [135]. Per confermare la nostra ipotesi abbiamo condotto esperimenti preliminari utilizzando la tecnica *en face*, impiegata nei principali studi sull'aterosclerosi per indagare la superficie luminale dell'aorta. Inoltre, per verificare l'attendibilità dei nostri risultati sperimentali, abbiamo condotto una misurazione del danno vasale nella condizione di dieta ricca in grassi, in modo tale da poter confrontare i nostri risultati con una tipica condizione presente in letteratura.

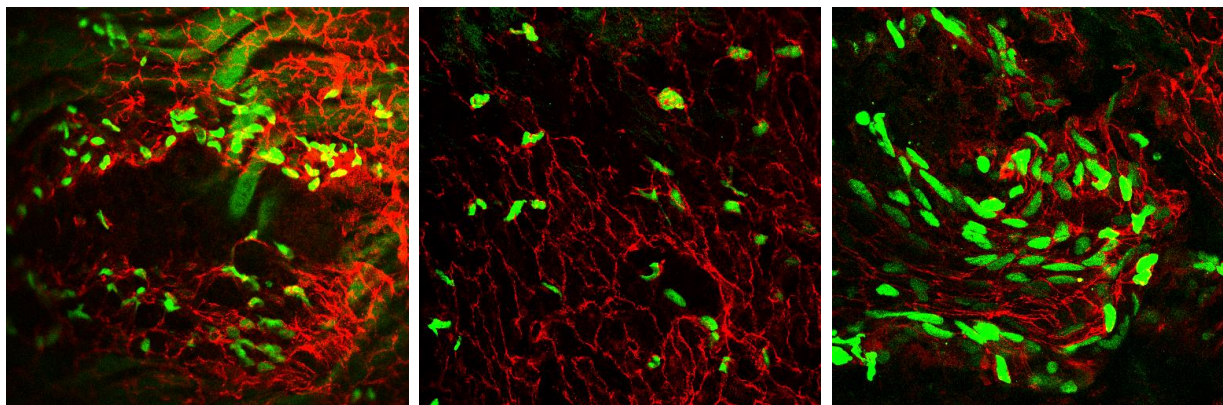
Come si può osservare in figura 9, gli archi aortici dei topi alimentati con dieta grassa presentavano molteplici aree con cellule endoteliali apoptotiche (*TUNEL-positive*), accompagnate da disorganizzazione e disgregazione del *marker* endoteliale *VE-cadherin*. Ciò indicava comparsa di lesioni aterosclerotiche che interessavano gli strati più profondi delle parete dell'arco aortico, che rimanevano circoscritte alle aree che risultavano positive al *TUNEL*. Nelle aree non interessate dalla positività al *TUNEL*, la superficie dell'arco aortico appariva scarsamente interessata da lesioni endoteliali. Queste osservazioni erano equiparabili ai dati riportati in letteratura (Shaw-Yung Shai, Sergiy Sukhanov, Patrizia Nigro, Kimio Satoh), e indicavano che la nostra tecnica di identificazione delle lesioni vasali era affidabile.

Tuttavia, l'osservazione al confocale degli archi aortici del gruppo alimentato con dieta normale indicava lieve o assente disorganizzazione o della *VE-cadherin*, dunque, non vi era marcata disfunzione endoteliale e tantomeno lesioni di grado avanzato della parete

vasale. Questo era confermato dall'assenza di aree endoteliali *TUNEL-positive*, quindi non erano presenti cellule apoptotiche. Perciò appariva chiaro che negli ApoE<sup>-/-</sup> alimentati con dieta normale lo sviluppo delle lesioni vasali era più lento di quanto inizialmente ipotizzato.

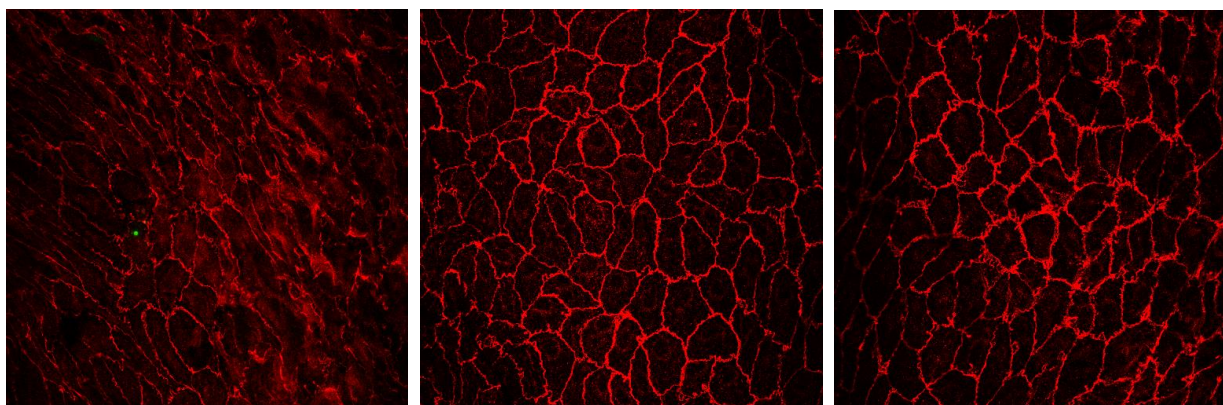
ApoE<sup>-/-</sup> 16 settimane, "high fat diet" (n=7)

---



ApoE<sup>-/-</sup> 16 settimane, "normal diet" (n=7)

---



**Figura 9:** immagini della superficie luminale di arco aortico di topi ApoE<sup>-/-</sup> (magn. 40 X). In rosso (543 nm) VE-Cadherin (marker di membrana delle cellule endoteliali); in verde (488 nm) colorazione per le cellule apoptotiche TUNEL. Acquisizioni effettuate con microscopio confocale Zeiss (LSM510).

La stima delle aree positive al TUNEL, effettuata tramite scansione con microscopio confocale degli archi aortici prelevati dagli animali alimentati con dieta normale e dieta grassa, è riportata in grafico "Dati supplementari".

Alla luce di questi risultati abbiamo indagato, implementando un nuovo gruppo di animali, l'età al di sopra delle 16 settimane in cui le lesioni dell'arco aortico divenivano identificabili in presenza di dieta non arricchita in grassi. Dalle valutazioni riportate nel lavoro di Watt V. et al, in cui veniva identificato tramite colorazione *Oil red* il danno aterosclerotico nelle

valvole aortiche di topi ApoE<sup>-/-</sup> alimentati con dieta normale [136], abbiamo stimato che la 24° settimana di età fosse la più adeguata per rilevare al presenza di danno vasale.

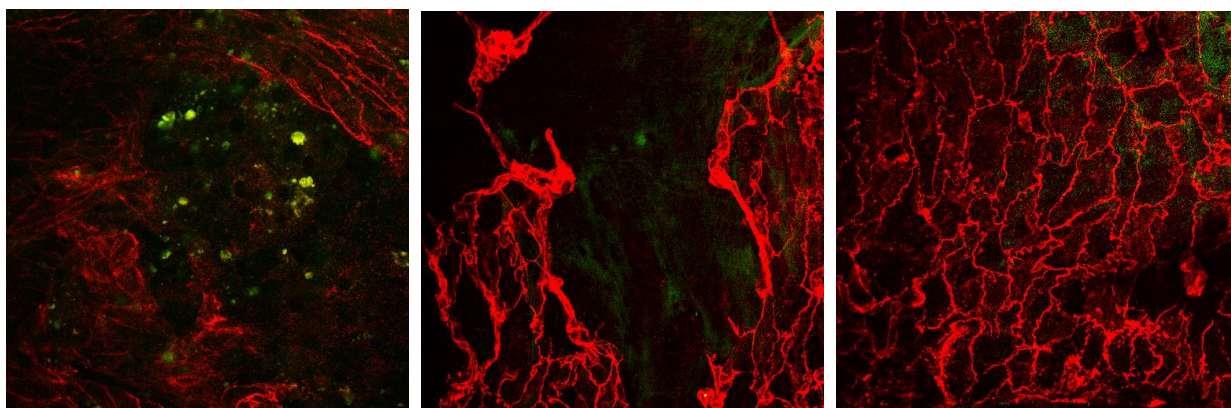
Come riportato in figura 10, dalle acquisizioni della superficie endoteliale degli archi aortici di topi aventi 24 settimane di età sono state riscontrate estese aree interessate da elevata disorganizzazione, o totale disgregazione, del *marker* endoteliale *VE-cadherin*, indice di lesioni aterosclerotiche di grado avanzato. Queste lesioni risultavano confinanti ad aree di disfunzione endoteliale, in cui era riscontrabile un *monolayer* formato da cellule molto piccole di forma poligonale o tondeggianti interessate da lieve disorganizzazione della *VE-cadherin*, indice di una elevata attività mitotica tipicamente associata a sofferenza endoteliale. Tuttavia uno degli aspetti maggiormente inattesi, fu la quasi totale assenza di cellule positive al TUNEL, sia nelle aree circostanti le zone ad elevata disorganizzazione di *VE-cadherin* che in aree endoteliali non confinanti con le lesioni. Gli unici segnali *TUNEL-positive* si riscontravano all'interno delle zone caratterizzate da estesa degradazione dell'endoteliale. Questo faceva supporre a cellule muscolari vasali o leucocitarie, in stadio apoptotico negli strati profondi della parete arteriosa. Tuttavia il loro numero rimaneva molto esiguo, se paragonato alla quantità di cellule positive al TUNEL riscontrate nei topi sacrificati a 16 settimane ed alimentati con dieta grassa.

Date queste nuove osservazioni, abbiamo ipotizzato che la presenza di aree endoteliali *TUNEL-positive* nel gruppo di animali sacrificati a 16 settimane di vita e alimentati con *western-type diet*, erano conseguenza dell'attivazione di particolari *pathway* cellulari indotti selettivamente dall'elevata assunzione di grassi con la dieta. Abbiamo, quindi, appurato che a 24 settimane era osservabile sia disfunzione endoteliale (danno vasale precoce) che lesioni più complesse (danno vasale avanzato). Era, quindi, possibile eseguire una stima della quantità e del gravità del danno aterosclerotico presente in base al grado di disorganizzazione del *marker VE-cadherin*. L'assenza di aree endoteliali positive al TUNEL divenne, dunque, trascurabile ai fini della valutazione del danno vasale; tuttavia la colorazione dei nuclei apoptotici intraplaacca venne mantenuta, per la maggiore facilità di identificazione delle zone di lesione avanzata della parete arteriosa in presenza di altri tipi cellulari *TUNEL-positive*. L'utilizzo di un *marker* endoteliale per il riconoscimento del grado di lesione aterosclerotica era in accordo con quanto riportato da altri lavori, in cui utilizzavano *marker* selettivi dell'endotelio per l'osservazione delle lesioni vasali [137]. Tuttavia per confermare la presenza di placche aterosclerotiche nelle aree caratterizzate da elevata disorganizzazione e assenza di *VE-cadherin*, abbiamo eseguito uno *staining* con Nile Red (figura 10). Questo colorante è affine ai grassi, quindi in grado di marcare il *core* lipidico delle lesioni ateromatose eventualmente presenti. Come risulta dall'analisi *en face* condotta su 3 archi aortici di topi ApoE<sup>-/-</sup> alla 24° settimana di vita, il Nile Red marcava aree ben definite ed estese, compatibili con lesioni ateromatose (Figura

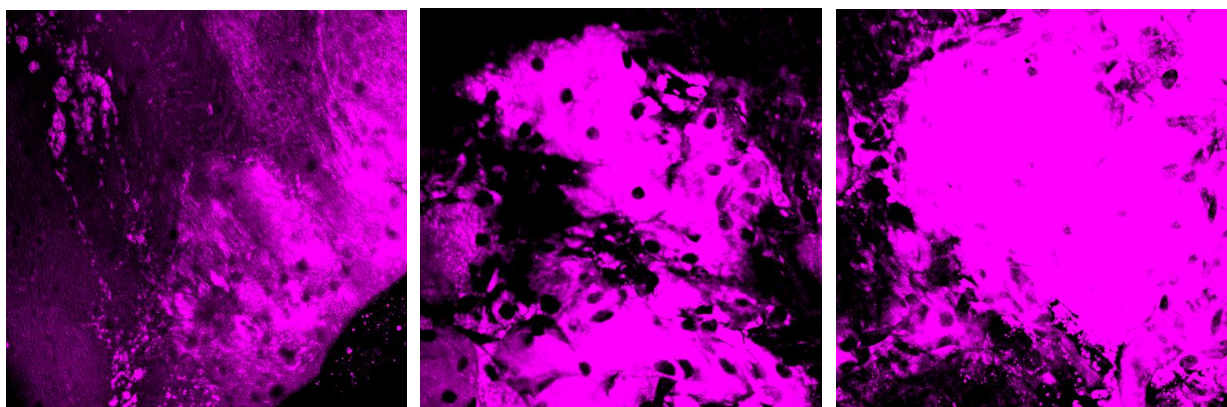


10). La colorazione Nile red è incompatibile con la marcatura anticorpale per *VE-cadherin*, quindi non è stato possibile effettuare un *co-staining*, come già descritto in “materiali e metodi”.

ApoE  $-/-$  24 settimane, “*normal diet*” (n=7)



ApoE  $-/-$  24 settimane, “*normal diet*” (n=3)



**Figura 10:** immagini della superficie luminale dell’arco aortico di topi ApoE $-/-$  (magn. 40 X). In rosso (543 nm) VE-Cadherin (marker endoteliale); in verde (488 nm) colorante TUNEL per cellule apoptotiche; in *deep red* (552 nm) colorante per le strutture lipidiche Nile Red. Acquisizioni effettuate con microscopio confocale Zeiss (LSM 510)

Tramite colorazione Nile Red è stato possibile confermate le osservazioni da noi condotte allo stereomicroscopio durante l’espanto dell’arco aortico (vedi “materiali e metodi”). Ovvero i topi sacrificati a 24 settimane di vita presentavano frequentemente accumulo di materiale di colore biancastro che costituivano inspessimenti nella parete vasale dell’arco aortico, compatibili con placche ateromatose che spiccavano, rispetto alla restante struttura del vaso, quando illuminate da forte luce nel visibile. Queste strutture non erano osservabili nei topi alimentati con dieta grassa o normale sacrificati a 16 settimane di età.

## 5.4 Ivabradina e progressione aterosclerotica: valutazione degli effetti del trattamento

### 5.4.1 Riduzione dipendente dal trattamento nella formazione e progressione delle lesioni aterosclerotiche dell'arco aortico

Per lo studio degli effetti del trattamento con ivabradina nella progressione aterosclerotica sono stati impiegati 16 topi ApoE<sup>-/-</sup> alla 24<sup>°</sup> settimana di vita, così divisi: 10 animali trattati con ivabradina e 6 di controllo.

Gli archi aortici sono stati espianati da entrambi i gruppi ed è stato condotto lo *staining* per *VE-Cadherin* (come descritto in "materiali e metodi"). In seguito, per ogni campione è stata condotta l'analisi *en face* della superficie luminale del vaso tramite microscopia confocale e sono stati acquisiti, in modalità *random*, 15 campi ad ingrandimento 40X. Come si può osservare dalle immagini riportate in figura 11, gli animali trattati con ivabradina presentavano una incidenza fortemente ridotta nella formazione di lesioni di grado avanzato a livello dell'arco artico, rispetto ai non trattati.

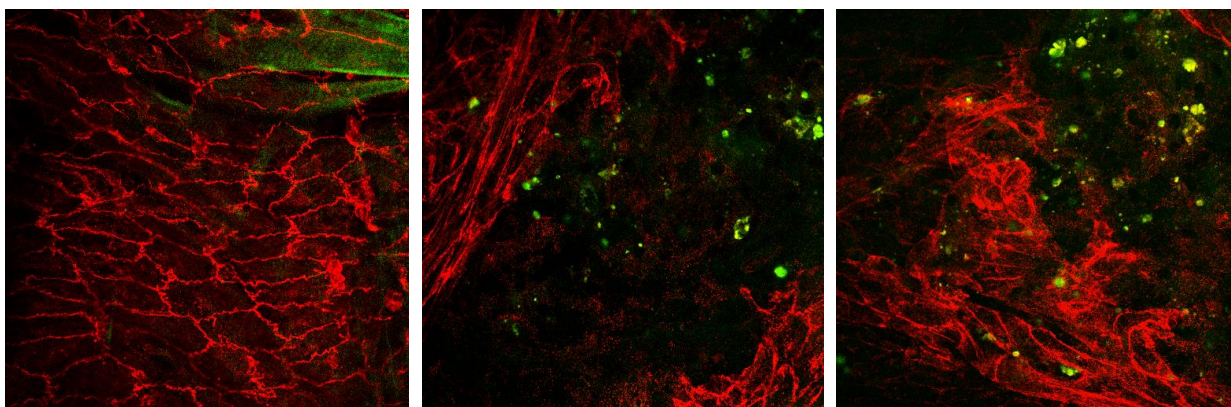
A fronte di aree endoteliali con cellule di forma piccola e tondeggianti e lieve disorganizzazione di *VE-Cadherin* (disfunzione endoteliale) presente con elevata frequenza in entrambi i gruppi di animali, trattati e non trattati, si riscontrava una marcata differenza nell'estensione delle aree di forte disorganizzazione e disgregazione endoteliale in base al trattamento.

Questi dati erano in accordo con le preliminari osservazioni da noi effettuate tramite stereomicroscopio nella fase di espianato dell'aorta. In queste fasi operative abbiamo identificato, nell'arco aortico degli animali non trattati, strutture dalla forma e consistenza tipica delle placche ateromatose, a fronte di una totale assenza di lesioni o irregolarità nella parete aortica dei topi trattati con ivabradina (dati non presentati).

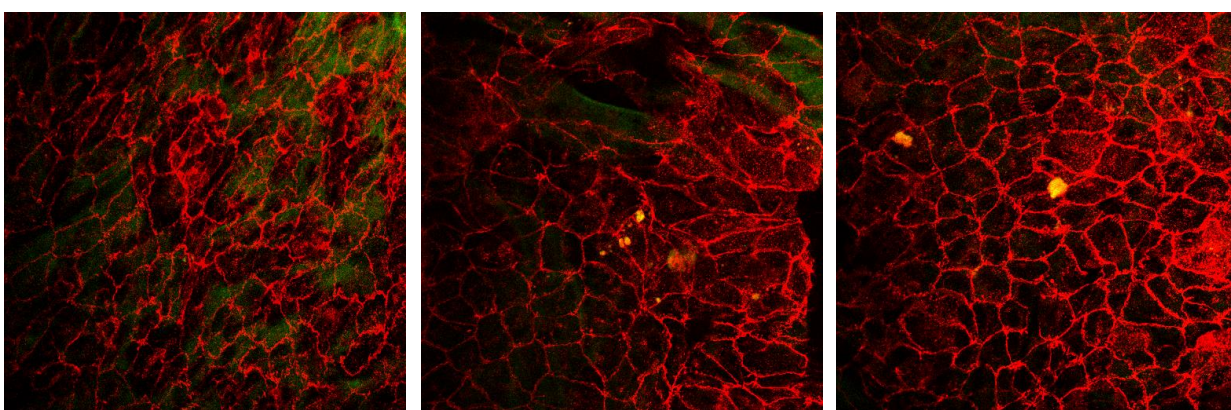
In questo esperimento sono stati usati solo 6 topi di controllo a fronte di 10 animali trattati con il farmaco. Questo perché l'arco aortico corrispondente agli animali aventi 24 settimane di vita (alimentati con dieta normale) sono stati osservati durante il preliminare esperimento di settaggio e le immagini erano pronte per un eventuale confronto dell'arco del gruppo di trattato (n=10)..

I risultati da noi ottenuti, e di seguito riportati, rafforzano ulteriormente l'ipotesi secondo cui l'ivabradina, attraverso una sostenuta riduzione della HR, è in grado di ridurre il disturbo emodinamico nell'arco aortico (aumento delle forze di ESS), conferendo in tal modo protezione verso la generazione e progressione delle lesioni aterosclerotiche, tipiche delle regioni arteriose a geometria complessa.

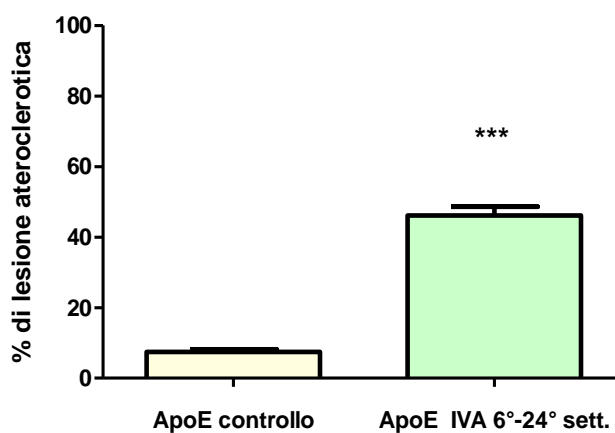
ApoE -/- 24 settimane, controllo (n=6)



ApoE -/- 24 settimane, IVA 30 mg/Kg/die (n=10)



**Figura 11:** Immagini della superficie luminale dell'arco aortico di topi ApoE<sup>-/-</sup> (magn. 40 X). In rosso (543 nm) VE-Cadherin (marker endoteliale); in verde (488 nm) colorazione TUNEL per le cellule apoptotiche. Acquisizioni effettuate con microscopio confocale Zeiss (LSM510).



**Grafico 6:** estensione % delle lesioni che interessavano gli strati profondi (lesione ateroclerotica di grado avanzato) della parete dell'arco aortico nei topi trattati e non trattati, calcolata sull'area totale indagata negli archi aortici appartenenti al gruppo trattato (n = 10) e non trattato (n = 6 + 4 ApoE<sup>-/-</sup> 24 settimane, da esperimento di settaggio).

## 6. CONCLUSIONI

I nostri studi dimostrano che nei topi ApoE<sup>-/-</sup> il trattamento nelle prime settimane di vita con l'ivabradina induce una espressione genica protettiva a livello dell'arco aortico, regione soggetta a formazione di lesioni aterosclerotiche.

In particolare l'ivabradina induce *down*-regolazione di un possibile *marker* di danno vascolare (NppC) e di geni legati all'infiammazione e all'apoptosi (tra cui Olr1, Ldlr1, ADAMTS, Serpinb5); inoltre abbiamo trovato *up*-regolazione di geni ritenuti protettivi verso l'insorgenza di processi aterosclerotici (tra cui Nanog, Hes5, Rgs4, Pde3a). Molti di questi geni sono modulati dalle forze di *endothelial shear stress*.

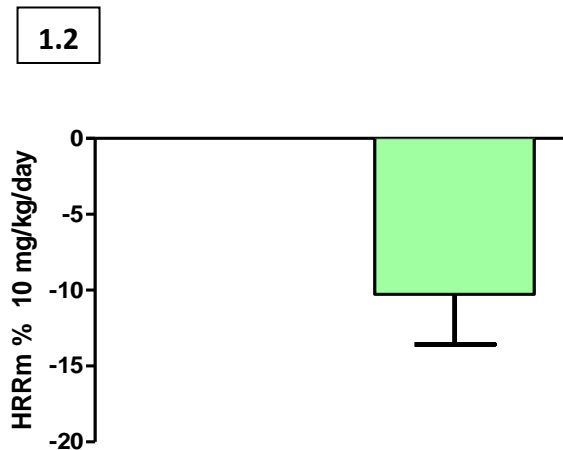
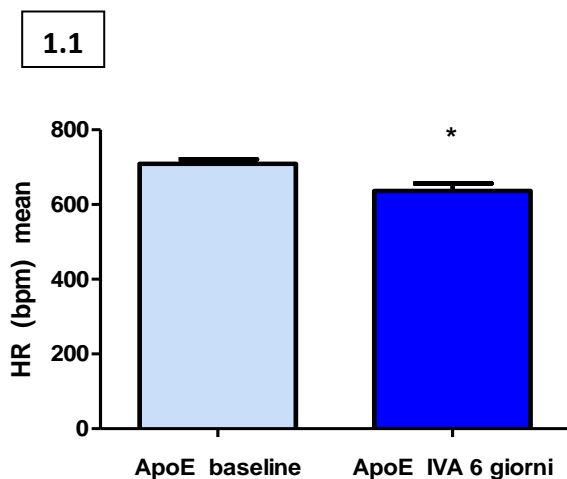
Inoltre tra i pathway influenzati dal trattamento con ivabradina, abbiamo individuato *up*-regolazione del *pathway* di Notch, che conferisce protezione verso attivazione e apoptosi delle cellule endoteliali e viene *down*-regolato dal flusso disturbato. Al contrario, i *pathway* delle MAP chinasi e del metabolismo degli steroli, coinvolti nei processi infiammatori e di perdita dell'omeostasi dell'endotelio, appaiono *up*-regolati dal flusso disturbato e presentano diversi geni *down*-regolati dal trattamento.

Tra le sequenze geniche modulate dal trattamento abbiamo individuato diversi geni che vengono regolati dall'angiotensina e da NF-κB in senso opposto rispetto all'ivabradina; si può, dunque, ipotizzare un antagonismo tra l'asse pro-infiammatorio determinato da AngII e NF-κB e gli effetti dell'ivabradina.

Abbiamo, inoltre, indagato se il profilo genico indotto dall'ivabradina nelle prime settimane di vita, comporta prevenzione o, comunque, forte riduzione delle lesioni vasali in età avanzata. E' risultata una forte incidenza di lesioni aterosclerotiche negli animali non trattati rispetto a quelli trattati con il farmaco, nei quali era riscontrabile un endotelio integro anche se in stato di sofferenza, e solo alcune lesioni endoteliali di grado avanzato di ridottissima estensione.

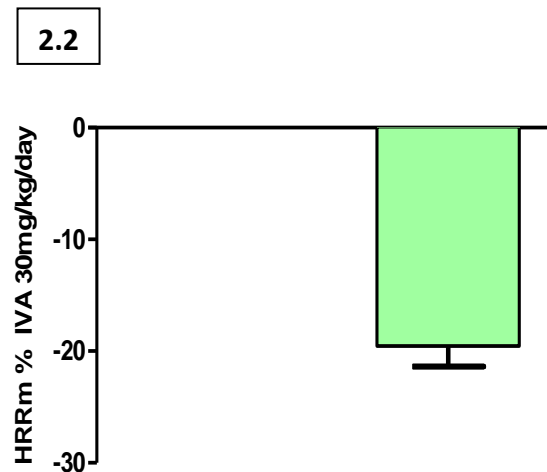
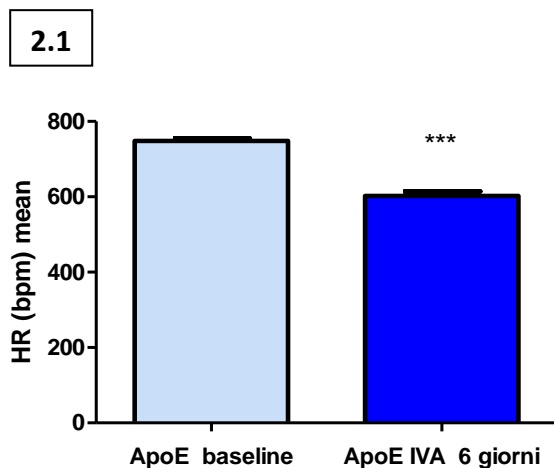
Possiamo, dunque, concludere che a livello dell'arco aortico, l'ivabradina esplica un effetto protettivo sin dalle prime settimane di vita, effetto che viene mantenuto nel corso del tempo con la continuazione del trattamento. Le nostre osservazioni, inoltre, avvalorano il modello secondo cui l'effetto protettivo dell'ivabradina non si esplica tramite interazioni molecolari dirette con le cellule della parete arteriosa, ma tramite effetto bradicardizzante e conseguente riduzione del il disturbo emodinamico a livello delle regioni arteriose aventi geometria complessa.

## 7. DATI SUPPLEMENTARI



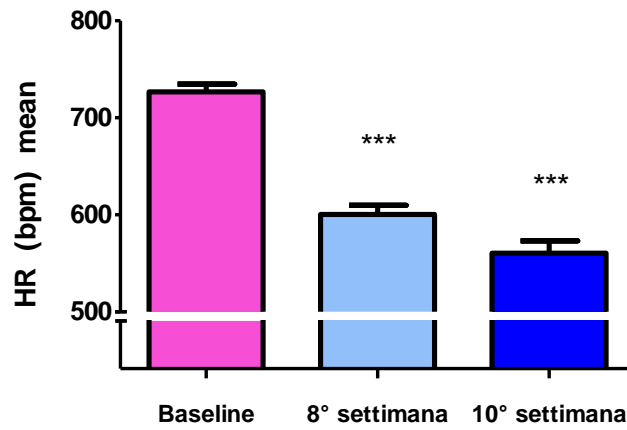
**Grafico 1.1:** misurazione ecocardiografica della HR in topi ApoE<sup>-/-</sup> sia prima (baseline) che in seguito a trattamento con **10 mg/kg/die** per 6 giorni di vita. ApoE baseline = 709 ± 12 bpm; ApoE IVA 6 giorni = 636 ± 20 bpm. La riduzione della HR è risultata significativa (P-value < 0.01).

**Grafico 1.2:** la HRRm% in seguito a 6 giorni di trattamento con 10mg/kg/die di ivabradina è pari a: -10% ± 3

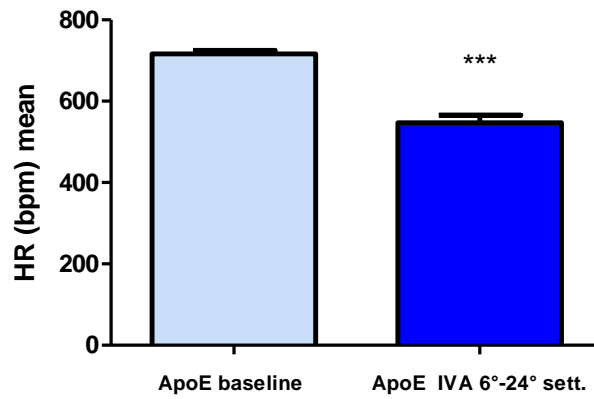


**Grafico 2.1:** misurazione ecocardiografica della HR in topi ApoE<sup>-/-</sup> sia prima (baseline) che in seguito a trattamento con **30 mg/kg/die** per 6 giorni di vita. ApoE baseline = 748 ± 7 bpm; ApoE IVA 6 giorni = 602 ± 12 bpm. La riduzione della HR è risultata significativa (P-value < 0.0001).

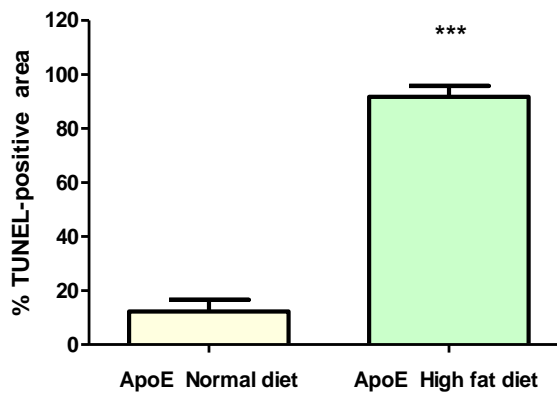
**Grafico 2.2:** la HRRm% in seguito a 6 giorni di trattamento con 30mg/kg/die di ivabradina è pari a: -19,5% ± 2 .



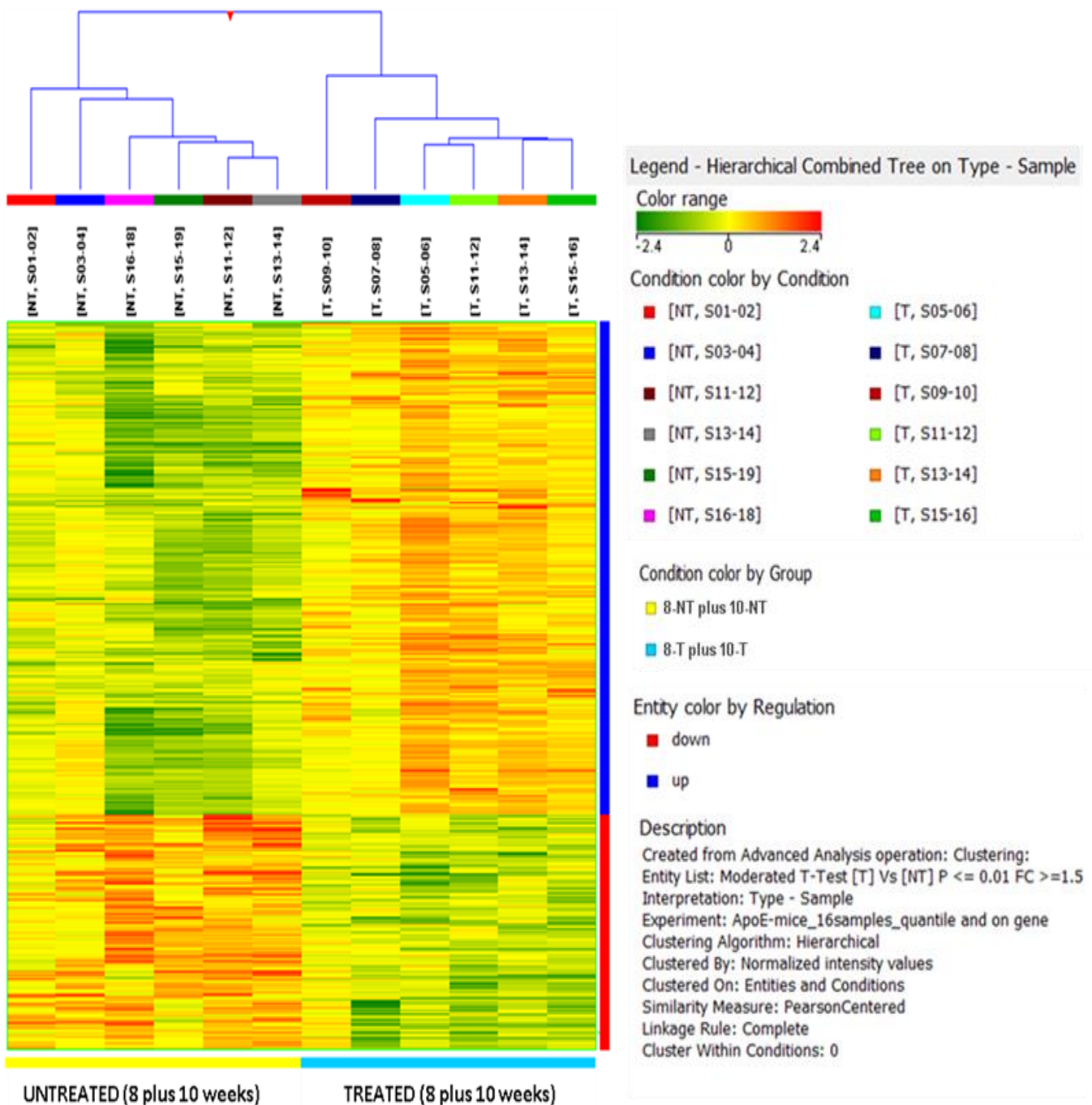
**Grafico 3:** misurazione ecocardiografica della HR in topi ApoE<sup>-/-</sup> sia prima (baseline) che in seguito a trattamento con 20mg/kg/die fino alla 8° (n=6) e alla 10° (n=6) settimana di vita. Baseline = 727 ± 8 bpm; ApoE 8° settimana= 600 ± 9 bpm; ApoE 10° settimana = 560 ± 13 bpm. La riduzione della HR è risultata significativa (P-value < 0.0001)



**Grafico 4:** misurazione ecocardiografica della HR in topi ApoE<sup>-/-</sup> sia prima (baseline) che in seguito a trattamento con 20mg/kg/die fino alla 10° (n=6) settimana di vita. ApoE baseline (n=10) = 716 ± 9 bpm; ApoE IVA (n=10) = 547 ± 19 bpm. La riduzione della HR è risultata significativa (P-value < 0.0002)



**Grafico 5:** stima della disfunzione endoteliale espressa come media % delle aree positive al TUNEL dopo l'analisi di 15 acquisizioni (40X) dell'arco aortico del gruppo di topi alimentati con dieta normale o ricca in grassi.



**Figura 9:** La *heatmap* di *clustering* gerarchico di espressione genica che riporta le 930 sequenze significativamente modulate dall'ivabradina, per ogni singolo *pool* di due animali analizzati con il microarray (3 *pool* di animali NT di 8 settimane, 3 *pool* di animali T di 8 settimane, 3 *pool* di animali NT di 10 settimane, 3 *pool* di animali T di 10 settimane). Ad ogni *pool* è stato attribuito un *color code*. Come indicato nella parte laterale della *heatmap*, la disposizione dei geni *up*-regolati (blu) e *down*-regolati (rosso) indica che vi è un comportamento opposto nella modulazione delle 930 sequenze geniche in base al trattamento con ivabradina. Questa opposta modulazione delle 930 sequenze è identificabile confrontando il gruppo 8 + 10 T v.s 8 + 10 NT, ovvero raggruppando gli animali unicamente sulla base del trattamento (come riportato alla base della *heatmap*)

Pathway Name	Gene Symbol	Gene Name	p-value	FC (Abs)	up/down
MAPK signaling pathway	Rasgrf2	RAS protein-specific guanine nucleotide-releasing factor 2	9,54E-04	1,52216	up
	Map3k14	RIKEN cDNA 1700028N14 gene; mitogen-activated protein kinase kinase kinase 14	0,001384	1,69729	up
	Cacna1i	calcium channel, voltage-dependent, alpha 1I subunit	0,0084313	1,55184	up
	Cacng7	calcium channel, voltage-dependent, gamma subunit 7	0,0050768	2,61994	up
	Dusp14	dual specificity phosphatase 14	0,0089758	1,64527	down
	Il1r2	interleukin 1 receptor, type II	0,0070304	2,49972	down
	Mapk8ip2	mitogen-activated protein kinase 8 interacting protein 2	0,0034333	2,46491	up
	Map3k8	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 8	0,0030304	1,52362	Down
	Mras	muscle and microspikes RAS	0,0064321	2,11209	down
	Rras2	related RAS viral (r-ras) oncogene homolog 2	0,0024018	1,59421	down

**Tabella 1:** MAPK signaling pathway

Pathway Name	Gene Symbol	Gene Name	p-value	FC (Abs)	up/down
Notch signaling pathway	Notch1	Notch gene homolog 1 (Drosophila)	0,0037354	1,59442	up
	Hes5	hairy and enhancer of split 5 (Drosophila)	0,0077782	3,34006	up
	Jag2	jagged 2	0,0028323	2,21664	down
	Maml3	mastermind like 3 (Drosophila)	0,0091298	1,52147	up
	Rbpj	recombination signal binding protein for immunoglobulin kappa J region	0,0045399	1,5319	up

**Tabella 2:** Notch signaling pathway



Pathway Name	Gene Symbol	Gene Name	p-value	FC (Abs)	up/down
Cholesterol metabolic process	Hnf1a	HNF1 homeobox A	0,0092684	2,07714	up
	Nsdhl	NAD(P) dependent steroid dehydrogenase-like	0,0053965	1,94195	down
	Ch25h	cholesterol 25-hydroxylase	0,0021805	1,81742	down
	Cyp46a1	cytochrome P450, family 46, subfamily a, polypeptide 1	0,0094426	1,87193	up
	Cyp51	cytochrome P450, family 51	0,0034192	2,26716	down
	Lepr	leptin receptor	0,0083405	1,95811	up
	Ldlr	low density lipoprotein receptor	0,0052362	2,13844	down
	Hmgcs1	similar to Hmgcs1 protein; 3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 1	4,45E-04	3,28802	down
	Sc4mol	sterol-C4-methyl oxidase-like	0,0072525	1,6151	down
	Esr1	estrogen receptor 1 (alpha)	0,0047946	1,97645	up
	Nr1h4	nuclear receptor subfamily 1, group H, member 4	0,001839	2,24837	down

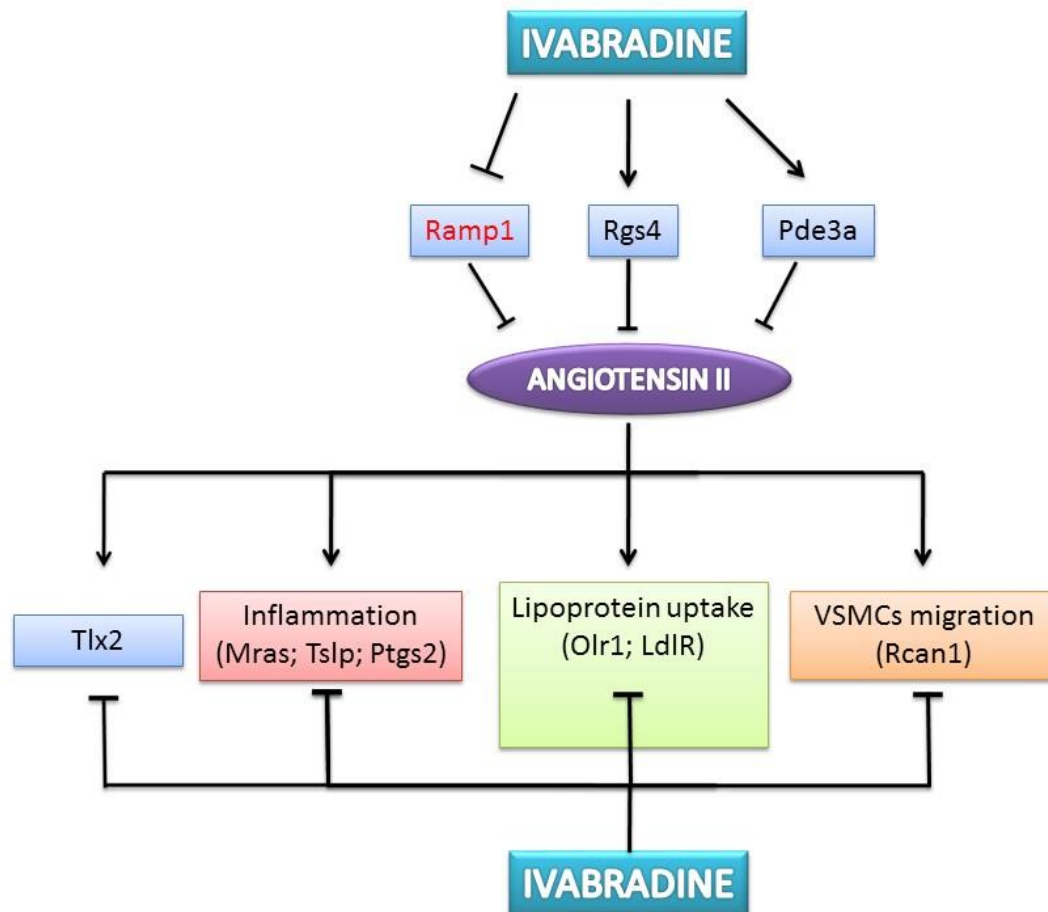
**Tabella 3:** *Cholesterol metabolic pathway*

Gene name (ivabradine modulated)	FC (abs)	P value	Regulation	Function	Angiotensin II regulation
low density lipoprotein receptor (Ldlr)	2,14	0,00524	down	Binds LDL and transports it into cells by endocytosis	Up
muscle and microspikes RAS (Mras)	2,11	0,00643	down	Acts downstream of TNF alpha in causing apoptosis	Up
oxidized low density lipoprotein (lectin-like) receptor 1 (Olr1)	3,20	0,00359	down	Endothelial receptor that mediates uptake of oxLDL and promotes plaque formation	Up
prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (Ptgs2)	1,91	0,00601	down	Key enzyme in prostaglandin biosynthesis. Promotes inflammation and atherosclerosis.	Up
regulator of calcineurin 1 (Rcan1)	1,53	0,00965	down	Regulator of calcineurin which mediates pathological vascular wall remodelling and VSMCs migration	Up
thymic stromal lymphopoietin (Tslp)	2,00	0,00264	down	Cytokine upregulated in atherosclerosis. Angiotensin II Induces TSLP via an AT1 Receptor/NF-KappaB pathway	Up
T-cell leukemia, homeobox 2 (Tlx2)	7,09	0,00008	down	Induced by BMP2 which is activated by AngII	Up
phosphodiesterase 3A, cGMP inhibited (Pde3a)	1,60	0,00706	up	PDE3A has cardioprotective effects against AngII-induced cardiac injury	Negative regulator of AngII
receptor (calcitonin) activity modifying protein 1 (Ramp1)	1,53	0,00409	up	Ramp1 is a component of CGRP receptor which is important in resisting the AngII-induced hypertension	Negative regulator of AngII
regulator of G-protein signaling 4 (Rgs4)	1,83	0,00896	up	RGS4 has been reported to be negative regulator of AngII signaling through the AT1	Negative regulator of AngII

**Tabella 4:** geni attivati da Angiotensina II, o esponenti proteine regolatrici negative di AngII, che vengono modulati dall'ivabradina in antagonismo ad AngII

Gene name (ivabradine modulated)	FC (abs)	Regulation	Function	Gene name (NF-kappa B modulated)	NF kappa B Regulation
CD55 antigen (Cd55)	1,77	down	Cell surface complement regulatory protein	CD55	up
Prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (Ptgs2 COX-2)	1,91	down	Inflammation	PTGIS prostaglandin synthase	up
			Inflammation	PGES, prostaglandin E synthase	up
ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1A (Abcb1a)	1,94	down	Cholesterol re-uptake	ABCA1	up
Hyaluronan synthase1 (Has1)	2,23	down	Synthesizes hyaluronic acid	HAS1	up
Interleukin 1 receptor, type II (Il1r2)	2,50	down	inflammation	IL-1RN	up
Interleukin 11 (Il11)	2,83	down	inflammation	IL-11	up
Oxidized low density lipoprotein (lectin-like) receptor 1 (Olr1) Lox1	3,20	down	receptor for oxidized low density lipoprotein	LOX-1	up
Solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, serotonin), member 4 (Slc6a4)	3,42	down	(neurotransmitter transporter, serotonin)	SLC6A6	up
Calcitonin/calcitonin-related polypeptide, alpha (Calca)	3,50	down	Regulated by TNF alpha Pro-inflammatory	CGRP	up
Calcitonin-related polypeptide, beta (Calcb)	3,58	down	Regulated by TNF alpha Pro-inflammatory	CGRP	up
Gap junction protein, beta 3 (Gjb3)	4,40	down	Communications between endothelial cells	GJB1	up
				GJA1	
Serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade B, member 5 (Serpib5)	5,03	down	Endothelial cells apoptosis inducer	SERPINE2	up
Wingless-related MMTV integration site 7A (Wnt7a)	5,18	down	Induction of angiogenesis	WNT10B	up
T-cell leukemia, homeobox 2 (Tlx2)	7,09	down	homeobox protein	TLX2	up

**Tabella 5:** geni attivati da NF-kB, che vengono *down*-regolati dal trattamento con ivabradina.



**Schema 1:** meccanismo di antagonismo dell'ivabradina in seguito a trattamento, rispetto all'attivazione genica indotta da angiotensina II

## Reference List

1. Baumhake M, Custodis F, Schlimmer N, Laufs U, Bohm M (2010) Heart rate reduction with ivabradine improves erectile dysfunction in parallel to decrease in atherosclerotic plaque load in ApoE-knockout mice. *Atherosclerosis* 212: 55-62. S0021-9150(10)00184-X [pii];10.1016/j.atherosclerosis.2010.03.002 [doi].
2. Custodis F, Baumhake M, Schlimmer N, List F, Gensch C, Bohm M, Laufs U (2008) Heart rate reduction by ivabradine reduces oxidative stress, improves endothelial function, and prevents atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 117: 2377-2387. CIRCULATIONAHA.107.746537 [pii];10.1161/CIRCULATIONAHA.107.746537 [doi].
3. Dominguez-Rodriguez A, Blanco-Palacios G, Abreu-Gonzalez P (2011) Increased heart rate and atherosclerosis: potential implications of ivabradine therapy. *World J Cardiol* 3: 101-104. 10.4330/wjc.v3.i4.101 [doi].
4. Ku DN, Giddens DP, Zarins CK, Glagov S (1985) Pulsatile flow and atherosclerosis in the human carotid bifurcation. Positive correlation between plaque location and low oscillating shear stress. *Arteriosclerosis* 5: 293-302.
5. Custodis F, Gertz K, Balkaya M, Prinz V, Mathar I, Stamm C, Kronenberg G, Kazakov A, Freichel M, Bohm M, Endres M, Laufs U (2011) Heart rate contributes to the vascular effects of chronic mental stress: effects on endothelial function and ischemic brain injury in mice. *Stroke* 42: 1742-1749. STROKEAHA.110.598607 [pii];10.1161/STROKEAHA.110.598607 [doi].
6. Custodis F, Fries P, Muller A, Stamm C, Grube M, Kroemer HK, Bohm M, Laufs U (2012) Heart rate reduction by ivabradine improves aortic compliance in apolipoprotein E-deficient mice. *J Vasc Res* 49: 432-440. 000339547 [pii];10.1159/000339547 [doi].
7. Schirmer SH, Degen A, Baumhake M, Custodis F, Schuh L, Kohlhaas M, Friedrich E, Bahlmann F, Kappl R, Maack C, Bohm M, Laufs U (2012) Heart-rate reduction by If-channel inhibition with ivabradine restores collateral artery growth in hypercholesterolemic atherosclerosis. *Eur Heart J* 33: 1223-1231. ehr255 [pii];10.1093/eurheartj/ehr255 [doi].
8. Baumhake M, Custodis F, Schlimmer N, Laufs U, Bohm M (2010) Heart rate reduction with ivabradine improves erectile dysfunction in parallel to decrease in atherosclerotic plaque load in ApoE-knockout mice. *Atherosclerosis* 212: 55-62. S0021-9150(10)00184-X [pii];10.1016/j.atherosclerosis.2010.03.002 [doi].
9. Chatzizisis YS, Coskun AU, Jonas M, Edelman ER, Feldman CL, Stone PH (2007) Role of endothelial shear stress in the natural history of coronary atherosclerosis and vascular remodeling: molecular, cellular, and vascular behavior. *J Am Coll Cardiol* 49: 2379-2393. S0735-1097(07)01220-X [pii];10.1016/j.jacc.2007.02.059 [doi].

10. Zarins CK, Giddens DP, Bharadvaj BK, Sottiurai VS, Mabon RF, Glagov S (1983) Carotid bifurcation atherosclerosis. Quantitative correlation of plaque localization with flow velocity profiles and wall shear stress. *Circ Res* 53: 502-514.
11. Ku D. (1997) Blood flow in arteries. *Annu Rev Fluid Mech.*
12. Nichols WW, O'Rourke MF, McEniery CM (2005) *Blood Flow in Arteries: Theoretical, Experimental and Clinical Principles*. 5th edition London: A Hodder Arnold Publication, 2005.
13. Munson BR, Young DF, Okiishi TH (1990) *Fundamentals of Fluid Mechanics*. Canada: John Wiley & Sons, 1990.
14. Ku DN, Giddens DP, Zarins CK, Glagov S (1985) Pulsatile flow and atherosclerosis in the human carotid bifurcation. Positive correlation between plaque location and low oscillating shear stress. *Arteriosclerosis* 5: 293-302.
15. Asakura T, Karino T (1990) Flow patterns and spatial distribution of atherosclerotic lesions in human coronary arteries. *Circ Res* 66: 1045-1066.
16. Caro CG, Fitz-Gerald JM, Schroter RC (1969) Arterial wall shear and distribution of early atheroma in man. *Nature* 223: 1159-1160.
17. Endo S, Goldsmith HL, Karino T (2014) Flow patterns and preferred sites of atherosclerotic lesions in the human aorta - II. Abdominal aorta. *Biorheology* 51: 257-274. 865361494WG50662 [pii];10.3233/BIR-14006 [doi].
18. Endo S, Goldsmith HL, Karino T (2014) Flow patterns and preferred sites of atherosclerotic lesions in the human aorta - I. Aortic arch. *Biorheology* 51: 239-255. Y688387W20452014 [pii];10.3233/BIR-14005 [doi].
19. Chatzizisis YS, Giannoglou GD (2007) Coronary hemodynamics and atherosclerotic wall stiffness: a vicious cycle. *Med Hypotheses* 69: 349-355. S0306-9877(07)00045-X [pii];10.1016/j.mehy.2006.11.053 [doi].
20. Endo S, Goldsmith HL, Karino T (2014) Flow patterns and preferred sites of atherosclerotic lesions in the human aorta - I. Aortic arch. *Biorheology* 51: 239-255. Y688387W20452014 [pii];10.3233/BIR-14005 [doi].
21. Sakamoto S, Ikado H, Kawarada O, Harada K, Ishihara M, Yasuda S, Ogawa H (2014) Pulsatile high-velocity turbulent flow in lower extremity venous ultrasonography. Displaced venous valve. *Heart* 100: 814. heartjnl-2013-305309 [pii];10.1136/heartjnl-2013-305309 [doi].
22. Zarins CK, Zatina MA, Giddens DP, Ku DN, Glagov S (1987) Shear stress regulation of artery lumen diameter in experimental atherogenesis. *J Vasc Surg* 5: 413-420. 0741-5214(87)90048-6 [pii].
23. Asakura T, Karino T (1990) Flow patterns and spatial distribution of atherosclerotic lesions in human coronary arteries. *Circ Res* 66: 1045-1066.

24. Chatzizisis YS, Giannoglou GD (2006) Pulsatile flow: a critical modulator of the natural history of atherosclerosis. *Med Hypotheses* 67: 338-340. S0306-9877(06)00113-7 [pii];10.1016/j.mehy.2006.02.005 [doi].
25. Chatzizisis YS, Giannoglou GD, Sianos G, Ziakas A, Tsikaderis D, Dardas P, Matakos A, Basdekidou C, Misirli G, Zamboulis C, Louridas GE, Parcharidis GE (2008) In vivo comparative study of linear versus geometrically correct three-dimensional reconstruction of coronary arteries. *Am J Cardiol* 101: 263-267. S0002-9149(07)01894-2 [pii];10.1016/j.amjcard.2007.07.070 [doi].
26. Giannoglou GD, Chatzizisis YS, Zamboulis C, Parcharidis GE, Mikhailidis DP, Louridas GE (2008) Elevated heart rate and atherosclerosis: an overview of the pathogenetic mechanisms. *Int J Cardiol* 126: 302-312. S0167-5273(07)01845-1 [pii];10.1016/j.ijcard.2007.08.077 [doi].
27. Berne R, Levy M (2015) *Cardiovascular physiology* 8th. Missouri: Mosby: St. Luis; 2001.
28. Thubrikar MJ, Robicsek F (1995) Pressure-induced arterial wall stress and atherosclerosis. *Ann Thorac Surg* 59: 1594-1603. 000349759401037D [pii].
29. Cooper LT, Cooke JP, Dzau VJ (1994) The vasculopathy of aging. *J Gerontol* 49: B191-B196.
30. Bassiouny HS, Zarins CK, Kadowaki MH, Glagov S (1994) Hemodynamic stress and experimental aortoiliac atherosclerosis. *J Vasc Surg* 19: 426-434. S0741521494002363 [pii].
31. Benetos A, Adamopoulos C, Bureau JM, Temmar M, Labat C, Bean K, Thomas F, Pannier B, Asmar R, Zureik M, Safar M, Guize L (2002) Determinants of accelerated progression of arterial stiffness in normotensive subjects and in treated hypertensive subjects over a 6-year period. *Circulation* 105: 1202-1207.
32. Sa CR, Pannier B, Benetos A, Siche JP, London GM, Mallion JM, Safar ME (1997) Association between high heart rate and high arterial rigidity in normotensive and hypertensive subjects. *J Hypertens* 15: 1423-1430.
33. Tzima E, Irani-Tehrani M, Kiosses WB, Dejana E, Schultz DA, Engelhardt B, Cao G, DeLisser H, Schwartz MA (2005) A mechanosensory complex that mediates the endothelial cell response to fluid shear stress. *Nature* 437: 426-431. nature03952 [pii];10.1038/nature03952 [doi].
34. Traub O, Berk BC (1998) Laminar shear stress: mechanisms by which endothelial cells transduce an atheroprotective force. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18: 677-685.
35. Tzima E, del Pozo MA, Shattil SJ, Chien S, Schwartz MA (2001) Activation of integrins in endothelial cells by fluid shear stress mediates Rho-dependent cytoskeletal alignment. *EMBO J* 20: 4639-4647. 10.1093/emboj/20.17.4639 [doi].
36. Tzima E (2006) Role of small GTPases in endothelial cytoskeletal dynamics and the shear stress response. *Circ Res* 98: 176-185. 98/2/176 [pii];10.1161/01.RES.0000200162.94463.d7 [doi].
37. Liu B, Cai SX, Zhang L (2008) [Disturbed shear stress affects disposition of caveolin-1 in endothelial cells.]. *Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi* 36: 927-930.

38. Lehoux S, Tedgui A (1998) Signal transduction of mechanical stresses in the vascular wall. *Hypertension* 32: 338-345.
39. Lehoux S, Tedgui A (2004) [Shear and signal transduction in the endothelial cell]. *Med Sci (Paris)* 20: 551-556. 008422ar [pii];10.1051/medsci/2004205551 [doi].
40. Lusis AJ (2000) Atherosclerosis. *Nature* 407: 233-241. 10.1038/35025203 [doi].
41. Rapezzi C, Gallo P (2010) [Atherosclerosis: a poldistrictual disease]. *G Ital Cardiol (Rome)* 11: 43S-48S.
42. McGill HC, Jr., McMahan CA, Herderick EE, Zieske AW, Malcom GT, Tracy RE, Strong JP (2002) Obesity accelerates the progression of coronary atherosclerosis in young men. *Circulation* 105: 2712-2718.
43. McMahan CA, Gidding SS, Fayad ZA, Zieske AW, Malcom GT, Tracy RE, Strong JP, McGill HC, Jr. (2005) Risk scores predict atherosclerotic lesions in young people. *Arch Intern Med* 165: 883-890. 165/8/883 [pii];10.1001/archinte.165.8.883 [doi].
44. Zieske AW, McMahan CA, McGill HC, Jr., Homma S, Takei H, Malcom GT, Tracy RE, Strong JP (2005) Smoking is associated with advanced coronary atherosclerosis in youth. *Atherosclerosis* 180: 87-92. S0021-9150(04)00575-1 [pii];10.1016/j.atherosclerosis.2004.10.039 [doi].
45. McGill HC, Jr., McMahan CA, Malcom GT, Oalman MC, Strong JP (1997) Effects of serum lipoproteins and smoking on atherosclerosis in young men and women. The PDAY Research Group. Pathobiological Determinants of Atherosclerosis in Youth. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17: 95-106.
46. McGill HC, Jr., McMahan CA, Herderick EE, Tracy RE, Malcom GT, Zieske AW, Strong JP (2000) Effects of coronary heart disease risk factors on atherosclerosis of selected regions of the aorta and right coronary artery. PDAY Research Group. Pathobiological Determinants of Atherosclerosis in Youth. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20: 836-845.
47. Restrepo C, Strong JP, McGill HC, Jr. (1964) THE NATURAL HISTORY OF AORTIC AND CORONARY ATHEROSCLEROSIS IN COLOMBIA EVALUATED BY NECROPSY EXAMINATION. *J Atheroscler Res* 4: 213-229.
48. Strong JP, McGill HC, Jr. (1963) THE NATURAL HISTORY OF AORTIC ATHEROSCLEROSIS: RELATIONSHIP TO RACE, SEX, AND CORONARY LESIONS IN NEW ORLEANS. *Exp Mol Pathol* 52: SUPPL1-27.
49. McMahan CA, Gidding SS, McGill HC, Jr. (2008) Coronary heart disease risk factors and atherosclerosis in young people. *J Clin Lipidol* 2: 118-126. S1933-2874(08)00073-1 [pii];10.1016/j.jacl.2008.02.006 [doi].
50. McMahan CA, Gidding SS, Malcom GT, Tracy RE, Strong JP, McGill HC, Jr. (2006) Pathobiological determinants of atherosclerosis in youth risk scores are associated with early and advanced atherosclerosis. *Pediatrics* 118: 1447-1455. 118/4/1447 [pii];10.1542/peds.2006-0970 [doi].



51. Rainwater DL, McMahan CA, Malcom GT, Scheer WD, Roheim PS, McGill HC, Jr., Strong JP (1999) Lipid and apolipoprotein predictors of atherosclerosis in youth: apolipoprotein concentrations do not materially improve prediction of arterial lesions in PDAY subjects. The PDAY Research Group. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19: 753-761.
52. McGill HC, Jr., Kushwaha RS (1995) Individuality of lipemic responses to diet. *Can J Cardiol* 11 Suppl G: 15G-27G.
53. Hixson JE, McMahan CA, McGill HC, Jr., Strong JP (1992) Apo B insertion/deletion polymorphisms are associated with atherosclerosis in young black but not young white males. Pathobiological Determinants of Atherosclerosis in Youth (PDAY) Research Group. *Arterioscler Thromb* 12: 1023-1029.
54. Hopkins PN (2013) Molecular biology of atherosclerosis. *Physiol Rev* 93: 1317-1542. 93/3/1317 [pii];10.1152/physrev.00004.2012 [doi].
55. Dimmeler S, Haendeler J, Rippmann V, Nehls M, Zeiher AM (1996) Shear stress inhibits apoptosis of human endothelial cells. *FEBS Lett* 399: 71-74. S0014-5793(96)01289-6 [pii].
56. Liu Y, Chen BP, Lu M, Zhu Y, Stemerman MB, Chien S, Shyy JY (2002) Shear stress activation of SREBP1 in endothelial cells is mediated by integrins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22: 76-81.
57. Gharavi NM, Baker NA, Mouillesseaux KP, Yeung W, Honda HM, Hsieh X, Yeh M, Smart EJ, Berliner JA (2006) Role of endothelial nitric oxide synthase in the regulation of SREBP activation by oxidized phospholipids. *Circ Res* 98: 768-776. 01.RES.0000215343.89308.93 [pii];10.1161/01.RES.0000215343.89308.93 [doi].
58. Liu Y, Chen BP, Lu M, Zhu Y, Stemerman MB, Chien S, Shyy JY (2002) Shear stress activation of SREBP1 in endothelial cells is mediated by integrins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22: 76-81.
59. Li D, Mehta JL (2009) Intracellular signaling of LOX-1 in endothelial cell apoptosis. *Circ Res* 104: 566-568. 104/5/566 [pii];10.1161/CIRCRESAHA.109.194209 [doi].
60. Mehta JL, Sanada N, Hu CP, Chen J, Dandapat A, Sugawara F, Satoh H, Inoue K, Kawase Y, Jishage K, Suzuki H, Takeya M, Schnackenberg L, Beger R, Hermonat PL, Thomas M, Sawamura T (2007) Deletion of LOX-1 reduces atherogenesis in LDLR knockout mice fed high cholesterol diet. *Circ Res* 100: 1634-1642. CIRCRESAHA.107.149724 [pii];10.1161/CIRCRESAHA.107.149724 [doi].
61. Mehta JL, Khaidakov M, Hermonat PL, Mitra S, Wang X, Novelli G, Sawamura T (2011) LOX-1: a new target for therapy for cardiovascular diseases. *Cardiovasc Drugs Ther* 25: 495-500. 10.1007/s10557-011-6325-5 [doi].
62. Chien S (2008) Effects of disturbed flow on endothelial cells. *Ann Biomed Eng* 36: 554-562. 10.1007/s10439-007-9426-3 [doi].
63. Li D, Mehta JL (2009) Intracellular signaling of LOX-1 in endothelial cell apoptosis. *Circ Res* 104: 566-568. 104/5/566 [pii];10.1161/CIRCRESAHA.109.194209 [doi].

64. Hopkins PN (2013) Molecular biology of atherosclerosis. *Physiol Rev* 93: 1317-1542. 93/3/1317 [pii];10.1152/physrev.00004.2012 [doi].
65. Takahashi M, Berk BC (1996) Mitogen-activated protein kinase (ERK1/2) activation by shear stress and adhesion in endothelial cells. Essential role for a herbimycin-sensitive kinase. *J Clin Invest* 98: 2623-2631. 10.1172/JCI119083 [doi].
66. McMahan CA, Gidding SS, Malcom GT, Tracy RE, Strong JP, McGill HC, Jr. (2006) Pathobiological determinants of atherosclerosis in youth risk scores are associated with early and advanced atherosclerosis. *Pediatrics* 118: 1447-1455. 118/4/1447 [pii];10.1542/peds.2006-0970 [doi].
67. Thorin E, Thorin-Trescases N (2009) Vascular endothelial ageing, heartbeat after heartbeat. *Cardiovasc Res* 84: 24-32. cvp236 [pii];10.1093/cvr/cvp236 [doi].
68. Tzima E, Reader JS, Irani-Tehrani M, Ewalt KL, Schwartz MA, Schimmel P (2005) VE-cadherin links tRNA synthetase cytokine to anti-angiogenic function. *J Biol Chem* 280: 2405-2408. C400431200 [pii];10.1074/jbc.C400431200 [doi].
69. Chatzizisis YS, Giannoglou GD (2010) Shear stress and inflammation: are we getting closer to the prediction of vulnerable plaque? *Expert Rev Cardiovasc Ther* 8: 1351-1353. 10.1586/erc.10.126 [doi].
70. Libby P, Ridker PM, Hansson GK (2011) Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature* 473: 317-325. nature10146 [pii];10.1038/nature10146 [doi].
71. Vogiatzi G, Tousoulis D, Stefanadis C (2009) The role of oxidative stress in atherosclerosis. *Hellenic J Cardiol* 50: 402-409.
72. Giannotti G, Landmesser U (2007) Endothelial dysfunction as an early sign of atherosclerosis. *Herz* 32: 568-572. 10.1007/s00059-007-3073-1 [doi].
73. Hajra L, Evans AI, Chen M, Hyduk SJ, Collins T, Cybulsky MI (2000) The NF-kappa B signal transduction pathway in aortic endothelial cells is primed for activation in regions predisposed to atherosclerotic lesion formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 9052-9057. 97/16/9052 [pii].
74. Khachigian LM, Resnick N, Gimbrone MA, Jr., Collins T (1995) Nuclear factor-kappa B interacts functionally with the platelet-derived growth factor B-chain shear-stress response element in vascular endothelial cells exposed to fluid shear stress. *J Clin Invest* 96: 1169-1175. 10.1172/JCI118106 [doi].
75. Morawietz H, Duerrschmidt N, Niemann B, Galle J, Sawamura T, Holtz J (2001) Induction of the oxLDL receptor LOX-1 by endothelin-1 in human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 284: 961-965. 10.1006/bbrc.2001.5044 [doi];S0006-291X(01)95044-2 [pii].
76. Bassiouny HS, Song RH, Hong XF, Singh A, Kocharyan H, Glagov S (1998) Flow regulation of 72-kD collagenase IV (MMP-2) after experimental arterial injury. *Circulation* 98: 157-163.

77. Choudhary S, Higgins CL, Chen IY, Reardon M, Lawrie G, Vick GW, III, Karmonik C, Via DP, Morrisett JD (2006) Quantitation and localization of matrix metalloproteinases and their inhibitors in human carotid endarterectomy tissues. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26: 2351-2358. 01.ATV.0000239461.87113.0b [pii];10.1161/01.ATV.0000239461.87113.0b [doi].
78. de NR, Verkleij CJ, von der Thusen JH, Jukema JW, van der Wall EE, van Berkel TJ, Baker AH, Biessen EA (2006) Lesional overexpression of matrix metalloproteinase-9 promotes intraplaque hemorrhage in advanced lesions but not at earlier stages of atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26: 340-346. 01.ATV.0000197795.56960.64 [pii];10.1161/01.ATV.0000197795.56960.64 [doi].
79. Wexler L, Brundage B, Crouse J, Detrano R, Fuster V, Maddahi J, Rumberger J, Stanford W, White R, Taubert K (1996) Coronary artery calcification: pathophysiology, epidemiology, imaging methods, and clinical implications. A statement for health professionals from the American Heart Association. Writing Group. *Circulation* 94: 1175-1192.
80. van der Wal AC, Becker AE (1999) Atherosclerotic plaque rupture--pathologic basis of plaque stability and instability. *Cardiovasc Res* 41: 334-344. S0008-6363(98)00276-4 [pii].
81. Rosa GM, Bauckneht M, Masoero G, Mach F, Quercioli A, Seitun S, Balbi M, Brunelli C, Parodi A, Nencioni A, Vuilleumier N, Montecucco F (2013) The vulnerable coronary plaque: update on imaging technologies. *Thromb Haemost* 110: 706-722. 13-02-0121 [pii];10.1160/TH13-02-0121 [doi].
82. DiFrancesco D, Noble D (2012) Rebuttal: "The funny current in the context of the coupled clock pacemaker cell system". *Heart Rhythm* 9: 457-458. S1547-5271(11)01078-2 [pii];10.1016/j.hrthm.2011.09.023 [doi].
83. DiFrancesco D, Noble D (2012) The funny current has a major pacemaking role in the sinus node. *Heart Rhythm* 9: 299-301. S1547-5271(11)01076-9 [pii];10.1016/j.hrthm.2011.09.021 [doi].
84. DiFrancesco D, Borer JS (2007) The funny current: cellular basis for the control of heart rate. *Drugs* 67 Suppl 2: 15-24. 6723 [pii].
85. Bucchi A, Barbuti A, Baruscotti M, DiFrancesco D (2007) Heart rate reduction via selective 'funny' channel blockers. *Curr Opin Pharmacol* 7: 208-213. S1471-4892(07)00016-1 [pii];10.1016/j.coph.2006.09.005 [doi].
86. Barbuti A, Baruscotti M, DiFrancesco D (2007) The pacemaker current: from basics to the clinics. *J Cardiovasc Electrophysiol* 18: 342-347. JCE736 [pii];10.1111/j.1540-8167.2006.00736.x [doi].
87. Bucchi A, Tognati A, Milanese R, Baruscotti M, DiFrancesco D (2006) Properties of ivabradine-induced block of HCN1 and HCN4 pacemaker channels. *J Physiol* 572: 335-346. jphysiol.2005.100776 [pii];10.1113/jphysiol.2005.100776 [doi].
88. Bois P, Renaudon B, Baruscotti M, Lenfant J, DiFrancesco D (1997) Activation of f-channels by cAMP analogues in macropatches from rabbit sino-atrial node myocytes. *J Physiol* 501 ( Pt 3): 565-571.

89. DiFrancesco D, Camm JA (2004) Heart rate lowering by specific and selective I(f) current inhibition with ivabradine: a new therapeutic perspective in cardiovascular disease. *Drugs* 64: 1757-1765. 64163 [pii].
90. Scicchitano P, Cortese F, Ricci G, Carbonara S, Moncelli M, Iacoviello M, Cecere A, Gesualdo M, Zito A, Caldarola P, Scrutinio D, Lagioia R, Riccioni G, Ciccone MM (2014) Ivabradine, coronary artery disease, and heart failure: beyond rhythm control. *Drug Des Devel Ther* 8: 689-700. 10.2147/DDDT.S60591 [doi]; dddt-8-689 [pii].
91. Custodis F, Baumhakel M, Schlimmer N, List F, Gensch C, Bohm M, Laufs U (2008) Heart rate reduction by ivabradine reduces oxidative stress, improves endothelial function, and prevents atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 117: 2377-2387. CIRCULATIONAHA.107.746537 [pii]; 10.1161/CIRCULATIONAHA.107.746537 [doi].
92. Kroller-Schon S, Schulz E, Wenzel P, Kleschyov AL, Hortmann M, Torzewski M, Oelze M, Renne T, Daiber A, Munzel T (2011) Differential effects of heart rate reduction with ivabradine in two models of endothelial dysfunction and oxidative stress. *Basic Res Cardiol* 106: 1147-1158. 10.1007/s00395-011-0227-3 [doi].
93. Kaplan JR, Manuck SB, Clarkson TB (1987) The influence of heart rate on coronary artery atherosclerosis. *J Cardiovasc Pharmacol* 10 Suppl 2: S100-S102.
94. Perski A, Olsson G, Landou C, de FU, Theorell T, Hamsten A (1992) Minimum heart rate and coronary atherosclerosis: independent relations to global severity and rate of progression of angiographic lesions in men with myocardial infarction at a young age. *Am Heart J* 123: 609-616. 0002-8703(92)90497-J [pii].
95. Strawn WB, Bondjers G, Kaplan JR, Manuck SB, Schwenke DC, Hansson GK, Shively CA, Clarkson TB (1991) Endothelial dysfunction in response to psychosocial stress in monkeys. *Circ Res* 68: 1270-1279.
96. Beere PA, Russell SD, Morey MC, Kitzman DW, Higginbotham MB (1999) Aerobic exercise training can reverse age-related peripheral circulatory changes in healthy older men. *Circulation* 100: 1085-1094.
97. Beere PA, Glagov S, Zarins CK (1984) Retarding effect of lowered heart rate on coronary atherosclerosis. *Science* 226: 180-182.
98. Giannoglou GD, Chatzizisis YS (2014) Heart rate lowering reduces cardiovascular disease burden. *Curr Med Res Opin* 30: 1757. 10.1185/03007995.2014.922945 [doi].
99. Krenek P, Hamaide MC, Morel N, Wibo M (2006) A simple method for rapid separation of endothelial and smooth muscle mRNA reveals Na/K<sup>+</sup>-ATPase alpha-subunit distribution in rat arteries. *J Vasc Res* 43: 502-510. 95963 [pii]; 10.1159/000095963 [doi].
100. Yuan Z, Miyoshi T, Bao Y, Sheehan JP, Matsumoto AH, Shi W (2009) Microarray analysis of gene expression in mouse aorta reveals role of the calcium signaling pathway in control of atherosclerosis susceptibility. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 296: H1336-H1343. 01095.2008 [pii]; 10.1152/ajpheart.01095.2008 [doi].

101. Zhang Y, Li XY, Pitzer AL, Chen YY, Wang L, Li PL (2015) Coronary Endothelial Dysfunction Induced by Nlrp3 Inflammasome Activation during Hypercholesterolemia: Beyond Inflammation. *Antioxid Redox Signal* . 10.1089/ars.2014.5978 [doi].
102. Yamada S, Wang KY, Tanimoto A, Fan J, Shimajiri S, Kitajima S, Morimoto M, Tsutsui M, Watanabe T, Yasumoto K, Sasaguri Y (2008) Matrix metalloproteinase 12 accelerates the initiation of atherosclerosis and stimulates the progression of fatty streaks to fibrous plaques in transgenic rabbits. *Am J Pathol* 172: 1419-1429. S0002-9440(10)61900-1 [pii];10.2353/ajpath.2008.070604 [doi].
103. Metcalf DJ, Nightingale TD, Zenner HL, Lui-Roberts WW, Cutler DF (2008) Formation and function of Weibel-Palade bodies. *J Cell Sci* 121: 19-27. 121/1/19 [pii];10.1242/jcs.03494 [doi].
104. Tabibiazar R, Wagner RA, Spin JM, Ashley EA, Narasimhan B, Rubin EM, Efron B, Tsao PS, Tibshirani R, Quertermous T (2005) Mouse strain-specific differences in vascular wall gene expression and their relationship to vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25: 302-308. 01.ATV.0000151372.86863.a5 [pii];10.1161/01.ATV.0000151372.86863.a5 [doi].
105. Tabibiazar R, Wagner RA, Ashley EA, King JY, Ferrara R, Spin JM, Sanan DA, Narasimhan B, Tibshirani R, Tsao PS, Efron B, Quertermous T (2005) Signature patterns of gene expression in mouse atherosclerosis and their correlation to human coronary disease. *Physiol Genomics* 22: 213-226. 00001.2005 [pii];10.1152/physiolgenomics.00001.2005 [doi].
106. Hudry-Clergeon H, Stengel D, Ninio E, Vilgrain I (2005) Platelet-activating factor increases VE-cadherin tyrosine phosphorylation in mouse endothelial cells and its association with the PtdIns3'-kinase. *FASEB J* 19: 512-520. 19/6/512 [pii];10.1096/fj.04-2202com [doi].
107. Custodis F, Baumhakel M, Schlimmer N, List F, Gensch C, Bohm M, Laufs U (2008) Heart rate reduction by ivabradine reduces oxidative stress, improves endothelial function, and prevents atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 117: 2377-2387. CIRCULATIONAHA.107.746537 [pii];10.1161/CIRCULATIONAHA.107.746537 [doi].
108. Custodis F, Fries P, Muller A, Stamm C, Grube M, Kroemer HK, Bohm M, Laufs U (2012) Heart rate reduction by ivabradine improves aortic compliance in apolipoprotein E-deficient mice. *J Vasc Res* 49: 432-440. 000339547 [pii];10.1159/000339547 [doi].
109. Lumsden NG, Khambata RS, Hobbs AJ (2010) C-type natriuretic peptide (CNP): cardiovascular roles and potential as a therapeutic target. *Curr Pharm Des* 16: 4080-4088. BSP/CPD/E-Pub/000243-aamir [pii].
110. Moyes AJ, Khambata RS, Villar I, Bubb KJ, Baliga RS, Lumsden NG, Xiao F, Gane PJ, Rebstock AS, Worthington RJ, Simone MI, Mota F, Rivilla F, Vallejo S, Peiro C, Sanchez Ferrer CF, Djordjevic S, Caulfield MJ, MacAllister RJ, Selwood DL, Ahluwalia A, Hobbs AJ (2014) Endothelial C-type natriuretic peptide maintains vascular homeostasis. *J Clin Invest* 124: 4039-4051. 74281 [pii];10.1172/JCI74281 [doi].

111. Suga S, Itoh H, Komatsu Y, Ogawa Y, Hama N, Yoshimasa T, Nakao K (1993) Cytokine-induced C-type natriuretic peptide (CNP) secretion from vascular endothelial cells--evidence for CNP as a novel autocrine/paracrine regulator from endothelial cells. *Endocrinology* 133: 3038-3041.
112. Kuehnl A, Pelisek J, Pongratz J, Eckstein HH (2012) C-type natriuretic peptide and its receptors in atherosclerotic plaques of the carotid artery of clinically asymptomatic patients. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 43: 649-654. S1078-5884(12)00099-8 [pii];10.1016/j.ejvs.2012.02.010 [doi].
113. Hong TC, Yeh HI, Shih BF, Wang AM, Chen CY, Hou CJ, Tsai CH (2006) Brain natriuretic peptide and C-type natriuretic peptide are differently regulated by age but similarly elevated in coronary artery disease. *Acta Cardiol* 61: 1-5.
114. Passino C, Del RS, Severino S, Gabutti A, Prontera C, Clerico A, Giannessi D, Emdin M (2008) C-type natriuretic peptide expression in patients with chronic heart failure: effects of aerobic training. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 15: 168-172. 10.1097/HJR.0b013e3282f10e9b [doi].
115. Horio T, Iwashima Y, Kamide K, Tokudome T, Yoshihara F, Nakamura S, Kawano Y (2010) Chronic kidney disease as an independent risk factor for new-onset atrial fibrillation in hypertensive patients. *J Hypertens* 28: 1738-1744. 10.1097/HJH.0b013e32833a7dfe [doi].
116. Mehta JL, Khaidakov M, Hermonat PL, Mitra S, Wang X, Novelli G, Sawamura T (2011) LOX-1: a new target for therapy for cardiovascular diseases. *Cardiovasc Drugs Ther* 25: 495-500. 10.1007/s10557-011-6325-5 [doi].
117. Zhang Q, Wang C, Liu Z, Liu X, Han C, Cao X, Li N (2012) Notch signal suppresses Toll-like receptor-triggered inflammatory responses in macrophages by inhibiting extracellular signal-regulated kinase 1/2-mediated nuclear factor kappaB activation. *J Biol Chem* 287: 6208-6217. M111.310375 [pii];10.1074/jbc.M111.310375 [doi].
118. Li Z, Shi HY, Zhang M (2005) Targeted expression of maspin in tumor vasculatures induces endothelial cell apoptosis. *Oncogene* 24: 2008-2019. 1208449 [pii];10.1038/sj.onc.1208449 [doi].
119. Alonso F, Krattinger N, Mazzolai L, Simon A, Waeber G, Meda P, Haefliger JA (2010) An angiotensin II- and NF-kappaB-dependent mechanism increases connexin 43 in murine arteries targeted by renin-dependent hypertension. *Cardiovasc Res* 87: 166-176. cvq031 [pii];10.1093/cvr/cvq031 [doi].
120. Johnstone DM, Graham RM, Trinder D, Riveros C, Olynyk JK, Scott RJ, Moscato P, Milward EA (2012) Changes in brain transcripts related to Alzheimer's disease in a model of HFE hemochromatosis are not consistent with increased Alzheimer's disease risk. *J Alzheimers Dis* 30: 791-803. 660L056483470425 [pii];10.3233/JAD-2012-112183 [doi].
121. Nus M, MacGrogan D, Martinez-Poveda B, Benito Y, Casanova JC, Fernandez-Aviles F, Bermejo J, de la Pompa JL (2011) Diet-induced aortic valve disease in mice haploinsufficient for the Notch pathway effector RBPJK/CSL. *Arterioscler Thromb*

Vasc Biol 31: 1580-1588. ATVBAHA.111.227561  
[pii];10.1161/ATVBAHA.111.227561 [doi].

122. Kitagawa M, Hojo M, Imayoshi I, Goto M, Ando M, Ohtsuka T, Kageyama R, Miyamoto S (2013) Hes1 and Hes5 regulate vascular remodeling and arterial specification of endothelial cells in brain vascular development. *Mech Dev* . S0925-4773(13)00056-7 [pii];10.1016/j.mod.2013.07.001 [doi].
123. Simmons MJ, Serra R, Hermance N, Kelliher MA (2012) NOTCH1 inhibition in vivo results in mammary tumor regression and reduced mammary tumorsphere-forming activity in vitro. *Breast Cancer Res* 14: R126. bcr3321 [pii];10.1186/bcr3321 [doi].
124. Zhou H, Chen S, Wang W, Wang Z, Wu X, Zhang Z (2012) Nanog inhibits lipopolysaccharide-induced expression of pro-inflammatory cytokines by blocking NF-kappaB transcriptional activity in rat primary microglial cells. *Mol Med Rep* 5: 842-846. 10.3892/mmr.2011.719 [doi].
125. Lu TM, Luo YJ, Yu JK (2012) BMP and Delta/Notch signaling control the development of amphioxus epidermal sensory neurons: insights into the evolution of the peripheral sensory system. *Development* 139: 2020-2030. dev.073833 [pii];10.1242/dev.073833 [doi].
126. Tang SJ, Hoodless PA, Lu Z, Breitman ML, McInnes RR, Wrana JL, Buchwald M (1998) The Tlx-2 homeobox gene is a downstream target of BMP signalling and is required for mouse mesoderm development. *Development* 125: 1877-1887.
127. Zhang M, Zhou SH, Zhao SP, Liu QM, Li XP, Shen XQ (2008) Irbesartan attenuates Ang II-induced BMP-2 expression in human umbilical vein endothelial cells. *Vasc Med* 13: 239-245. 13/3/239 [pii];10.1177/1358863X08089282 [doi].
128. Wang J, Shelly L, Miele L, Boykins R, Norcross MA, Guan E (2001) Human Notch-1 inhibits NF-kappa B activity in the nucleus through a direct interaction involving a novel domain. *J Immunol* 167: 289-295.
129. Wang L, Zhang H, Rodriguez S, Cao L, Parish J, Mumaw C, Zollman A, Kamoka MM, Mu J, Chen DZ, Srour EF, Chitteti BR, HogenEsch H, Tu X, Bellido TM, Boswell HS, Manshoury T, Verstovsek S, Yoder MC, Kapur R, Cardoso AA, Carlesso N (2014) Notch-dependent repression of miR-155 in the bone marrow niche regulates hematopoiesis in an NF-kappaB-dependent manner. *Cell Stem Cell* 15: 51-65. S1934-5909(14)00187-8 [pii];10.1016/j.stem.2014.04.021 [doi].
130. Masumura T, Yamamoto K, Shimizu N, Obi S, Ando J (2009) Shear stress increases expression of the arterial endothelial marker ephrinB2 in murine ES cells via the VEGF-Notch signaling pathways. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29: 2125-2131. ATVBAHA.109.193185 [pii];10.1161/ATVBAHA.109.193185 [doi].
131. Diczfalusy U, Olofsson KE, Carlsson AM, Gong M, Golenbock DT, Rooyackers O, Flaring U, Bjorkbacka H (2009) Marked upregulation of cholesterol 25-hydroxylase expression by lipopolysaccharide. *J Lipid Res* 50: 2258-2264. M900107-JLR200 [pii];10.1194/jlr.M900107-JLR200 [doi].
132. Wong SL, Lau CW, Wong WT, Xu A, Au CL, Ng CF, Ng SS, Gollasch M, Yao X, Huang Y (2011) Pivotal role of protein kinase Cdelta in angiotensin II-induced endothelial

cyclooxygenase-2 expression: a link to vascular inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31: 1169-1176. ATVBAHA.110.216044 [pii];10.1161/ATVBAHA.110.216044 [doi].

133. Traub O, Monia BP, Dean NM, Berk BC (1997) PKC-epsilon is required for mechano-sensitive activation of ERK1/2 in endothelial cells. *J Biol Chem* 272: 31251-31257.
134. Hajra L, Evans AI, Chen M, Hyduk SJ, Collins T, Cybulsky MI (2000) The NF-kappa B signal transduction pathway in aortic endothelial cells is primed for activation in regions predisposed to atherosclerotic lesion formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 9052-9057. 97/16/9052 [pii].
135. Nigro P, Satoh K, O'Dell MR, Soe NN, Cui Z, Mohan A, Abe J, Alexis JD, Sparks JD, Berk BC (2011) Cyclophilin A is an inflammatory mediator that promotes atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J Exp Med* 208: 53-66. jem.20101174 [pii];10.1084/jem.20101174 [doi].
136. Watt V, Chamberlain J, Steiner T, Francis S, Crossman D (2011) TRAIL attenuates the development of atherosclerosis in apolipoprotein E deficient mice. *Atherosclerosis* 215: 348-354. S0021-9150(11)00070-0 [pii];10.1016/j.atherosclerosis.2011.01.010 [doi].
137. Nigro P, Satoh K, O'Dell MR, Soe NN, Cui Z, Mohan A, Abe J, Alexis JD, Sparks JD, Berk BC (2011) Cyclophilin A is an inflammatory mediator that promotes atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J Exp Med* 208: 53-66. jem.20101174 [pii];10.1084/jem.20101174 [doi].