

***UNIVERSITÀ DEGLI STUDI
DI MILANO – BICOCCA***

**Facoltà di Scienze Matematiche, Fisiche e Naturali
Dipartimento di Biotecnologie e Bioscienze**

***Dottorato di ricerca in Biotecnologie Industriali,
XXII ciclo***



***Caratterizzazione del trascrittoma di PBMCs di
pazienti affetti da Aneurisma dell'Aorta
Addominale e da Ostruzione Carotidea***

Dott. Stefano Pozzi

Anno Accademico 2008/2009

Dottorato in Biotecnologie Industriali, XXII ciclo

Dott. Stefano Pozzi
Matricola: R00681

Tutor: Prof.ssa Marialuisa Lavitrano

Il lavoro presentato in questa tesi è stato realizzato presso il laboratorio di medicina molecolare del dipartimento di scienze chirurgiche sito presso l'edificio U8 dell'Università degli studi di Milano-Bicocca.

Università degli Studi di Milano-Bicocca
Piazza dell'Ateneo Nuovo 1, 20126, Milano



Dipartimento di Biotecnologie e Bioscienze
Piazza della Scienza 2, 20126, Milano

SOMMARIO

<u>SCOPO DEL LAVORO</u>	<u>4</u>
<u>INTRODUZIONE</u>	<u>5</u>
<u>MATERIALI E METODI</u>	<u>47</u>
<u>RISULTATI</u>	<u>67</u>
<u>DISCUSSIONE</u>	<u>99</u>
<u>BIBLIOGRAFIA</u>	<u>108</u>
<u>SUMMARY</u>	<u>119</u>
<u>COMMENTI E RINGRAZIAMENTI</u>	<u>122</u>

SCOPO DEL LAVORO

Il nostro obiettivo primario in questo lavoro era quello di creare una biobanca, una “collezione” cioè di campioni, tissutali ed ematici (da cui poi estrarre e separare gli acidi nucleici) da cui partire per future ricerche avendo a disposizione un ricco pool genetico entro cui cercare anomalie trascrizionali e traduzionali da poter impiegare, in prima istanza, per migliorare gli attuali strumenti diagnostici e terapeutici in seconda battuta.

Questo ragionamento apparentemente strano ha in realtà un senso nella difficoltà attuale di individuare precocemente le lesioni arteriose, sia quelle di origine aneurismatica che sono e rimangono le più pericolose per la vita del paziente oltre che le più difficili da individuare in quanto sostanzialmente asintomatiche, sia le stenosi carotidee che permangono asintomatiche finché non raggiungono gradi di stenosi superiori al 70% e che, a questo punto sono già molto pericoloso in quanto potenziali cause di ictus.

Fortunatamente la chirurgia offre approcci risolutivi per questo tipo di patologie ed una diagnosi precoce consentirebbe di ridurre drasticamente la mortalità e le invalidità legate a mancate diagnosi.

Per individuare soggetti “a rischio” attualmente ci si basa sulla compresenza dei noti fattori di rischio cardiovascolari quali dislipidemie, diabete, alterazioni della pressione sistolica e diastolica, elevati valori di colesterolo, stato infiammatorio eccetera.

Spesso però sia le stenosi carotidee e gli aneurismi si sviluppano anche in soggetti che non presentano o che presentano alterazioni moderate in questi parametri. Sarebbe dunque importante trovare dei nuovi markers univoci per lo screening e l’identificazione dei soggetti a rischio.

Lo scopo più generale del lavoro è quindi quello di fornire un contributo alla comprensione dei processi fisiopatologici alla base delle patologie arteriosclerotiche siano esse stenotiche o dilatative al fine di proporre nuovi precoci marker diagnostici e prognostici indispensabili per fornire ai pazienti ed ai medici strumenti sempre più efficaci nella lotta a queste patologie che ancora oggi sono tra le principali cause di morte ed invalidità nei paesi occidentali.

INTRODUZIONE

PATOLOGIE VASCOLARI: ARTERIOSCLEROSI

Le patologie vascolari colpiscono principalmente le arterie. Il processo patologico più frequente e più significativo dal punto di vista clinico è rappresentato dall'arteriosclerosi. L'arteriosclerosi è, infatti, la principale causa di morte nei paesi occidentali e rende conto dell'ischemia cerebrale (stroke) e dell'infarto del miocardio. Il termine arteriosclerosi deriva dal greco arthero e sclerosis che va ad indicare la presenza di un irrigidimento dell'arteria. Tale patologia è caratterizzata dalla presenza di un'inflammazione cronica degenerativa.

L'arteriosclerosi può essere classificata, sulla base dei diversi meccanismi patogenetici e della diversa sede di localizzazione della lesione (tonaca intima o tonaca media), in:

- ☐ Aterosclerosi che a sua volta comprende la lesione ostruttiva, l'aneurisma e la restenosi.
- ☐ Arteriolo-sclerosi.

ARTERIOLOSCLEROSI

L'arteriolo-sclerosi può essere di due diversi tipi: ipertensiva e associata ai trapianti. Nella forma associata ai trapianti la lesione ha sede nelle regioni di anastomosi tra i vasi dell'organo trapiantato e i vasi del ricevente. Il danno, in questo caso, è dovuto all'attivazione del sistema immunitario del ricevente nei confronti degli antigeni non-self esposti sulla superficie dell'endotelio dei vasi del donatore. La formazione della stenosi è responsabile dell'interruzione del flusso del sangue, del danno ischemico e del rigetto dell'organo con conseguente fallimento del trapianto (1).

ATEROSCLEROSI

L'aterosclerosi è una patologia infiammatoria, cronica, progressiva caratterizzata dall'accumulo di lipidi e elementi fibrosi nell'intima (in particolar modo nello spazio subendoteliale) delle arterie muscolari e elastiche di grosso e medio calibro quali aorta, carotidi, coronarie e vasi degli arti inferiori. Le lesioni si verificano principalmente a livello delle biforcazioni e degli archi in cui il flusso passa da laminare a turbolento.

L'evento precoce di tale patologia è rappresentato dalla formazione della così detta "stria lipidica" ovvero di un accumulo di lipidi nello

spazio subendoteliale e la produzione di cellule schiumose (macrofagi ripieni di colesterolo). Nell'uomo la formazione delle strie lipidiche (lesione reversibile) avviene precocemente tra la prima e la seconda decade di vita. Tali lesioni non sono sintomatiche ma possono portare alla formazione di lesioni più avanzate in cui è presente un core lipidico necrotico contenuto in un cappuccio fibroso ricco di cellule muscolari lisce (vascular smooth muscle cells, VSMCs). Le placche così formate vanno incontro a un rimaneggiamento continuo e sono soggette a complicanze di diversa natura come ad esempio la rottura, l'embolizzazione, l'emorragia e la calcificazione.

EZIOLOGIA

L'eziologia dell'aterosclerosi è multifattoriale e non è ancora del tutto nota. I fattori predisponenti possono essere raggruppati in: (1) fattori con una componente genetica, (2) fattori ambientali e (3) altri fattori.

1. FATTORI CON UNA COMPONENTE GENETICA:

- elevati livelli di lipoproteine a bassa densità (low density lipoprotein, LDL) o/e di lipoproteine a densità molto bassa (very low density lipoprotein, VLDL)
- ridotti livelli di lipoproteine ad alta densità (high density lipoprotein, HDL)
- pressione elevata
- elevati livelli di omocisteina
- diabete e obesità
- sindromi metaboliche
- infiammazione sistemica
- elevati livelli di fattori emostatici (alti livelli di fibrinogeno, elevata attività piastrinica,...)
- storia familiare

2. FATTORI AMBIENTALI:

- dieta ricca di lipidi
- fumo
- assenza di esercizio fisico/ vita sedentaria

3. ALTRI FATTORI

- età
- sesso maschile
- presenza di infezioni (ad esempio *Chlamydia pneumoniae*) e altri patogeni. Tale correlazione è ancora controversa (2).

La complessità dei fattori di rischio non è dovuta solo al coinvolgimento di una fitta rete di geni ma anche dall'interazione tra tali geni e l'ambiente. Tali interazioni, inoltre, non sono

semplicemente additive spesso, infatti, si verifica un processo di amplificazione (2).

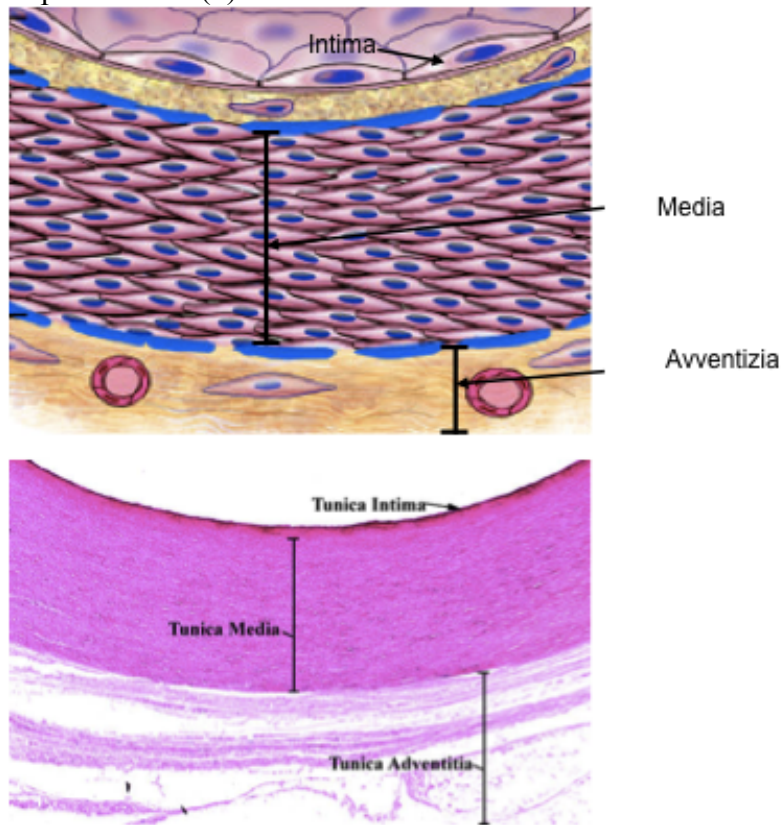


FIG. 1: struttura di un vaso arterioso

PATOGENESI

La formazione della lesione aterosclerotica è un processo progressivo e discontinuo che avviene attraverso una serie di fasi che comportano l'evoluzione della semplice stria lipidica in una placca prima asintomatica e che, successivamente, può essere associata a manifestazioni cliniche di differente tipo e entità.

INIZIO DELLA LESIONE

L'evento precoce della formazione della lesione aterosclerotica è rappresentato dal danno alle cellule endoteliali (endothelial cells, ECs) che costituiscono lo strato più interno della parete vascolare. Le ECs svolgono una funzione molto importante nel mantenimento dell'omeostasi del vaso; hanno infatti un'azione antitrombotica, antiaggregante, antinfiammatoria e anti-spasmodica (attraverso la produzione dell'ossido nitrico (NO) da parte del sistema dell'ossido nitrico sintetasi endoteliale (endothelial nitric oxide synthase, eNOS)).

La lesione delle ECs porta, conseguentemente, a una variazione dello stato fisiologico del vaso.

Le cellule endoteliali sono soggette a numerosi stimoli tra cui il più importante è rappresentato dal flusso sanguigno che è responsabile della differente morfologia delle ECs. Infatti, le cellule sottoposte a un flusso laminare e uniforme hanno una struttura ellissoidale e sono orientate lungo la direzione del flusso. Le cellule posizionate nelle regioni di flusso alterato come le biforcazioni e le curvature sono, invece, poligonali e non hanno un particolare orientamento. In tali regioni, che diventano siti preferenziali della formazione delle lesioni, si osserva una variazione della permeabilità dell'endotelio. Tale modificazione è dovuta alla diminuita interazione tra le cellule che consente l'ingresso nello spazio subendoteliale di macromolecole, tra cui le LDL.

La quantità di LDL che si accumulano è strettamente correlata alla quantità di lipoproteine a bassa densità circolanti: se si ha un aumento di tale valore si osserverà anche un up-regolazione della ritenzione di lipidi nel sito della lesione. L'ingresso delle LDL avviene attraverso diffusione passiva attraverso le giunzioni tra le ECs mentre la ritenzione sembra essere mediata dall'interazione dell'apolipoproteina B (apolipoprotein B, apoB) con le componenti della matrice extracellulare e in particolare con i proteoglicani. Oltre alle LDL anche i remnants e le lipoproteine(a), contenenti l'apoA, possono accumularsi nell'intima e promuovere l'aterosclerosi.

In un primo momento sono riscontrabili LDL poco ossidate non ancora capaci di indurre l'up-take da parte dei macrofagi (MΦ). Una volta nello spazio subendoteliale le LDL subiscono diversi processi di modificazione tra cui l'ossidazione, la lipolisi, la proteolisi e l'aggregazione. Tali eventi contribuiscono alla formazione delle cellule schiumose e all'induzione dell'infiammazione. L'ossidazione, che avviene in maniera progressiva, viene indotta dalle specie reattive dell'ossigeno (reactive oxygen species, ROS) liberate dalle EC. Un ruolo predominante nel processo di modificazione viene svolto dalla 12/15-lipossigenasi, la cui delezione nel topo porta, infatti, una diminuzione del livello di LDL ossidate (3). La lipossigenasi è, infatti, responsabile del trasferimento di ossigeno molecolare negli acidi grassi e porta alla formazione dell'acido idroperossieicosatetraenoico (hydroperoxyeicosatetraenoic acid, HPETE) che va ad alimentare le LDL dopo aver attraversato le membrane cellulari delle ECs (2).

INFIAMMAZIONE NELLE FASI PRECOCI

L'accumulo delle LDL ossidate porta al reclutamento nella parete del vaso di monociti e linfociti ma non di neutrofili. Le LDL ossidate inducono, infatti, l'espressione di molecole di adesione sulla superficie delle cellule endoteliali e di molecole pro-infiammatorie tra cui citochine e chemochine. Tale processo è mediato, principalmente, dalla frazione fosfolipidica delle lipoproteine e dai suoi prodotti di ossidazione risultanti dal riarrangiamento e scissione degli acidi grassi (2). Le LDL ossidate sono, inoltre, in grado di indurre l'inattivazione dell'eNOS e, conseguentemente, portano alla perdita della funzione protettiva dell'ossido nitrico.

Sono, però, presenti altri fattori responsabili della modulazione della risposta infiammatoria tra cui le forze emodinamiche (shear stress), i livelli di omocisteina, i livelli di ormoni, le infezioni e il diabete. Quest'ultimo può promuovere l'infiammazione attraverso la formazione di prodotti finali della glicazione che interagiscono con le cellule endoteliali (2).

L'ingresso dei monociti e dei linfociti T nelle fasi precoci di sviluppo dell'aterosclerosi è mediato principalmente dalla molecola di adesione alla cellula vascolare-1 (vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1) che viene indotta subito dopo l'interazione delle cellule endoteliali con le LDL (2). In particolare l'attivazione trascrizionale del gene VCAM-1 è mediato in parte dal fattore nucleare-kB (NF-kB, nuclear factor-kB) attivato dai fosfolipidi ossidati e dalle aldeidi a catena corta derivanti dall'ossidazione delle lipoproteine (4) e dalle citochine pro-infiammatorie (come l'interleuchina-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) e il fattore della necrosi tumorale- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)) presenti in elevate quantità nelle lesioni aterosclerotiche nell'uomo. Svolgono comunque un ruolo importante nell'adesione dei leucociti anche la E- e la P-selectina come osservato in modelli murini (3).

Le cellule della risposta immune, in seguito all'adesione alle ECs, entrano nell'intima mediante la diapedesi attraverso le giunzioni delle cellule endoteliali. Tale processo è mediato da una serie di citochine chemoattrattive definite chemochine. Tra queste ritroviamo la proteina chemoattrattiva dei monociti-1 (monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1) overespressa negli ateromi e capace di reclutare i monociti e l'interleuchina-8 (interleukin-8, IL-8) (3). Una volta nell'intima i monociti maturano nei macrofagi i quali esprimono molecole scavenger che legano e internalizzano molecole modificate come le LDL ossidate.

L'ateroma esprime, inoltre, molecole che possono contribuire al reclutamento dei linfociti, inclusa la famiglia di CXC chemochine indotte dall'interferone- γ (interferon- γ , IFN- γ) che includono la proteina inducibile-10 (inducible protein-10, IP-10), la monochina indotta dall'IFN- γ (monokine induced by IFN- γ , Mig) e il chemoattraente delle cellule T IFN- inducibile (IFN-inducible T-cell α -chemoattractant, I-TAC). Queste chemochine si legano al recettore CXCR3 (CXC receptor-3) espresso sulla superficie dei linfociti T (3).

L'interazione dei linfociti T con l'antigene porta, invece, la loro attivazione e la produzione di una serie di citochine che possono interagire con le altre cellule presenti nell'ateroma portando la formazione di una rete di comunicazione tra le cellule della risposta innata e di quella adattativa (3).

Il reclutamento dei mastociti dipende, invece, dall'eotassina un chemoattrattore che si lega al recettore per le chemochine CC-3 (CCR3, chemokine CC receptor-3) (3).

FORMAZIONE DELLE CELLULE SCHIUMOSE (FOAM CELLS)

I macrofagi localizzati nell'intima, in presenza di LDL altamente ossidate, attraverso processi di fagocitosi delle lipoproteine stesse, vengono convertiti in cellule schiumose così definite per il loro particolare aspetto al microscopio (2). Tale processo è mediato da una serie di recettori scavenger, tra cui i più importanti sono recettore scavenger-A (scavenger receptor, SR-A), il CD36 e il CD68, che riconoscono una serie di ligandi diversi. L'espressione dei recettori è regolata dal perossisoma proliferator-activated receptor- γ , un fattore trascrizionale attivato da diverse molecole tra cui gli acidi grassi ossidati e le citochine come il TNF- α e l'IFN- γ (2).

L'ossidazione avanzata delle lipoproteine viene attuata da enzimi diversi che comprendono la mieloperossidasi (myeloperoxidase, MPO), la sfingomielinasi (sphingomyelinase, SMase) e la fosfolipasi secretoria 2 (secretory phospholipase-2, sPLA2). La MPO produce specie altamente reattive come l'acido ipocloroso e il radicale tirosil; la SMase promuove l'aggregazione delle lipoproteine aumentandone la ritenzione e l'up-take e la sPLA2 può promuovere l'ossidazione delle LDL (2).

INFIAMMAZIONE AVANZATA

Le cellule schiumose e i macrofagi presenti nell'ateroma possono produrre fattori di crescita e citochine implicati nella progressione e complicazione della lesione. Le cellule schiumose producono specie

reattive dell'ossigeno e citochine pro-infiammatorie che amplificano la risposta locale (2).

A livello della placca si osserva, inoltre, un aumento dei livelli del fattore di crescita stimolante le colonie di macrofagi (macrophage colony-stimulating factor, M-CSF) che porta un up-regolazione dell'SR-A e dei fattori di crescita oltre che all'induzione di stimoli antiapoptotici e mitogenici (4).

L'infiammazione può essere, inoltre, indotta dal fattore di crescita stimolante le colonie di macrofagi e granulociti (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF) che permette la sopravvivenza dei mononucleati con attività fagocitica (4).

PLACCA FIBROSA

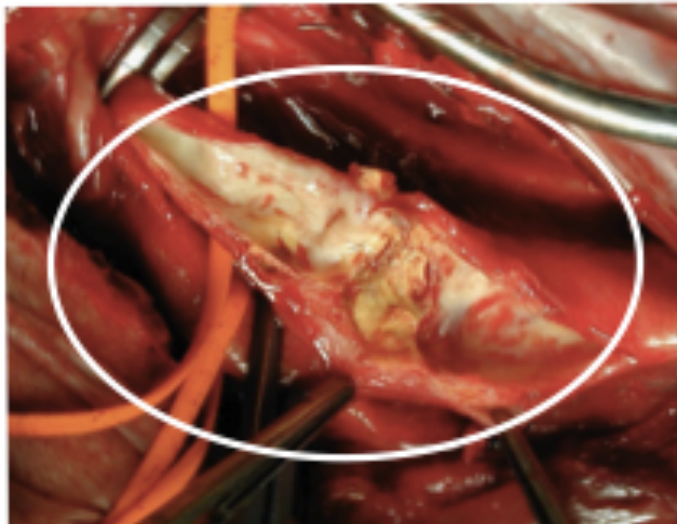


FIG. 2: Placca Aterosclerotica fibrosa (ellisse bianco).

La placca fibrosa (FIG. 2) è caratterizzata da una massa di lipidi (principalmente colesterolo e i suoi esteri), dall'accumulo di cellule muscolari lisce vascolari e dei loro prodotti di sintesi. Le citochine e i fattori di crescita secreti dai macrofagi e dai linfociti T sono importanti per la migrazione dalla media, proliferazione e produzione della matrice da parte delle VSMCs. La matrice e le VSMCs vanno a formare il così detto cappuccio fibroso che ha come funzione presunta quella di stabilizzare il core lipidico necrotico (2).

L'interazione tra il CD40 e il CD40L (CD40 ligand, ligando del CD40) è stato dimostrato essere importante per lo sviluppo della lesione avanzata (2). Il CD40 è, infatti, espresso a livello di diversi tipi

cellulari come i linfociti B e T, i Mφ, le ECs e le VSMCs. L'attivazione del CD40 e del CD40L risulta nella produzione di citochine, proteasi degradanti la matrice e molecole di adesione. Diversi fattori di rischio sembrano contribuire allo sviluppo della lesione fibrosa inclusi elevati livelli di omocisteina, ipertensione e ormoni. Elevati livelli di omocisteina sembrano, infatti, danneggiare le ECs e indurre la proliferazione delle VSMCs (2). L'aumento della pressione è, invece, associato con il pathway renina-angiotensina in cui l'angiotensina II stimola direttamente la crescita e la produzione della matrice extracellulare nelle VSMCs. L'ipertensione è stata, inoltre, associata in modelli animali alla stimolazione dell'espressione del fattore di crescita derivante dalle piastrine (platelet derived growth factor, PDGF) che è un potente mitogeno per le cellule muscolari vascolari (5). Gli estrogeni, infine, hanno effetti anti-aterogenici multipli tra cui conseguenze sui livelli delle lipoproteine nel plasma e la stimolazione della produzione di ossido nitrico (2).

È stato, inoltre, dimostrato che infezioni da parte di diversi patogeni sono correlate con la formazione della placca. Ad esempio il citomegalovirus attraverso inibizione della proteina p53 potrebbe portare un aumento della crescita delle VSMCs e per mezzo del recettore per le chemochine US28 stimolare la migrazione delle cellule muscolari stesse (2).

Il cappuccio fibroso, in ogni caso, non è una componente statica ma si presenta come una struttura dinamica che subisce continui processi di rimodellamento. Le metalloproteinasi (matrix metalloproteinase, MMP) e altre proteasi sono, infatti, responsabili della degradazione delle componenti della matrice mentre le cellule muscolari sono adibite alla sintesi di tali elementi. La stabilità della placca è, quindi, associata all'equilibrio tra queste due forze opposte (2).

EVOLUZIONE DELLA PLACCA

L'ateroma così formato tipicamente subisce un aggravamento e in alcuni casi porta a manifestazioni cliniche. È stato dimostrato in numerosi studi clinici che l'evoluzione della placca non avviene in maniera costante ma attraverso una serie di passaggi discontinui (6). Tuttavia, l'ostruzione completa del lume del vaso con conseguente arresto del flusso del sangue è un evento poco frequente.

Normalmente la lesione aterosclerotica può evolvere in maniera diversa:

- **CALCIFICAZIONE.** La calcificazione è un processo attivo in cui cellule simili agli osteociti producono uno scaffold di matrice che

viene successivamente calcificata portando alla formazione di una struttura simile all'osso e che stabilizza la placca (4).

- **NEOVASCOLARIZZAZIONE E EMORAGGIA INTRAPLACCA.** All'interno della placca si vanno a formare una serie di piccoli vasi come effetto della neoangiogenesi promossa dalle cellule muscolari e dai macrofagi attraverso la liberazione di fattori di crescita tra cui il fattore di crescita dei fibroblasti (fibroblast growth factor, FGF) acido e basico e il fattore di crescita endoteliale vascolare (vascular endothelial growth factor, VEGF) (4). La funzione di questi vasi è quella di garantire il trasporto di ossigeno e di sostanze nutritive nonché di rimuovere i prodotti di scarto alle/dalle cellule presenti nella placca. I nuovi vasi possono facilmente andare incontro a rottura portando all'emorragia intraplaacca. La fuoriuscita di sangue determina la trombosi in situ dovuta alla deposizione di fibrina e omosiderina. Durante la trombosi in situ si verifica la liberazione di trombina che a sua volta è responsabile dell'induzione della migrazione e della proliferazione delle VSMCs e del rilascio di fattori di crescita (come il PDGF)) dai granuli alfa delle piastrine con conseguente azione sulle cellule muscolari. Le piastrine sono, inoltre responsabili, della liberazione del fattore di crescita trasformante beta (transforming growth factor- β , TGF- β) che stimola la produzione di collagene nelle VSMCs. L'effetto finale dell'emorragia è rappresentato dalla espansione della placca (4).

- **ULCERAZIONE DELLA PLACCA.** L'ulcerazione o rottura della placca è in parte mediata dalla risposta infiammatoria (FIG. 6). La rottura della placca porta l'interazione tra i fattori della coagulazione presenti nel circolo con i fattori tissutali contenuti nella placca stessa. La rottura viene indotta da un progressivo assottigliamento del cappuccio fibroso ad opera delle metalloproteinasi prodotte da macrofagi e cellule muscolari sotto lo stimolo infiammatorio. Ad esempio l'INF- γ , stimola l'azione dei M ϕ e inibisce la produzione dei proteoglicani da parte delle VSMCs. La presenza di un flusso turbolento contribuisce, inoltre, a un aumentato della instabilità dell'ateroma. La rottura della placca è responsabile sia della formazione di trombi che di emboli (4).

- **TROMBI E EMBOLI.** La desquamazione del sottile strato di cellule endoteliali e la conseguente esposizione del collagene subendoteliale porta alla formazione di trombi attraverso l'attivazione della cascata della coagulazione. Allo stesso modo l'ulcerazione della placca esita nella trombosi e nell'embolizzazione (4).

MOLECOLE ATEROPROTETTIVE

Tra le molecole protettive ritroviamo quelle codificate da geni contenenti nel promotore elementi responsivi allo shear-stress. Molti di questi geni sono impegnati nella modulazione della risposta infiammatoria come ad esempio la superossido dismutasi (superoxide dismutase, SOD) espressa ad alti livelli nelle regioni a flusso laminare. La SOD presenta un'azione spiccatamente antiossidante e, indirettamente, è responsabile della inibizione dell'espressione di molecole di adesione, tra cui è presente VCAM-1, e di altri pathway infiammatori (4). Anche le ossido nitrico sintetasi mediante la produzione di NO, responsabile dell'inibizione di NF- κ B, possono down-regolare VCAM-1 (4).

Un ruolo protettivo lo svolgono anche le lipoproteine ad alta densità che sono responsabili della rimozione dell'eccesso di colesterolo dai tessuti periferici. Le HDL mostrano, inoltre, un'attività antiossidante dovuta alla loro capacità di trasportare un estere, il paraoxonase, che può degradare alcuni fosfolipidi ossidati e quindi attivi (1).

Infine, a livello del processo infiammatorio, svolge un ruolo importante l'interleuchina 10 (interleukin-10, IL-10) prodotta dai linfociti T helper 2 (Th2) capace di ridurre l'attività dei linfociti Th1 e dei macrofagi riducendo la risposta infiammatoria, l'ossidazione lipidica, la produzione di MMP, la morte cellulare e aumentando, conseguentemente, la stabilità della placca (7).

MANIFESTAZIONI CLINICHE

A seconda della sede della formazione della lesione aterosclerotica e delle complicanze si verificheranno differenti manifestazioni cliniche associate all'evoluzione della placca da stabile a instabile.

Se l'ateroma è localizzato a livello delle coronarie si osserva la comparsa di angina (stabile o instabile) che, in seguito a trombosi, può esitare nell'infarto del miocardio. Nel caso dell'angina si ha un interessamento del tessuto subendocardico senza necrosi del tessuto muscolare. L'infarto è, invece, caratterizzato dalla perdita di cellule muscolari (8).

Se il danno si trova nelle carotidi la formazione di emboli può determinare l'insorgenza dell'ictus o dell'attacco ischemico transiente (TIA). L'ictus, per il cervello, è l'equivalente dell'infarto per il cuore mentre, il TIA è simile all'angina. Il TIA, infatti, determina un deficit reversibile, invece, lo stroke è accompagnato dalla morte neuronale (8, 9).

ANEURISMA

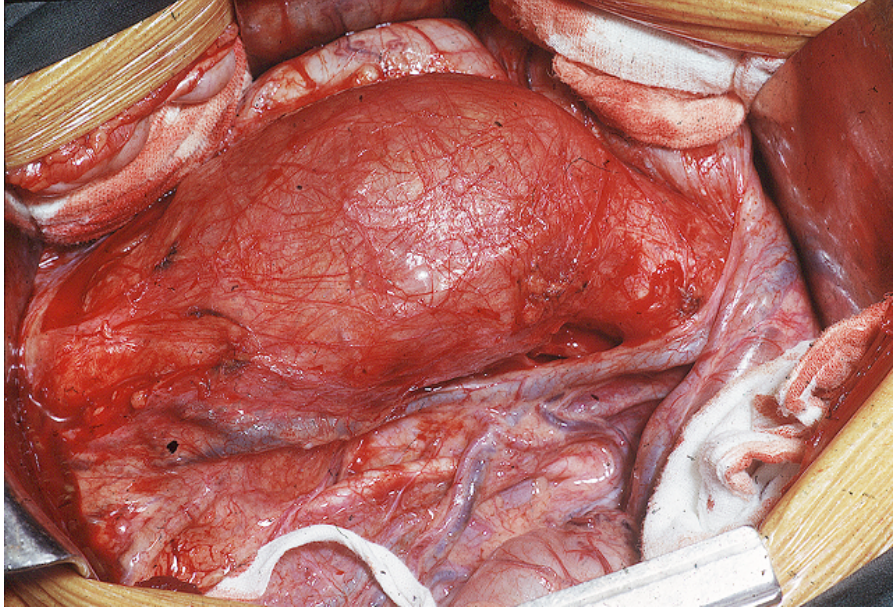


FIG. 3: Aneurisma dell'aorta addominale

L'aneurisma è una patologia focale, dilatativa, cronica, infiammatoria, asintomatica della tonaca media caratterizzata dal progressivo assottigliamento della parete vascolare. L'aneurisma è localizzato prevalentemente nell'aorta addominale sottorenale (11).

La classificazione macroscopica degli aneurismi si basa sulla forma e sulle dimensioni:

- o Aneurismi Sacculari, sono limitati esclusivamente ad una porzione della parete vasale, hanno dimensioni variabili tra i 5 ed i 20 cm (FIG. 3) e sono spesso occupati, in parte o interamente, da trombi.

- o Gli aneurismi fusiformi, si formano in seguito ad una graduale e progressiva dilatazione dell'intera circonferenza del vaso e raggiungono dimensioni variabili, sia nel diametro che può superare i 20 cm (FIG. 3), sia nella lunghezza. Questo tipo più frequentemente coinvolge i tratti ascendente e trasverso dell'arco aortico, ma alcuni possono interessare ampi segmenti dell'aorta addominale o, anche delle arterie iliache.

Gli AAA possono divenire clinicamente manifesti in seguito a vari avvenimenti:

⇒ Rottura nella cavità peritoneale o nei tessuti retro peritoneali, con conseguente emorragia massiva e spesso fatale.

- ⇒ Occlusioni vasali sia per compressione diretta sia a seguito della formazione di trombi, soprattutto nelle arterie iliache, renali, mesenteriche e delle arterie vertebrali che irrorano il midollo spinale.
- ⇒ Embolia con partenza da placche ateroma sicche o da trombi murali.
- ⇒ Formazione di una massa addominale similtumorale molto evidente e spesso pulsante alla palpazione.

Gli aneurismi di grandi dimensioni incidono negativamente sulla longevità, soprattutto in rapporto al rischio di rottura che è direttamente proporzionale alla dimensione dell'aneurisma.

Un aneurisma aortico che non superi i 4 cm ha un rischio di rottura di circa il 2%, superando i 5 cm di diametro il rischio cresce variando tra il 5 ed il 10%. Per questo motivo, qualora venisse individuato un aneurisma aortico è regola generale procedere all'introduzione di una protesi endovascolare per minimizzare il rischio di successive gravi complicanze.

L'eziologia non è del tutto chiara ma si ritiene che sia il risultato dell'interazione tra fattori di rischio epidemiologici e una lesione iniziale alla parete dell'arteria. Tra i fattori di rischio ritroviamo la predisposizione genetica, il genere maschile, l'età superiore ai sessanta anni, il fumo di sigaretta, l'aterosclerosi, lo stress emodinamico e le infezioni microbiche. Il danno può essere, invece, determinato da un'infezione microbica che attraverso molecular mimicry (mimesi molecolare) indirizza la risposta immune verso le componenti del vaso oppure può essere causata da un'inflammation secondaria con conseguente degradazione delle componenti della matrice e esposizione di nuovi epitopi (12-71).

Evento precoce è il reclutamento, mediato dalle chemochine, di leucociti nella media seguito dall'attivazione dei macrofagi e dalla produzione di molecole pro-infiammatorie (12-71). I macrofagi sono responsabili, oltre che della risposta immunitaria, anche della liberazione di proteasi (principalmente metalloproteinasi) che determinano la degradazione dell'elastina (13).

La diminuzione iniziale delle fibre elastiche è seguita dall'aumento della produzione del collagene che viene sintetizzato da fibroblasti e cellule muscolari lisce al fine di far fronte al diminuito ritorno elastico e all'aumento delle forze emodinamiche, le quali determinano un'iniziale dilatazione (11). Nel tempo si verifica, inoltre, la degradazione del collagene e la deplezione delle cellule muscolari con conseguente evoluzione della lesione e rottura dell'aneurisma

(11,13) che si verifica nel momento in cui la parete del vaso non è più in grado di far fronte alle forze emodinamiche (13). La rottura è associata a una mortalità dell'80 %. Principali attori dell'evoluzione aneurismatica sono, quindi, le VSMCs ed i macrofagi responsabili, rispettivamente, della sintesi delle MMP-2 e -9, rispettivamente (11). L'aneurisma dell'aorta addominale è come detto una patologia multifattoriale con fattori di rischio genetico e una componente immunologica oltre che metabolica.

Cellule del sistema immunitario quali macrofagi, neutrofili, mastociti, linfociti T e B e fibroblasti avventizi ali producono citochine ed enzimi che promuovono l'infiammazione, la degradazione della matrice extracellulare e la neovascolarizzazione.

La degradazione della tonaca media è causata dall'attività delle metalloproteinasi 2, 9 e 12, unitamente alle catepsine e alle elastasi prodotte dai neutrofili.

Le chimasi causano l'apoptosi delle VSMCs (vascular smooth muscle cells), MMP 3, 8 e 13 causano invece la degradazione del collagene della tonaca avventizia (FIG. 4) portando, di fatto, alla rottura della parete del vaso e quindi dell'aneurisma (71).

Allo stesso tempo chemochine quali interleuchina 8, macrophage inflammatory protein 1 alpha e monocyte chemotactic protein-1, sono causa del reclutamento e della proliferazione delle cellule infiammatorie mentre le citochine quali VEGF e TGF β promuovono la neoangiogenesi.

In conclusione gli AAA sono importanti patologie cardiovascolari ad elevata morbilità ed elevato tasso di mortalità, specialmente nelle persone anziane dei paesi industrializzati.

Attualmente l'unico trattamento disponibile per queste patologie è quello chirurgico, per il buon esito dell'intervento chirurgico però il dato fondamentale è la tempestività nella diagnosi. La mortalità operatoria è, infatti, circa del 5% per i pazienti il cui aneurisma addominale non sia andato incontro a rottura. Qualora si proceda all'intervento in urgenza in seguito a rottura dell'aneurisma il tasso di mortalità cresce drasticamente raggiungendo il 50%.

Mediators	Cells of Origin	Role in AAA
MMP-1	Fibroblasts	Collagenase → AAA rupture
MMP-2	Vascular smooth muscle cells fibroblasts	Elastin degradation TGF- β release from extracellular matrix
MMP-3	Macrophages	Elastin and Collagen degradation Release of VEGF-A from extracellular matrix → Angiogenesis
MMP-8	Neutrophils	Collagenase → AAA rupture
MMP-9	Macrophages neutrophils	Elastin degradation Collagenase → AAA rupture TGF- β release from extracellular matrix Release of VEGF-A from extracellular matrix → angiogenesis Macrophage migration
MMP-12	Macrophages	Highest elastolytic activity
MMP-13	Vascular smooth muscle cells	Collagenase → AAA rupture
MMP-14	Cell membrane of macrophages and vascular smooth muscle cells	Activates proMMP-2 Facilitates migration of macrophages
TIMP-1	Various cell lines	Protective role Inhibits MMP-9, MMP-1, and ADAM-10 Impairs cellular migration
Cathepsins		
Intracellular	All cells	Apoptosis
Extracellular	Macrophages neutrophils	Extracellular matrix degradation Angiogenesis
Chymases	Mast cells	Activate proMMP-1 and proMMP-3 Vascular smooth muscle cell apoptosis Increase angiotensin II
Tryptases	Activate proMMP-3	
Neutrophil elastase	Neutrophils	Elastin degradation
MCP-1	Vascular smooth muscle cells fibroblasts	Monocyte chemotaxis
MIP-1 α	Macrophages	T-cell chemotaxis
IL-8	Macrophages	Neutrophil chemotaxis
LTD ₄	Adventitial macrophages mast cells	Induces MIP-1 α
IL-4	T _H 2 helper T cells NKT cells	Promotes differentiation of Th0 to Th2 Blocks differentiation of Th0 to Th1 Promotes humoral immunity
IFN- γ	T _H 1 helper T cells NKT cells	Promotes differentiation of Th0 to Th1 Blocks differentiation of Th0 to Th2 Promotes cell mediated immunity by activating macrophages
IL-17	Th17 cells	Creates a link between innate and adaptive immunity. Associated with many autoimmune diseases
TGF- β	Macrophages T-cells	Angiogenesis Increases MMP-2, MMP-9, chymase, and tryptase → ECM degradation Differentiation of fibroblasts to myofibroblasts Acting simultaneously with IL-6 or IL-21 promotes differentiation of T _H 0 to Th17
VEGF	Fibroblasts	Angiogenesis

ADAM indicates adamalysin; IFN- γ , interferon-gamma; IL, interleukin; LTD₄, leukotriene D₄; Th0, naïve T cell; Th1, T helper cell type 1; Th2, T helper cell type 2; Th17, T helper 17 cell; TIMP, tissue inhibitor of metalloproteinases; VEGF, vascular endothelial growth factor.

FIG. 4: Molecole aventi un ruolo nella patogenesi degli aneurismi

È importante ricordare che gli AAA e, in generale, le malattie arteriose periferiche, si associano spesso con aterosclerosi sistemica e coronarica rendendo il paziente enormemente più a rischio per lo sviluppo di altre complicanze su base aterosclerotica.

RESTENOSI

La restenosi è definita come la formazione di una nuova placca dopo terapia chirurgica o endovascolare e ne rappresenta la prima causa di fallimento (14).

Si presenta come una risposta vascolare occlusiva a un trauma ed è caratterizzata dal restringimento del lume del vaso (14). In seguito all'induzione della lesione si osserva, infatti, un'eccessiva migrazione e proliferazione delle cellule muscolari lisce. Questi eventi determinano la deposizione di tessuto fibroso nell'intima e la formazione della ben nota iperplasia intinale (intimal hyperplasia, IH) (15). La prima evidenza di ispessimento intinale in sede anastomotica dopo impianto di una vena nella circolazione arteriosa risale a circa 90 anni fa: "a pochi giorni dall'operazione i punti lasciati in sede di anastomosi sono stati coperti da una sostanza luccicante simile in apparenza al normale endotelio". In seguito a questa osservazione sono state riportate numerose altre descrizioni di questo fenomeno e l'iperplasia intinale è oggi riconosciuta come la causa principale delle complicazioni trombotiche, che si verificano tra 2 e 24 mesi dopo un intervento vascolare (14).

L'iperplasia intinale, infatti, causa restenosi in circa:

- il 30-50% delle angioplastiche coronariche e dall'arteria femorale superficiale
- il 10-30% dei bypass coronarici in vena
- il 20% delle endoarterectomie carotidee
- il 20-50% delle angioplastiche transluminari di un'arteria periferica
- il 20-30% dei bypass femoro-distali in vena safena autologa
- il 40-50% dei bypass femoro-distali con un trapianto sintetico
- il 42-50% delle fistole artero-venose per dialisi. (14)

I meccanismi che conducono alla restenosi possono variare a seconda della tecnica usata per la ricostruzione arteriosa. In ogni caso, indipendentemente dalla metodica impiegata, si osserva sempre la presenza di una risposta a un evento lesivo a carico principalmente dell'endotelio di un vaso che riversa già in una condizione patologica (16).

La ricostruzione arteriosa è determinata da due principali tipi di danno. Nel primo gruppo ritroviamo il danno meccanico sul vaso nativo; questo include: dissezione dell'arteria, sutura, endarterectomia, trombectomia e angioplastica luminale. Nel secondo gruppo l'injury è, invece, associato all'impianto di strutture non arteriose come innesti

venosi autologhi, innesti sintetici e stent a contatto con il flusso ematico arterioso (16).

La lesione vascolare porta all'induzione di geni protettivi e riparativi che hanno come obiettivo quello di ristabilire il normale funzionamento dell'arteria prevenendone la rottura e mantenendone la pervietà. Nei casi più favorevoli, il processo di cicatrizzazione si stabilizza e il diametro è mantenuto in un range funzionale. In altre circostanze la crescita intimale e/o la costrizione dell'avventizia portano all'occlusione del lume e all'ischemia a valle (16).

Negli ultimi anni sono state condotte numerose ricerche per individuare le basi molecolari dell'iperplasia intimale al fine di identificare targets per gli interventi farmacologici per poter ridurre lo sviluppo della IH stessa. Sono stati, infatti, sviluppati diversi modelli animali per valutare l'azione di fattori antitrombotici e antiproliferativi ma tali agenti hanno mostrato nell'uomo poca efficacia. Anche se alcune soluzioni hanno avuto risultati promettenti, l'impatto dell'IH in tutti i campi della chirurgia vascolare resta ancora alto.

IPERPLASIA INTIMALE

L'iperplasia intimale viene definita come l'aumento del numero di cellule nell'intima accompagnato dall'aumento della sintesi delle componenti della matrice extracellulare. L'iperplasia intimale si verifica fisiologicamente nella chiusura dei dotti arteriosi dopo la nascita e durante l'involutione dell'utero. L'ispessimento dell'intima si osserva diffusamente, anche, nell'aorta umana con l'aumentare dell'età come risultato della migrazione delle VSMCs dalla media e dell'espansione della popolazione già esistente. In condizioni patologiche l'iperplasia intimale si verifica nelle arterie polmonari di soggetti con ipertensione o può essere indotta da cause iatrogene in seguito a lesione della superficie luminale delle arterie durante l'angioplastica transluminare percutanea (percutaneous transluminal angioplasty, PTA), allotrapianto di organo, e in vene usate come fistole artero-venose o come bypass. L'iperplasia intimale è, inoltre, una delle caratteristiche predominanti dell'aterosclerosi in cui si osserva l'espansione della popolazione di VSMCs. Questo avviene insieme o più probabilmente secondariamente all'infiltrazione di monociti, cellule T e di altri leucociti provenienti dal plasma. L'intima aterosclerotica quindi non è solo iperplastica, ma ha anche una composizione cellulare alterata rispetto all'intima nativa. La formazione di neointima si osserva anche in risposta a radiazioni e alla stimolazione elettrica (15).

PATOGENESI

Il processo di riparazione del danno si ritiene avvenga in cinque fasi, tra loro sovrapposte: aggregazione piastrinica/infiammazione, proliferazione nella media/migrazione dalla media all'intima e apoptosi, formazione/rimodellamento della matrice extracellulare e riparazione dell'endotelio.

FASE INFIAMMATORIA/AGGREGAZIONE PIASTRINICA

L'endotelio vascolare in condizioni fisiologiche svolge un ruolo nel mantenimento dell'omeostasi vascolare regolando l'adesione dei leucociti, l'adesione e l'attivazione delle piastrine e la trombosi. Per mantenere queste funzioni l'endotelio deve esprimere e rispondere a diverse sostanze biologiche che comprendono citochine, chemochine e molecole di adesione. Il danno meccanico al vaso risulta in un danno endoteliale che compromette il suo normale ruolo fisiologico e determina la propagazione di una serie di pathway infiammatori che inducono l'adesione leucocitaria, l'attivazione piastrinica, la proliferazione e migrazione delle VSMCs e la deposizione della matrice extracellulare (17).

L'evento precoce che segue il denudamento endoteliale è rappresentato dall'attivazione della coagulazione inseguito all'esposizione della matrice subendoteliale contenete numerose sostanze attivanti le piastrine incluse la trombina, l'adenosina di fosfato (ADP, adenosine diphosphate), il trombossano, il fattore attivante le piastrine (platelet activating factor, PAF), l'epinefrina, la serotonina e il collagene. La formazione di un aggregato piastrinico e l'induzione della cascata trombotica, che seguono l'adesione, l'attivazione e l'aggregazione piastrinica, sono di fondamentale importanza nel reclutamento delle cellule della risposta infiammatoria, nella formazione del trombo, nonché nella proliferazione delle VSMCs e nella contrazione vascolare grazie al rilascio di una serie di mediatori contenuti nei loro granuli α (17). Fuster et al. hanno postulato che la formazione del trombo, che si verifica nella parete vascolare nel sito di denudamento endoteliale, in seguito a PTA, sia parte del processo di restenosi che segue l'intervento (18). I trombi, infatti, inducono il rilascio di una serie di molecole pro-infiammatorie come citochine e fattori di crescita che includono: il PDGF, il TGF- β , la trombina, la proteina chemoattrattiva per i monociti-1 (Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) l'interleuchina-1 (IL-1), -6 (IL-6) e -8 (IL-8) e il TNF- α (18). Questi agenti sono responsabili dell'attivazione delle cellule endoteliali e dell'espressione di molecole

di adesione, che vengono indotte anche in seguito al denudamento endoteliale, tra cui troviamo:

- P-selectina è contenuta nei granuli α delle piastrine e nei corpi di Weibel- Palade delle cellule endoteliali e viene mobilizzata in membrana subito dopo lo stimolo,
- E-selectina viene trascritta e traslocata sulla membrana delle ECs in presenza di specifici stimoli come ad esempio TNF- α e IL-1,
- L-selectina è presente costitutivamente su cellule mieloidi e linfociti,
- VCAM-1 e
- ICAM-1 e -2 (molecole di adesione intracellulare-1 e -2, intracellular adhesion molecule-1 e -2) (17)

Tali molecole causano il reclutamento di leucociti e linfociti. Infatti, il reclutamento e l'infiltrazione si osservano nel sito in cui si è verificato il danneggiamento endoteliale, l'aggregazione piastrinica e la deposizione della fibrina. Studi in vivo hanno dimostrato la co-localizzazione dei leucociti e delle piastrine nel sito dell'emorragia nell'aterosclerosi, nella restenosi e nelle regioni lesionate dal danno da ischemia/riperfusion. L'interazione tra linfociti e piastrine appare di fondamentale importanza nella risposta infiammatoria (19).

È stato proposto da Diacovo et al. un modello di attacco e tras migrazione dei leucociti attraverso le piastrine. L'iniziale adesione e il rotolamento dei leucociti sulle piastrine sono, infatti, mediati dalla P-selectina e dalla glicoproteina (platelet glycoprotein, GP) Iba espressa sulle piastrine. Questo processo è seguito dall'adesione ferma mediata dalle chemochine che si pensa siano capaci di convertire l'interazione selectino-mediata a bassa affinità in una ad alta affinità promuovendo la migrazione dei leucociti attraverso le piastrine. Il fattore piastrinico-4 (platelet factor 4, PF4), la β - tromboglobulina (β -thromboglobulin, β TG), la RANTES (regulated upon activation, normal T-cell-expressed and presumably secreted, regolata dopo l'attivazione delle cellule T normali, espressa presumibilmente secreta), la proteina infiammatoria dei macrofagi- α (macrophage inflammatory protein, MIP- α) e il PDGF sono tutti costituenti dei granuli α delle piastrine che svolgono funzioni chemotattiche nei confronti di leucociti e cellule muscolari. Il meccanismo di diapedesi è, inoltre, dipendente dalle integrine (che appartengono alla classe delle molecole di adesione) tra cui troviamo Mac-1, che media l'interazione piastrine/leucociti attraverso il controrecettore conosciuto come molecola di adesione giunzionale-3 (junctional adhesion molecule-3, JAM-3), o avviene direttamente attraverso

legame con i recettori delle piastrine come GP Iba o attraverso un cross-link tra il fibrinogeno e il recettore GP IIb/IIIa (19).

I leucociti, una volta localizzati nella regione della lesione e attivati, sono responsabili della secrezione delle metalloproteinasi, fattori di crescita, mediatori dell'infiammazione e fattori tissutali. Questi agenti potenzialmente giocano un ruolo nella restenosi causando infiammazione, danno endoteliale diretto, promuovendo la migrazione e la proliferazione delle VSMCs, reclutando monociti mononucleati, stimolando l'attivazione e l'aggregazione piastrinica e iniziando il pathway di coagulazione estrinseco (18). In passato si riteneva che i monociti fossero il tipo cellulare maggiormente coinvolto nella restenosi e nell'aterosclerosi. Studi più recenti hanno, invece, dimostrato che numerosi neutrofili sono presenti nella media precocemente (poche ore) in seguito al denudamento endoteliale e che la riduzione di questo reclutamento inibisce l'iperplasia (19, 20).

L'attivazione dei neutrofili causa il rilascio di specie reattive dell'ossigeno e di proteasi, eventi che amplificano la risposta infiammatoria. I neutrofili giocano un ruolo causale nello sviluppo di iperplasia intimale soprattutto secondario ad angioplastica, come precedentemente era stato dimostrato essere fatto dai monociti dopo il danno cronico associato all'impianto di stent. Un numero crescente di evidenze sperimentali suggerisce, quindi, che la risposta infiammatoria abbia un ruolo chiave nel processo di restenosi, fornendo una relazione tra il danno vascolare precoce, l'eventuale proliferazione delle VSMCs e l'alterazione del lume vascolare. In particolare è stato dimostrato che la stimolazione sistemica aspecifica del sistema immunitario innato, contemporanea al danno vascolare, facilita la formazione neointimale e che condizioni associate con un aumento dell'infiammazione possono aumentare la restenosi. Inoltre, l'inattivazione sistemica e la deplezione di monociti e macrofagi ad opera di un inibitore degli stessi riduce l'iperplasia intimale (20).

I principali fattori rilasciati durante l'infiammazione e che svolgono anche un ruolo fondamentale nelle fasi successive sono:

- PDGF (fattore di crescita dei fibroblasti). Il PDGF è un potente stimolatore dell'iperplasia intimale, come è stato dimostrato in modelli animali in cui il PDGF stimola la proliferazione delle VSMCs nella neointima dopo dilatazione da pallone. Il PDGF induce, inoltre, la migrazione delle cellule muscolari lisce attraverso l'attivazione di una serie di pathway (18). In ratto l'impiego di anticorpi neutralizzanti la sua azione porta soltanto l'inibizione dell'accumulo nell'intima delle VSMCs e non va ad alterarne la proliferazione (21). La

produzione di trombina da parte delle piastrine attivate può aumentare il rilascio di tale fattore portando una progressione della restenosi a seguito della proliferazione e migrazione delle cellule muscolari lisce. È stato dimostrato che la balloon injury in ratto risulta in una modificazione dell'espressione del recettore per il PDGF e del suo stato di fosforilazione in cui la fosforilazione della subunità beta è associata con l'attivazione della fosfatidil inositolo-3 chinasi (PI-3 kinase, phosphatidil inositol-3 kinase) (21).

- TGF- β (fattore- β di crescita trasformante). Il TGF- β derivante dalle piastrine stimola la sintesi di matrice extracellulare nelle VSMCs, determina la produzione di nuovo DNA e induce l'espressione delle integrine αv e $\beta 3$ nelle cellule muscolari lisce, portando in questo modo a un aumento del tasso di migrazione. Il fattore di crescita trasformante- β è, inoltre, responsabile del reclutamento di monociti e neutrofili, dell'induzione del recettore urochinasico e di MAC-1 sulla superficie cellulare. L'up-regolazione di tali recettori è stata vista determinare, in presenza di uno stent, l'infiltrazione delle VSMCs e dei monociti, mediante legame con la vitronectina, nella maglia dello stent stesso (18). Basse concentrazioni di TGF- β sono responsabili dell'induzione del PDGF e del suo recettore nelle VSMCs. Il TGF- β è, infatti, capace di modulare l'azione stimolatrice del PDGF in vitro probabilmente modificando il citoscheletro delle cellule e la distribuzione di alcune integrine (21).

- FGF (fattore di crescita dei fibroblasti). È ampiamente espresso nelle cellule della parete dell'arteria ed è overespresso in seguito a danno da pallone. Il TGF- β sembra avere un ruolo nella proliferazione precoce delle VSMCs nella media, nella rigenerazione dell'endotelio, nella migrazione delle VSMCs e nel rimaneggiamento della matrice (21).

- IL-1 (interleuchina-1). L'interleuchina-1 è una citochina infiammatoria prodotta principalmente dai macrofagi attivati che funziona come fattore di crescita per molti tipi cellulari inclusi i fibroblasti, i linfociti e le cellule muscolari. L'interleuchina-1 attiva anche i linfociti B e T che è stato dimostrato essere implicati nello sviluppo dell'iperplasia intimale. L'IL-1 up-regola, infatti, la sintesi dell'IL-6 e dell'IL-8 che sono implicate nella mediazione della risposta infiammatoria dopo lesione dell'arteria. L'IL-1 induce, inoltre, sulle ECs l'espressione di molecole di adesione come l'E-selectina. Libby et al. hanno proposto un modello secondo il quale l'IL-1 prodotta dai macrofagi sarebbe responsabile dell'induzione, nelle VSMCs, della produzione di altre citochine e fattori di crescita

che porterebbero alla formazione di un loop autocrino e paracrino positivo che si automanterrebbe determinando la progressione della lesione (19).

- IGF-1 (insuline like growth factor-1, fattore di crescita insulino-simile-1). L'IGF è un mitogeno delle cellule muscolari e svolge la sua funzione attraverso uno specifico recettore di membrana. Motani et al. hanno osservato che l'IGF-1 è capace di determinare un aumento dell'aggregazione piastrinica inducendo il rilascio da parte delle piastrine stesse di fattori potenzialmente dannosi. In realtà, in ratto, l'IGF non sembra essere il mitogeno principale, la sua inibizione, infatti, non varia significativamente l'ispessimento intimale (21).

- MCP-1 (monocyte chemoattractant protein). È una chemochina indotta dal PDGF e secreta dalle piastrine attivate che regola la chemotassi dei monociti e macrofagi. L'espressione di MCP-1 è aumentata nelle VSMCs e nelle ECs dopo balloon injury. Alti livelli di questa molecola correlano con un aumento dell'attività dei monociti e con la percentuale di restenosi (18).

- TF (tissue factor, fattore tissutale). È una glicoproteina integrale di membrana trovata nella parete vascolare e nei monociti circolanti che lega il Fattore VII e VIIa e inizia la cascata della coagulazione. TF può essere indotto nei monociti dai fattori di crescita, dalle citochine infiammatorie e dalle endotossine. Il fattore tissutale può mediare l'adesione e la migrazione dei monociti e delle SMCs quando è legato al Fattore VIIa (18).

- Fattore attivante piastrinico (Platelet-activating factor, PAF). Il fattore piastrinico attivante è un potente mediatore che viene rapidamente sintetizzato dalle piastrine e dalle cellule endoteliali stimulate con trombina o da un danno ossidativo. Questo fattore si lega a un recettore sui neutrofili impedendone l'interazione con il fibrinogeno, con il Fattore X e con la β 2-integrina mediando l'adesione dei leucociti alla superficie endoteliale (18).

- RANTES. La RANTES è una chemochina secreta dalle piastrine attivate che agisce a livello endoteliale come segnale cellulo-associato per l'adesione dei monociti. Il trasferimento di RANTES dalle piastrine all'endotelio richiede la presenza di un'adesione transiente mediata dalla P-selectina (18).

- CD40L (CD40 ligand). È una proteina transmembrana della famiglia TNF, è contenuta nei granuli α delle piastrine da cui trasloca sulla superficie piastrinica dopo l'attivazione delle piastrine stesse. In seguito all'interazione delle piastrine con l'endotelio il CD40L induce

l'espressione di recettori per l'adesione (come E-selectina, VCAM-1 e ICAM-1), di fattori tissutali e del rilascio di chemochine (per esempio MCP-1, IL-6 e IL-8). Il danno endoteliale induce l'attivazione, l'aggregazione piastrinica e la formazione di un trombo ricco di piastrine che producono il CD40L e la sua forma solubile (solubile CD40 ligand, sCD40L) responsabile dell'inibizione della migrazione delle ECs, indotta dal VEGF, e l'angiogenesi. Questo processo risulta nell'arresto della re-endotelizzazione del vaso danneggiato e nell'aumento conseguente della restenosi (18).

FASE DI PROLIFERAZIONE NELLA MEDIA E MIGRAZIONE DALLA MEDIA ALL'INTIMA DELLE VSMCs

In risposta al danno vascolare le VSMCs mostrano una serie di cambiamenti che risultano nel processo di proliferazione e migrazione. Le cellule muscolari per poter far fronte a questi processi devono andare incontro a una modulazione fenotipica che porta la conversione del fenotipo contrattile, caratterizzato dalla presenza di specifiche proteine del citoscheletro quali β -actina, vinculina e desmina (17) e da un tasso di proliferazione $<0.1\%$ (14), a un fenotipo sintetico con tasso di proliferazione del 10% (14). Questo stato attivato è caratterizzato da cambiamenti di affinità delle integrine per i componenti della matrice, dall'espressione di molecole di adesione come ICAM-1 e VCAM-1, dalla produzione di numerose citochine e fattori di crescita che includono IL-1, MCP-1 FGF, TGF, TNF- α e VEGF, alla morte cellulare programmata, e alla conversione in uno stato differenziato. Tali variazioni fenotipiche risultano nella produzione di mediatori che agiscono in maniera paracrina andando ad attivare nuove VSMCs, facilitando la chemotassi e l'infiltrazione dei leucociti nella parete del vaso, up-regolando molecole di espressione sulle cellule endoteliali e stimolando la produzione di componenti della matrice come collagene, elastina, acido ialuronico e proteoglicani e diminuendo la sintesi di altri come la laminina. Le VSMCs attivate sono caratterizzate da cambiamenti nella morfologia, con diminuzione dei miofilamenti del citoscheletro, riduzione delle proteine contrattili come l' α -actina e nell'aumento degli organelli sintetici come il Golgi o il reticolo endoplasmico ruvido. Le cellule una volta attivate migrano nell'intima. L'ambiente pro-infiammatorio presente in tale tonaca consente il mantenimento dell'attivazione e promuove la continua produzione di citochine, fattori di crescita e componenti della matrice che contribuiscono alla formazione della neointima. L'attivazione e lo switch fenotipico delle VSMCs sono,

comunque, reversibili, poichè è stato dimostrato in modelli animali una reversione a fenotipo contrattile (17).

L'inizio della fase proliferativa si osserva entro le 24 ore successive all'aggregazione piastrinica sotto l'influenza di diversi mediatori inclusi lo stress ossidativo, i segnali derivanti dall'endotelio danneggiato, i fattori di crescita rilasciati da piastrine e leucociti, l'interazione tra le VSMCs e le ECs e tra le VSMCs e la matrice extracellulare (ECM, extracellular matrix) (17, 15). Dopo ballon-injury, si osserva, l'up-regolazione delle due citochine pro-infiammatorie, IL-1 e TNF- α , che determinano la proliferazione delle cellule muscolari attraverso l'induzione del PDGF nelle cellule endoteliali. Il meccanismo esatto che regola la proliferazione delle VSMCs non è ancora del tutto chiaro ma comprende regolazioni complesse a diversi livelli del ciclo cellulare (17).

Il ciclo cellulare è un insieme di steps finemente regolati che controllano la sintesi del DNA e la mitosi (FIG. 8). Le cellule muscolari sono mantenute in uno stato non proliferativo (G0), tuttavia in seguito a una lesione entrano nella fase G1 dove vengono assemblati gli elementi necessari per consentire l'ingresso nella fase S di replicazione del DNA. Le VSMCs, successivamente, passano nella fase G2 in cui vengono sintetizzate le proteine mitotiche. Regolatori del ciclo cellulare disposti lungo tutto il ciclo assicurano una progressione ordinata (17). Esistono differenti regolatori del ciclo cellulare che comprendono le cicline (cicline A-H), le chinasi ciclino dipendenti (cyclin dependent kinase, CDKs) e gli inibitori delle chinasi ciclino dipendenti (cyclin dependent kinase inhibitor, CDKIs) come p21, p27 e p57 (17). Le cicline e le chinasi ciclino dipendenti sono dei regolatori positivi del ciclo cellulare mentre le CDKIs sono regolatori negativi. La regolazione avviene anche a livello dello stato di fosforilazione del complesso ciclina-CDK e a livello della trascrizione delle cicline. L'accumulo dei complessi ciclina D-CDK4 e ciclina E-CDK2 coordina la replicazione del DNA regolando la transizione dalla fase G1 alla S; la successiva transizione G2-M è regolata, invece, dai complessi ciclina A-CDK2 e ciclina B-CDK1 (22).

Il ciclo cellulare è, inoltre, modulato da fattori trascrizionali che transattivano le CDKs e le CDKIs. Segnali antimitogenici attivano p53, che induce l'espressione di p21 che conseguentemente porta a un arresto nella fase G1 inibendo l'attività dei complessi ciclino-CDK della fase G1 (22). Al contrario, la famiglia di fattori trascrizionali E2F controlla l'espressione dei geni nella fase S. In condizioni

quiescenti, E2F è presente in associazione con la proteina del retinoblastoma (RB, retinoblastoma protein) che lo mantiene in condizioni inattive. In seguito a segnali mitogenici i complessi ciclina D-CDK4 e ciclina E-CDK2 iperfosforilano RB portando la liberazione di E2F, il quale attiva a sua volta la trascrizione di geni come quelli codificanti per la ciclina E, A e CDK1. Oltre a p53 e E2F nelle cellule muscolari sono presenti altri due fattori trascrizionali regolatori del ciclo cellulare: GAX e la proteina legante GATA-6 (GATA-6, GATA binding protein 6). Dove GAX è un fattore trascrizionale, espresso in cellule quiescenti, che regola il differenziamento cellulare, la proliferazione e la migrazione, mentre GATA-6 è un fattore trascrizionale impegnato nell'espressione di geni tessuto-specifici. Entrambe stimolano la sintesi di p21 e portano un arresto del ciclo cellulare (22).

Il processo di proliferazione risulta, quindi, da uno squilibrio tra i fattori di crescita e le molecole inibitrici quali l'ossido nitrico e l'eparansolfato, normalmente prodotti dalle cellule endoteliali, che vengono a mancare in seguito all'induzione della lesione (22).

La risposta al danno è sempre accompagnata dalla deplezione cellulare per apoptosi, ovvero per morte programmata. Le cellule endoteliali, i leucociti e le cellule muscolari subiscono processi di apoptosi che esitano in differenti effetti. Le VSMCs, in presenza a un'injury, in parte muoiono e in parte iniziano a proliferare. L'apoptosi delle cellule muscolari della media si verifica nei trenta minuti successivi l'induzione della lesione nella carotide del ratto e nell'arteria iliaca nel coniglio. Nel modello di balloon-injury nel ratto il 14 % delle VSMCs muoiono 24 ore dopo l'intervento chirurgico. Non si conosce ancora se l'apoptosi svolga un'azione protettiva o dannosa. Subito dopo il danno l'apoptosi può essere protettiva poiché compensa la proliferazione che, senza controllo, porterebbe alla formazione di una neointima eccessiva e conseguentemente all'occlusione del vaso. Tuttavia, nelle fasi avanzate della risposta vascolare, la liberazione dei corpi apoptotici potrebbe indurre stress ossidativo alle cellule circostanti e determinare, quindi, il richiamo di ulteriori macrofagi per poter eliminare le cellule danneggiate. L'aumento dei macrofagi potrebbe causare l'up-regolazione delle metalloproteinasi che, mediante la degradazione delle componenti della matrice, potrebbe diminuire il livello di collagene. La regolazione del processo apoptotico si ritiene sia a carico dei macrofagi che potrebbero agire promuovendo l'interazione del CD95 (Fas), localizzato sulle cellule muscolari, con il Fas-ligand (Fas-L)

espresso sui macrofagi attivati oppure potrebbe esser dipendente dalla produzione di TNF- α (17). In contrasto con le cellule della media le cellule della neointima sono relativamente resistenti alla morte indotta da balloon injury (21). Tale resistenza è associata alla up-regolazione del mediatore antiapoptotico bcl-xL nelle cellule vascolari muscolari della neointima (21).

Dopo il danno vascolare le VSMCs dedifferenziate acquistano la motilità ed esprimono un set di molecole di adesione modificato. Le integrine delle VSMCs vanno incontro a modificazioni conformazionali che ne alterano l'affinità per i recettori. Nelle arterie non danneggiate, invece, le integrine- β 1 sono presenti in uno stato attivo e questo contribuisce al mantenimento del fenotipo contrattile. Dopo il danno, l'espressione delle integrine- β 1 attive diminuisce permettendo un aumento della proliferazione e della migrazione (17). Dopo l'injury si osserva, inoltre, la produzione dell'attivatore tissutale del plasminogeno (tissutal plasminogen activator, tPA) e dell'attivatore urochinasico del plasminogeno (urokinase plasminogen activator, uPA) che inducono la degradazione delle componenti della matrice mediante attivazione delle metalloproteinasi e delle serin- e cistein-proteasi (15, 14). Gli attivatori del plasminogeno sono resi operanti, oltre che dalla lesione, anche da una serie di fattori tra cui troviamo l'FGF, il PDGF e il TGF- β . L'eparansolfato tende, invece, a diminuire l'attivazione del plasminogeno, la sua sintesi, però, è down-regolata dopo la perdita locale delle cellule endoteliali (14).

La relazione tra le componenti della matrice extracellulare e il citoscheletro risulta, quindi, essere alterata e questa alterazione sembra essere responsabile della migrazione delle cellule muscolari dalla media all'intima. Oltre al rimodellamento della matrice e allo switch fenotipico accompagnato dalla riorganizzazione del citoscheletro (modulato da pathway delle protein chinasi attivate dai mitogeni (MAPK, mitogen activated protein kinase) e dalla famiglia delle piccole GTPasi) è necessaria anche la perdita di contatto tra le cellule perché si verifichi migrazione in risposta a stimoli chemotattici (15). La migrazione inizia nel quarto giorno dopo il danno e prosegue fino a un mese dall'evento (14).

PROLIFERAZIONE NELL'INTIMA-RIMODELLAMENTO DELLA MATRICE

L'espansione dell'intima probabilmente si verifica come risultato della continua proliferazione e migrazione delle VSMCs e della produzione di matrice extracellulare. I processi di aumento del volume della matrice e di accumulo di cellule muscolari sembrano essere

strettamente correlati tra loro. Si osserva, infatti, la presenza di un rapporto costante tra questi due parametri (14).

La matrice extracellulare svolge un ruolo di scaffold della parete vascolare ed è sintetizzata prevalentemente dalle cellule muscolari. La matrice rappresenta l'80% della neointima mentre il rimanente 20% è costituito da VSMCs. La produzione di ECM è regolata principalmente da TGF- α e PDGF. Il TGF- α è responsabile dell'induzione della sintesi della fibronectina, del collagene fibrillare, dell'elastina, della trombospondina e dei proteoglicani che vengono up-regolati dopo la lesione. I macrofagi presenti nella parete del vaso influenzano la composizione della matrice e la migrazione delle VSMCs attraverso la produzione delle MMPs e di citochine pro-infiammatorie come l'IL-1 e il TNF- α che a loro volta aumentano la produzione di MMPs. Le metalloproteinasi svolgono un ruolo importante nel rimodellamento della matrice, nel rimodellamento geometrico del vaso e favoriscono la migrazione delle cellule muscolari, infatti, la somministrazione di inibitori non specifici di tali proteasi portano una riduzione della migrazione delle VSMCs e conseguentemente della formazione della neointima (17).

RIMODELLAMENTO VASCOLARE

Esistono due diversi tipi di rimodellamento vascolare: il rimodellamento positivo (anche detto espansivo) e quello negativo (anche detto costrittivo) (FIG. 9). Il rimodellamento positivo porta l'allargamento del lume del vaso mentre quello negativo è associato al restringimento del vaso ed è la principale causa di restenosi quando non è presente lo stent per porre resistenza alla costrizione. La restenosi è, generalmente, il risultato dell'azione concomitante del rimodellamento negativo e dello sviluppo dell'iperplasia intimale.

Il rimodellamento positivo previene lo sviluppo di una stenosi limitando il flusso sanguigno mantenendo pervio il lume del vaso. Il rimodellamento espansivo risulta dalla tendenza fisiologica della parete del vaso di compensare lo shear stress e la tensione di parete (23). Tale rimodellamento richiede l'azione delle metalloproteinasi poiché prevede il rilascio della costrizione imposta dalla matrice extracellulare. In particolare è stata osservata l'up-regolazione delle MMP-2 e -9 durante il rimodellamento positivo delle arterie coronarie in uomo (24, 25). Di grande importanza, nei processi di rimodellamento e ispessimento dell'intima, è l'azione del NO.

In vivo in un modello di balloon injury in coniglio sono state evidenziate le tappe del rimodellamento vascolare che seguono l'induzione di una lesione. Dieci minuti dopo la balloon injury l'area

totale del vaso appare significativamente aumentata rispetto alla carotide controlaterale. Durante le due settimane dopo la dilatazione si osserva una riduzione dell'area totale del vaso, dieci settimane dopo il danno sia l'area neointimale che l'area totale del vaso aumentano senza un'ulteriore variazione del lume (26).

METALLOPROTEINASI DI MATRICE

Le MMP sono una famiglia multigenica di enzimi (endopeptidasi zinco e calcio dipendenti) che digeriscono selettivamente i diversi componenti della matrice extracellulare (25, 27). La loro funzione è stata studiata sia in condizioni fisiologiche che patologiche. Le metalloproteinasi sono, infatti, mediatori del normale rimodellamento della matrice durante lo sviluppo, la morfogenesi dei tessuti, l'involutione uterina, la riparazione del danno e l'angiogenesi. Sono, però, coinvolte in numerosi stati patologici quali cancro, disseminazione metastatica, fibrosi, artrite, aterosclerosi e nell'accumulo di matrice nelle malattie del collagene in cui si osserva, a differenza degli altri stati patologici prima descritti, una diminuzione della espressione delle MMPs. In particolar modo nel sistema vascolare, in condizioni normali, svolgono un ruolo importante nella conservazione dell'integrità del vaso mantenendo un equilibrio tra la matrice sintetizzata e quella degradata; in condizioni patologiche sono, invece, responsabili del rimodellamento della matrice e della formazione dell'iperplasia intimale permettendo la migrazione delle cellule muscolari dalla media all'intima. Le MMPs contribuiscono, inoltre, all'evoluzione della placca aterosclerotica verso la rottura partecipando alla degradazione del cappuccio fibroso (28).

Dal punto di vista strutturale tutte le MMPs presentano una sequenza N-terminale segnale anche detta "pre"-dominio, un peptide "pro" dominio che viene rimosso durante l'attivazione contenete il motivo PRCGXPD e un dominio catalitico conservato in cui troviamo il sito legante lo zinco (Zn) HEXGHXXGXXH altamente conservato tra le proteine di questa famiglia (27, 28). Ad eccezione delle matrilisine tutte le MMPs contengono un dominio simile a quello dell'emopessina e della vitronectina e una regione "ponte" che collega il dominio catalitico a quello emopessina simile. Molte metalloproteinasi sono secrete sotto forma di zimogeno (precursore inattivo) che viene attivato proteoliticamente nello spazio extracellulare con eccezione delle MMP-11 e MT1-MMP che vengono attivate prima della secrezione attraverso una proteasi simile alla furina associata al Golgi (28).

Le MMP sono convenzionalmente classificate sulla base del substrato in: “collagenasi”, “gelatinasi”, “stromielinasi”, “metalloproteinasi di membrana (MT-MMP)” e “altre metalloproteinasi” (27, 28).

- collagenasi (MMP-1, MMP-8, MMP-13 MMP-18): MMP-1 o collagenasi-1 ha origine dai fibroblasti, anche se è ugualmente sintetizzata e secreta da cellule endoteliali, monociti, macrofagi e condrociti in seguito a stimolazione da parte di fattori di crescita e citochine. MMP-8, detta anche collagenasi 2 o collagenasi leucocitaria, è sintetizzata specificatamente dai leucociti ed è presente in maniera costitutiva nei granuli dei neutrofili. La MMP-13 o collagenasi 3 è prodotta soprattutto nei processi tumorali (25). Tali collagenasi sono deputate alla degradazione del collagene I/II/VII/X, della gelatina, degli aggregati e della tenascina (29). La caratteristica chiave di queste MMPs è rappresentata dal clivaggio del collagene interstiziale ai tre-quarti dalla regione N-terminale (27).

- gelatinasi (MMP-2, MMP-9): la gelatinasi A o MMP-2 è ampiamente distribuita ed è sintetizzata da molte cellule, in particolare fibroblasti, cheratinociti, condrociti, cellule endoteliali, monociti e osteoblasti. La gelatinasi B o MMP-9 è espressa principalmente da cheratinociti, monociti e macrofagi alveolari (25). La MMP-2 e la MMP-9 sono deputate alla degradazione di gelatina, elastina, fibronectina, collagene I/IV/V/VII/X/XI, laminina, aggregati e vitronectina (29). Mutazioni della MMP-2 nell'uomo, che risultano nella assenza di enzima attivo, sono associate alla forma autosomica recessiva dell'osteolisi multicentrica (27).

- stromelisine (MMP-3, MMP-10, MMP-11): la loro struttura è simile a quella delle gelatinasi. La MMP-3 o stromielisina-1 e la MMP-10 o stromielisina-2 processano gli stessi substrati quali: proteoglicani, laminina, fibronectina, gelatina, collagene III/IV/V/IX/X/XI, fibrina/fibrinogeno, tenascina e vitronectina anche se la MMP-3 presenta una efficienza maggiore della MMP-10 (27, 29). La MMP-11 o stromielisina-3 processa, invece, laminina, fibronectina e aggregati (29).

- tipo membrana (MT-MMP): MMP-14, -15, -16, -17, -24 e -25. Quattro sono proteine transmembrana di tipo I (MMP-14, MMP-15, MMP-16 e MMP-24) e due sono proteine con un'ancora glicosilfosfatidilinositolo (GPI) (MMP-17 e MMP-25) (27). La MMP-14, chiamata anche MT1-MMP è implicata soprattutto nell'attivazione di pro-MMP-2 e si concentra sulla superficie delle cellule, ma facilita anche il processo di migrazione cellulare. Le MMP-14, -15 (MT2-

MMP), -16(MT3-MMP) e -24 (MT5-MMP) presentano come substrato la gelatina, la fibronectina, la vitronectina, il collagene e gli aggregati. L'MMP-17 (MT4-MMP) e la MMP-23 processano la gelatina; la MMP-17 (MT6-MMP), infine, digerisce gelatina, collagene IV, fibrina e fibronectina (29).

- matrilisine (MMP-7 e MMP-26): sono in grado di idrolizzare un gran numero di substrati come fibronectina, laminina, caseina e gelatina (29).

- altre: (MMP -12, -19, -20, -22, -23 e -28). Comprende le sette MMPs che non rientrano nelle precedenti categorie. La metalloelastasi macrofagica (MMP-12) è espressa principalmente nei macrofagi ed è essenziale per la loro migrazione (27). I suoi substrati preferenziali sono l'elastina, la fibronectina, la fibrina/fibrinogeno, la laminina e i proteoglicani (29). La MMP-23 è espressa principalmente nei tessuti riproduttivi (27).

Le MMPs sono, responsabili, oltre che della degradazione delle componenti della matrice, anche del processamento di altri substrati che regolano alcuni importanti processi cellulari.

1) **PROLIFERAZIONE CELLULARE:** l'azione delle MMPs facilita l'interazione dei fattori di crescita con i rispettivi recettori di membrana attraverso tre distinte modalità:

- degradazione delle proteine della matrice associate a GFs. Molti fattori di crescita come FGF e TGF- β hanno un'alta affinità per alcuni componenti della matrice conseguentemente la proteolisi di queste molecole risulta in una solubilizzazione dei fattori associati. Ad esempio il taglio dei perlecani ad opera delle MMP-1 e -3 può indurre il rilascio di FGF (29).

- Degradazione di proteine non della matrice associate con fattori di crescita. Molti GF non appartenenti alla matrice vengono sintetizzati come proteine transmembrana e vengono convertiti nella forma solubile da proteasi. Ad esempio il fattore di crescita epidermico legante l'eparina è un substrato per la MMP-3 (29).

- Attivazione diretta dei fattori di crescita. I GF possono essere, infine, processati direttamente dalle MMPs. L'MMP-9 e -2 clivano TGF- β portando alla formazione del ligando attivo. MMP-2, -9 e -3 sono, inoltre responsabili del processamento dell'IL-1 β (29).

2) **APOPTOSI.** La membrana basale contiene dei segnali per la sopravvivenza cellulare e la perdita di questi segnali porta a una particolare forma di apoptosi detta anoikisi. L'apoptosi può essere indotta, oltre che dalla perdita dell'interazione della matrice, anche dalla proteolisi del Fas ligand, che è stato riscontrato essere substrato

delle MMPs, portando alla liberazione della sua forma solubile che sembra essere importante nell'induzione dell'apoptosi (29).

3) **MIGRAZIONE CELLULARE.** Come precedentemente detto la migrazione è un processo complesso che richiede la regolazione delle interazioni cellula-cellula e cellula-matrice e il rimodellamento della matrice stessa. Conseguentemente la proteolisi della matrice può modulare l'adesione cellula-matrice sia attraverso la rimozione dei siti di adesione sia attraverso l'esposizione dei siti di legame. Ad esempio la degradazione della laminina-5 da parte della MMP-2 induce la migrazione dei cheratinociti, mentre l'azione della MT1-MMP è responsabile della migrazione di differenti tipi cellulari. Le MMPs possono anche modulare tale processo clivando direttamente i recettori cellula-cellula e cellula-matrice. Per esempio la $\beta 4$ integrina è degradata dalla MMP-7. È stata, inoltre, dimostrata la rimozione della E-caderina MMP-mediata. Il clivaggio della E-caderina da parte delle MMP-3 e -7 non solo distrugge la giunzione aderente ma determina anche il rilascio di un frammento dominante negativo che stimola in vitro la migrazione e l'invasione. Oltre ad attuare alterazioni delle componenti della matrice le MMPs inducono la regolazione della migrazione attraverso la liberazione di molecole con azione chemotattica (come ad esempio il VEGF che viene rilasciato grazie alla MMP-9) o attraverso la loro inattivazione (la MMP-2 inattiva l'MCP-3) (29).

4) **INTERAZIONE CELLULA-CELLULA.** Le interazioni cellula-cellula sono responsabili della regolazione di differenti processi cellulari quali la migrazione, la proliferazione e la sopravvivenza. Tra le diverse proteine implicate nelle interazioni cellula-cellula sembrano svolgere un ruolo importante le caderine. Le caderine partecipano alle giunzioni aderenti e prendono contatto la β -catenina a livello citoplasmatico, ne regolano la localizzazione e conseguentemente controllano l'attivazione del pathway Wnt. La MMP-9 sembra essere responsabile in parte della degradazione delle caderine e conseguentemente del rilascio della β -catenina dopo danno vascolare. La perdita dell'interazione cellula-cellula e la traslocazione nel nucleo della β -catenina inducono la proliferazione delle VSMCs sia in vivo che in vitro inducendo la trascrizione di geni specifici (30). La regolazione delle MMPs avviene a tre livelli:

- **regolazione trascrizionale:** l'induzione della trascrizione viene attuata per opera di citochine infiammatorie (IL-1, IL-6), fattori di crescita (PDGF), ormoni (corticosteroidi) e promotori dello sviluppo

tumorale (TNF- α). TGF- β , IL-10 e eparina, invece, ne diminuiscono la sintesi (31).

- Regolazione a livello dell'attivazione del pro-enzima: viene mediata dalla furina, da altre metalloproteinasi per lo più MT-MMPs (come ad esempio la pro MMP-2) o da agenti non proteolitici tra i quali uPA, gli inibitori del plasminogeno, le specie reattive dell'ossigeno (prodotte dalle cellule della risposta immune attivate) e la plasmina (31).

- Regolazione dell'attività proteolitica da parte degli inibitori endogeni delle metalloproteinasi (TIMP, tissutal inhibitor of metalloproteinase): i TIMP si legano al sito legante lo zinco delle MMPs attive in rapporto molecolare 1:1. La famiglia TIMP è costituita da quattro membri strutturalmente correlati TIMP-1, -2, -3 e -4 che mostrano una identità del 30-40% a livello della struttura amminoacidica possiedono 12 cisteine conservate. TIMP-1, -2 e -4 sono secrete in forma solubile mentre TIMP-3 è associato con la matrice. Esiste, quindi, un fine equilibrio tra le MMPs e i TIMPs e nel momento in cui questo equilibrio viene perso si osserva la comparsa di condizioni patologiche (31).

Come precedentemente accennato, le MMP rivestono un ruolo importante nel processo di sviluppo dell'iperplasia intima. In modelli sperimentali di roditori, in seguito a balloon injury, è stato osservato, infatti, un aumento del livello di espressione della MMP-9 e un aumento dell'attività enzimatica della MMP-2. Recentemente è stato dimostrato, in topi Knock-Out per il gene MMP-9, che la MMP-9 è fondamentale per la migrazione delle VSMCs, per la formazione della neointima e per il rimodellamento negativo dell'arteria. Come la MMP-9 regoli l'entrata delle VSMC nel ciclo cellulare non è chiaro: potrebbe rilasciare citochine e fattori di crescita, come VEGF, TGF- β , TNF- α e, soprattutto, FGF. Inoltre, la MMP-1 e il suo inibitore, TIMP-1, sono maggiormente presenti nelle lesioni restenotiche, rispetto alle arterie normali (28).

L'assenza della MMP-2 induce la riduzione della iperplasia intima nei topi a due e quattro settimane rispetto ai wild-type, le arterie prelevate dagli animali KO mostrano, inoltre, una riduzione della migrazione delle VSMCs. La delezione della MMP-3 non sembra, invece, causare alcuna variazione nel livello di IH. Questi studi suggeriscono un ruolo delle gelatinasi nella migrazione delle cellule muscolari e nell'iperplasia intima in topo (28).

Come già accennato, i mediatori solubili e le cellule coinvolte nell'infiammazione contribuiscono a stimolare la complessa serie di

eventi che modulano la proliferazione cellulare e la produzione di matrice extracellulare. Un ruolo chiave è svolto dai monociti attivati. È stato dimostrato che l'interleuchina-10 (IL-10), che è un potente inattivatore dei monociti, inibisce l'iperplasia intimale dopo l'angioplastica o l'impianto di stent in conigli ipercolesterolemici. L'IL-10 protegge dall'iperplasia intimale inibendo le molecole di adesione cellulare, l'MCP-1, il fattore tissutale, il fibronogeno, il fattore di stimolazione delle colonie di linfociti T, granulociti e macrofagi e la proliferazione delle VSMCs (32). Inoltre l'IL-10 aumenta i livelli di TIMP-1 e diminuisce l'attività di MMP-9 nei macrofagi, mediante un meccanismo che coinvolge l'attivazione dell'eme ossigenasi-1 (HO-1) e del monossido di carbonio (CO), supportando così la relazione tra risposta infiammatoria, MMP, HO-1 e CO (33).

ALTRE PROTEINASI

Un ruolo importante nello sviluppo della restenosi lo assume, anche, il sistema di attivazione della plasmina. Negli ultimi anni sono stati, infatti, condotti numerosi studi in topi Knok-Out per l'attivatore tissutale e urochinasico del plasminogeno, per l'inibitore dell'attivatore del plasminogeno (plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1), per il recettore urochinasico (urokinase receptor, uPAR) e per il plasminogeno stesso. La delezione dell'uPA e del plasminogeno induce la riduzione della formazione della neointima, mentre l'assenza dei PAI ne stimola lo sviluppo. La distruzione genica dell'uPAR non altera, invece, la produzione della neointima dopo induzione del danno vascolare. Questi risultati suggeriscono che la produzione di plasmina mediata da uPA, anche se il legame dell'attivatore urochinasico del plasminogeno al recettore non è essenziale, è in parte responsabile della formazione della neointima e, che, l'inibizione di questo pathway può inibire tale processo (28).

Cheng XW. e colleghi hanno dimostrato, in un modello in ratto di balloon injury, che è presente un up-regolazione nell'intima delle catepsine S e K. Tale osservazione è in accordo con precedenti studi sull'aterogenesi e angiogenesi in cui è stata proposta la partecipazione di queste due catepsine nell'evoluzione di tali processi. Le catepsine sono, infatti, espresse nelle arterie umane aterosclerotiche sia da macrofagi che da VSMCs presenti nella media e sono responsabili della forte attività elastolitica e collagenolitica riscontrata nelle placche. Recentemente è stata dimostrata una colocalizzazione delle catepsine S e K con le cellule endoteliali del lume e dei microvasi dell'ateroma e con le ECs dei microvasi della cute lesionata di topo.

Infine, i topi KO per la catepsina S e per il recettore delle LDL sviluppano una lesione aterosclerotica inferiore a quella presente nei topi wild-type con una riduzione del contenuto di macrofagi. In conclusione anche le catepsine S e K sembrano giocare un ruolo nella patogenesi dell'aterosclerosi e della restenosi (28).

RI-ENDOTELIZZAZIONE

Gli stimoli determinanti la proliferazione e la migrazione delle cellule muscolari non sono ancora stati del tutto definiti, tuttavia le molecole rilasciate dalle cellule endoteliali sembrano essere di fondamentale importanza nella modulazione di questi processi. La ricrescita dell'endotelio sembra, infatti, diminuire la proliferazione intimale di VSMC. Se la zona danneggiata ha un'estensione maggiore di 3 cm la ripopolazione endoteliale dai margini della lesione non raggiunge mai la parte centrale del segmento leso. In questa area priva di cellule endoteliali, le VSMC continuano a proliferare (34). Il meccanismo attraverso cui le cellule endoteliali inibiscono l'ispessimento intimale non è noto. Le cellule endoteliali potrebbero formare una barriera all'influsso di fattori di crescita (GF, growth factor), provenienti da siero e piastrine, e rilasciare inibitori della proliferazione delle VSMC. Le cellule endoteliali, inoltre, secernono ossido nitrico ed eparansolfato, entrambi inibitori in vitro della crescita delle cellule muscolari lisce. Tuttavia le cellule endoteliali, in seguito a ripetuti danni meccanici, perdono la capacità di produrre NO e più in generale la proprietà di inibire le VSMCs dando origine a una superficie non funzionale. In due settimane le cellule muscolari lisce con fenotipo sintetico presenti cominciano a riassumere il fenotipo contrattile (16). È presente, comunque, una variabilità fenotipica tra le differenti popolazioni cellulari di VSMCs che ne rispecchia la diversa localizzazione. Le cellule muscolari lisce vicine alla superficie de-endotelializzata hanno un indice di proliferazione 50 volte superiore rispetto a quelle vicine alla superficie ri-endotelializzata, infatti, le cellule continuano a proliferare in assenza di endotelio. I GF espressi maggiormente in questa regione comprendono PDGF, IGF-1, TGF- β e il recettore dell'angiotensina II. In particolar modo gli ultimi due sono i due mediatori responsabili della proliferazione delle VSMCs (16). Contemporaneamente vengono anche liberati fattori, come l'interferone- γ secreto dai linfociti T, che ne possono inibire la replicazione (21).

TERAPIA

TERAPIA CHIRURGICA

Attualmente il trattamento chirurgico dei pazienti con aterosclerosi avviene attraverso tre possibili modalità: l'endoarterectomia, l'angioplastica con o senza posizionamento di stent e il bypass.

ENDOARTERECTOMIA

L'endoarterectomia può essere definita come la rimozione chirurgica della placca dall'arteria attraverso un processo invasivo e rappresenta il trattamento standard nel caso di lesioni localizzate nella carotide.

La rimozione della placca è associata all'assottigliamento della parete del vaso e all'esposizione della media al flusso. In alcuni casi la parete viene ricostituita attraverso l'impiego di patch.

L'endoarterectomia presenta alcuni svantaggi, infatti, un'alta mortalità e morbidità in quanto viene impiegata un'anestesia totale seguita dall'incisione del collo che è correlata con il rischio di danneggiamento dei nervi craniali e cutanei (40, 41). Tale tecnica può, inoltre, determinare l'insorgenza dell'ictus e della restenosi (42, 43). I rischi sono particolarmente elevati nel caso di pazienti con stenosi carotidee severe e sintomatiche (40).

In ogni caso studi randomizzati come il North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial (NASCET), lo European Carotid Surgery Trial (ECST) e l'Asymptomatic Carotid Atherosclerosis Study (ACAS), hanno dimostrato la superiorità dell'endoarterectomia carotidea rispetto alla terapia medica per i pazienti con lesioni severe, sia sintomatiche che asintomatiche, che comportino una diminuzione del flusso a valle (42, 43).

ANGIOPLASTICA E POSIZIONAMENTO DELLO STENT

L'angioplastica è una procedura endovascolare caratterizzata da una bassa invasività. Durante l'angioplastica si verifica l'inserimento di un catetere attraverso la cute (percutaneo) nel sistema arterioso. Il catetere presenta sulla punta un piccolo pallone che viene gonfiato una volta raggiunta la regione interessata dalla stenosi. Tale operazione ha come scopo quello di stirare le pareti del vaso ristabilendone il normale diametro. In alcuni casi, dopo la rimozione del catetere, viene posizionato nell'arteria un particolare dispositivo, lo stent, che ha come scopo quello di prevenire il ritorno elastico (40).

L'angioplastica viene impiegata, prevalentemente, nel caso di lesione alle coronarie anche se recentemente, in differenti trial clinici, è stata

dimostrata la sicurezza dell'utilizzo di tale tecnica anche nel caso di placche localizzate nelle carotidi di pazienti ad alto rischio e in presenza di cofattori che ne possono aumentare la mortalità (41). Rispetto all'endoarterectomia presenta alcuni vantaggi come la velocità dell'intervento e il basso costo anche se è associata a una maggiore incidenza della formazione di emboli (40) che rappresentano la maggiore causa di complicazioni perioperative (41).

Un possibile approccio per diminuire tali rischi è l'impiego di particolari device che possono essere raggruppati in tre differenti categorie:

- Balloon occlusion: lavora occludendo completamente il vaso distalmente alla stenosi. Il pallone viene gonfiato prima dell'angioplastica o dello stenting e determina un blocco transiente del flusso del sangue durante la procedura. I microemboli che si formano durante l'intervento vengono trattenuti nella regione distale del vaso dal pallone e vengono, successivamente, aspirati con un catetere prima della rimozione del pallone. In alcuni pazienti l'assenza del flusso del sangue non è ben tollerato e conseguentemente l'operazione deve essere condotta rapidamente.
- Protezione mediante filtro: impiega un filtro di 80-110 µm che viene inserito nell'arteria e aperto prima dell'intervento permettendo il mantenimento del flusso del sangue. Alla fine del processo il filtro contenente i detriti viene rimosso.
- Catetere occludente: viene inserito prima dell'operazione e blocca il passaggio dei frammenti attraverso la creazione di una depressione.

Tali strumenti consentono una riduzione degli eventi negativi associati all'angioplastica (41). Anche nel caso della chirurgia endovascolare si verifica la restenosi. La restenosi è dovuta principalmente al rimodellamento negativo, nel caso dell'angioplastica, e all'iperplasia intimale, nel caso dello stenting (44).

Negli ultimi anni sono stati, inoltre, condotti numerosi trial sull'impiego dei drug eluting stent (DE) in cui si osserva un'azione combinata tra il trattamento chirurgico e farmacologico a livello locale.

BYPASS

Il bypass viene ampiamente utilizzato nei paesi occidentali nella chirurgia cardiaca e consiste nel posizionamento di un'arteria (arteria mammaria o gastropoplitea), di una vena (vena safena) o di innesti artificiali che hanno come scopo quello di ristabilire il flusso

sanguigno collegando la porzione distale e prossimale del vaso occluso escludendo la lesione.

La vena safena mostra sia vantaggi che svantaggi, infatti, subisce un processo di arterializzazione in risposta alle forze emodinamiche, tuttavia si deteriora nel tempo e l'occlusione raggiunge il 50% a dieci anni dall'intervento (45).

L'uso dell'arteria mammaria interna e dell'arteria gastroepiploica presentano numerosi vantaggi tra cui una velocità di progressione della lesione inferiore rispetto a quella della vena safena (46). In ogni caso questo tipo di intervento si presenta come un palliativo a causa del rapido sviluppo dell'aterosclerosi nell'impianto e una progressione della malattia nel vaso nativo (47).

TERAPIA FARMACOLOGICA

Il trattamento farmacologico dei pazienti con malattie vascolari può essere attuato su differenti fronti vista la molteplicità dei fattori coinvolti nello sviluppo di tali patologie. I farmaci che possono essere impiegati possono essere raggruppati in: agenti che abbassano i livelli lipidici, inibitori dell'enzima che converte l'angiotensina (ACE, angiotensin converting enzyme) e bloccanti dei recettori per l'angiotensina (ARB, Angiotensin-receptor blockers), anticoagulanti e fattori che inibiscono le piastrine, antiossidanti, beta-bloccanti (BB, beta blockers), bloccanti dei canali del calcio e corticosteroidi.

AGENTI CHE ABBASSANO IL LIVELLO DEI LIPIDI

Tra gli agenti che determinano la diminuzione del livello dei lipidi ritroviamo le statine e i fibrati.

- **STATINE.** Le statine o inibitori della 3-idrossil-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA, 3-hydroxyl-3-methylglutaryl coenzyme A) riducono oltre a determinare un abbassamento dei livelli sierici di LDL mostrano anche una serie di effetti pleiotropici che contribuiscono alla protezione del sistema cardio-vascolare (48). Sono responsabili, infatti, della regolazione della trombosi, della protezione dell'endotelio, della down-regolazione della proliferazione delle VSMCs, della diminuzione degli agenti ossidanti e della modulazione dell'infiammazione (48, 49, 50, 51, 52). L'ampio range di effetti è da attribuire al blocco della HMG-CoA che è necessaria per la sintesi dell'acido mevalonico, substrato della produzione del colesterolo e precursore degli isoprenoidi e di altri metaboliti impegnati in diversi pathway cellulari (47).

Le statine bloccano la trombosi diminuendo la liberazione del fattore tissutale e down-regolando l'aggregazione piastrinica. Il fattore tissutale, infatti, attiva i fattori IX e X dando inizio alla cascata della coagulazione e portando la formazione della trombina. Differenti trial clinici hanno dimostrato che l'azione antitrombotica può essere indipendente dalla diminuzione delle LDL.

A livello delle piastrine si osserva un'alterazione della fluidità delle membrane associata alla diminuzione del colesterolo che ne inibisce l'aggregazione (48).

L'azione protettiva sull'endotelio viene, invece, esplicata attraverso una down-regolazione delle LDL, in particolare delle LDL-ossidate, con conseguente stabilizzazione della produzione dell'NO mediante la preservazione dell'attività dell'NOS endoteliale (eNOS, endothelial nitric oxide synthase) e il recupero del trasporto dell'arginina (47, 49).

Walter e colleghi hanno, inoltre, riportato l'azione ri-endotelizzante di alcune statine in seguito a balloon injury (48).

Attraverso la diminuzione delle LDL ossidate si assiste, oltre all'aumento dell'NO libero, anche a una down-regolazione delle molecole di adesione sulla superficie delle ECs con conseguente riduzione dell'adesione e diapedesi delle cellule della risposta infiammatoria, come monociti/macrofagi, e una diminuzione della formazione di cellule schiumose (48). L'immunomodulazione viene, anche, attuata per mezzo dell'inibizione diretta dell'espressione del IFN- γ , dipendente dal complesso maggiore di istocompatibilità II (MHC II, major histocompatibility complex II), e dell'attivazione dei linfociti T con uno spostamento della risposta immunitaria da Th1 a Th2 (50).

Le statine promuovono, inoltre, la stabilità della placca attraverso l'inibizione delle cellule muscolari (48), un aumento della loro apoptosi (51) e la diminuzione dei livelli del CD40/CD40L e CD40 solubile che sono normalmente associati con un'evoluzione negativa della placca (52).

Infine, è stato dimostrato un ruolo di questi inibitori nella riduzione della restenosi post-angioplastica nel REGRESS (REgression GRowth Evaluation Statin Study) (50).

- FIBRATI. I fibrati mimano la struttura degli acidi grassi e sono capaci di legare la famiglia dei fattori trascrizionali PPARs (peroxisome activated-proliferator receptor). I PPARs sono localizzati nel citoplasma in forma inattiva, dopo legame con il ligando traslocano nel nucleo dove dimerizzano con il recettore dell'acido retinoico promuovendo la trascrizione o la repressione di una serie di geni espressi principalmente in fegato, reni, cuore e muscoli e che prendono parte al metabolismo lipidico. In particolar modo i fibrati modulano geni chiave di tale pathway attraverso attivazione del PPAR α determinando l'up-regolazione delle HDL, la diminuzione delle lipoproteine ricche di acidi grassi e spostando il fenotipo delle LDL verso quelle dense che subiscono l'up-take recettoriale con maggiore facilità.

Anche i fibrati mostrano una serie di effetti pleiotropici attraverso l'inibizione dell'NF- κ B, un fattore chiave della risposta infiammatoria, che determina la down-regolazione di IL-1, IL-2 e la ciclossigenasi (COX-2, cicloxigenase), e mediante una riduzione del fibrinogeno e dell'aggregazione piastrinica (53).

INIBITORI DELL'ENZIMA CHE CONVERTE L'ANGIOTENSINA E BLOCCANTI DEI RECETTORI DELL'ANGIOTENSINA.

Studi recenti hanno dimostrato un ruolo diretto dell'angiotensina (ATII, angiotensin II) nelle patologie vascolari. L'ipertensione, infatti, causa un'alterazione delle forze emodinamiche che agiscono sulla parete vascolare e una variazione della produzione di superossido che è una nota molecola pro-infiammatoria. In modelli animali è stato dimostrato che l'inibizione del sistema renina-angiotensina, attraverso sia gli ACE inibitori che i bloccanti dei recettori dell'angiotensina di tipo 1 (AT1, angiotensin receptor type-1), previene lo sviluppo dell'aterosclerosi (54). Infatti, sia in uomo che in ratto la restenosi è associata all'aumento dei livelli di ACE. Conseguentemente l'inibizione di tale enzima può consentire una riduzione della iperplasia.

Allo stesso modo il blocco selettivo del recettore AT1 può essere protettivo in quanto risulta nell'arresto della proliferazione delle VSMCs, della sintesi delle componenti della matrice, dell'infiammazione e della liberazione di ROS e, contemporaneamente, permette di mantenere gli effetti positivi legati all'attivazione del recettore AT2 da parte dell'ATII (44).

ANTICOAGULANTI E ANTIAGGREGANTI

Numerosi sono gli antiaggreganti e gli anticoagulanti impiegati nella terapia dell'aterosclerosi. La loro capacità di prevenire la restenosi è, invece, ridotta.

- **EPARINA E EPARINA A BASSO PESO MOLECOLARE.** L'eparina è un mucopolisaccaride che lega l'antitrombina potenziandone l'effetto inibitore sulla trombina e sul fattore Xa. Un'importante limitazione dell'impiego di questa molecola è rappresentato dal legame aspecifico alle proteine del plasma. L'eparina a basso peso molecolare è, invece, dotata di una maggiore specificità di legame (55).

- **INIBITORI DIRETTI DELLA TROMBINA.** Includono l'irudina e la lepiuridina che legano direttamente la trombina inibendone l'azione. Attualmente questi farmaci sono utilizzati nella terapia di pazienti in cui l'eparina causa l'insorgenza di trombocitopenia immuno mediata (55).

- **ASPIRINA.** L'aspirina è uno degli inibitori delle piastrine più utilizzato. L'aspirina blocca irreversibilmente l'interazione tra la COX-1 e la prostaglandina H sintetasi-1 (PGHS-1, prostaglandin H synthase-1) sopprimendo la sintesi del trombossano A2 (tromboxane

A2, TXA2). L'attivazione delle piastrine risulta nel rilascio dell'acido arachidonico che viene impiegato per la produzione del trombossano G2 usato per sintetizzare il trombossano H2 (reazioni catalizzate da PGHS-1). Il trombossano H2 viene convertito in TXA2 dalla trombossano sintetase e, quindi, liberato. Il TXA2 è responsabile del rilascio di calcio intracellulare e dell'attivazione della fosfolipasi C (PLC, phospholipase C) che a sua volta regola il rilascio dell'acido arachidonico. L'effetto inattivante dell'aspirina sulle piastrine è a lungo termine in quanto queste cellule non possono sintetizzare nuove proteine.

Sono stati postulati altri possibili meccanismi di azione dell'aspirina come l'aumento della produzione dell'NO, la protezione delle LDL e del fibrinogeno dall'ossidazione, la diminuzione dell'infiammazione e la preservazione della funzionalità endoteliale (57).

L'effetto protettivo dell'aspirina è stato dimostrato sia negli eventi vascolari primari che secondari pur essendo un debole inibitore della funzione piastrinica (56).

- **DIPIRIDAMOLE.** Ha sia un effetto antiaggregante che vasodilatatore. Agisce inibendo la nucleotid fosfodiesterasi e l'uptake dell'adenosina, impedendo l'azione dell'adenilato ciclasi. In associazione all'aspirina è stato visto essere efficace nella prevenzione secondaria di pazienti con TIA o stroke (56).

- **INIBITORI DEL RECETTORE IIb/IIIa DELLE PIASTRINE.** L'attivazione delle piastrine determina variazioni conformazionali del recettore IIb/IIIa che ne causano un aumento della sua affinità per il fibrinogeno e altre proteine. Il legame con il fibrinogeno induce una serie di modificazioni nelle piastrine che portano a una stabilizzazione del coagulo. Proprio a causa del suo ruolo determinante tale recettore diventa un possibile target farmacologico per prevenire la formazione di trombi. Esistono tre differenti inibitori della glicoproteina IIb/IIIa: frammenti di anticorpi monoclonali, peptidi basati sul motivo riconosciuto da questa molecola e peptici mimetici (56).

- **BLOCCANTI DEI RECETTORI PER L'ADP.** L'ADP svolge un ruolo importante nella stimolazione delle piastrine che viene attuata attraverso il legame dell'ADP stesso ai recettori purinici P2Y1, P2Y12 e P2X1 (purinoreceptor). In particolare P2Y12 amplifica la risposta piastrinica all'ADP. La ticopidine e il topidogrel, due bloccanti dei recettori dell'ADP, vengono metabolizzati a livello del citocromo P450 portando alla liberazione di due composti attivi che interagiscono con P2Y12 prevenendo l'attivazione piastrinica (56).

ANTIOSSIDANTI

Un sempre maggior numero di evidenze sostiene il ruolo delle ROS e dello stress ossidativo nello sviluppo della disfunzione vascolare. Gli antiossidanti si presentano, quindi, come un possibile approccio terapeutico. Oltre alle statine e agli ACE inibitori, che è stato visto precedentemente avere come effetto pleiotropico la diminuzione delle ROS, di particolare rilievo sono anche le proteine antiossidanti. Numerosi antiossidanti come acido ascorbico, l' α -tocoferolo, il glutathione e l'N-acetilcisteina hanno mostrato, sia in vivo che in vitro, una capacità di preservare la funzione endoteliale e la produzione di NO. Studi epidemiologici hanno, inoltre, evidenziato che individui che assumono alti livelli di antiossidanti hanno ridotti rischi cardiovascolari. Trial clinici condotti sull'effetto della vitamina E hanno, però, mostrato risultati contrastanti (58).

BETA-BLOCCANTI

L'impiego dei β -bloccanti è associato a una riduzione del rischio di restenosi anche se il meccanismo che si trova alla base non è del tutto chiaro. Tali molecole si sono mostrate efficaci nel trattamento di pazienti con ipertensione, angina stabile e instabile e fallimento cardiaco congestizio. I BB presentano un'azione antiaggregante e riducono la produzione di TXA₂; down-regolando l'attività cardiaca modulano, inoltre, lo shear stress e prevenendo il rimodellamento dei vasi (59).

BLOCCANTI DEI CANALI DEL CALCIO

I bloccanti dei canali del calcio presentano un'azione protettiva nei confronti delle patologie vascolari grazie alla loro capacità di arrestare la proliferazione cellulare e l'aggregazione piastrinica, attraverso l'inattivazione dei canali del calcio di tipo L. L'NF- κ B, responsabile della trascrizione di numerosi geni come molecole di adesione, enzimi per il rimodellamento della matrice e citochine è Ca²⁺ sensibile. Il blocco dei canali del calcio ne causa, quindi, l'inattivazione (60).

CORTICOSTEROIDI

I corticosteroidi sono dei potenti antinfiammatori che esercitano un effetto inibitorio sulla funzione piastrinica, sulla proliferazione delle VSMCs e sulla produzione del collagene. Il trattamento con il dexametasone previene l'attivazione dei leucociti e regola la loro velocità di rotolamento. Attualmente gli steroidi vengono impiegati solo per brevi trattamenti su gruppi di pazienti selezionati (61).

MATERIALI E METODI

RACCOLTA DEI CAMPIONI EMATICI

Il sangue dei pazienti viene prelevato poco prima dell'intervento dal medico anestesista di sala in cinque B.D.Vacutainer® sterili così suddivise.

- ❑ 3 provette contenenti buffer citrato. (tappo azzurro).
- ❑ 1 provetta contenente EDTA. (tappo viola).
- ❑ 1 provetta contenente Polistirene per l'induzione della cascata coagulativa e la conseguente separazione del siero. (tappo giallo).



Ciascun prelievo viene poi sottoposto a centrifugazione in funzione della destinazione del sangue contenuto nella provetta.

Prelievo di plasma e siero

I campioni vengono centrifugati per quindici minuti a 3000 rpm ed il surnatante aspirato e stoccato in

provette da 2ml per ulteriori analisi.

Stesso processo subisce il prelievo destinato alla separazione del siero. I campioni in buffer citrato vengono centrifugati a 1500 rpm per preservare l'integrità della componente cellulare ematica, il surnatante separato e la rimanente parte corpuscolata destinata all'estrazione dei PBMCs.

Separazione e prelievo dei PBMCs

L'estrazione dei monociti viene effettuata mediante separazione in gradiente con Ficoll.

Il precipitato contenente la porzione corpuscolata viene addizionato ad un ugual volume di PBS per ripristinare i precedenti rapporti plasma/cellule.

Il sangue unito a PBS viene quindi stratificato su un volume di Ficoll pari ad 1/3 di quello del sangue.

La separazione così ottenuta viene posta in centrifuga a rotore swing-out per 30 minuti senza freno.

Si ottiene così una netta separazione di fasi che sono, partendo dal basso:

- ❑ Eritrociti + Polimorfonucleati
- ❑ Ficoll
- ❑ Anello di monociti
- ❑ PBS

Dopo aver accuratamente prelevato l'anello composto da monociti, esso viene diluito e lavato in PBS unitamente ad una soluzione di lisi per gli eritrociti che viene lasciata agire per 5 minuti.

Dopo 15 minuti di centrifugazione a 1500 rpm, il pellet può o essere ulteriormente lavato ripetendo il passaggio precedente, oppure risospeso in PBS per la conta e la valutazione della vitalità.

Un'aliquota di 3µl di sospensione cellulare viene addizionata ad egual volume di Trypan Blue, la soluzione risultante viene iniettata in una camera di Burker per il conteggio delle cellule vive. La resa di questa metodica si attesta mediamente su valori compresi tra il 60 ed il 90 % del valore atteso dai dati ematochimici del paziente.

Dopo questo passaggio la sospensione cellulare rimasta viene ulteriormente lavata con PBS e, prelevato il surnatante, risospesa in 2 ml di soluzione contenente FBS con DMSO al 20%.

A questo punto i PBMCs sono pronti per il congelamento e lo stoccaggio in azoto liquido.

RACCOLTA CAMPIONI TISSUTALI

Qualora non si tratti di interventi di chirurgia endovascolare cioè posizionamento di stent ed endoprotesi aortiche, unitamente ai prelievi ematici sono stati raccolti campioni tissutali di placca, sia carotidea che aneurismatica.

Questi campioni vengono raccolti per un duplice scopo: indagini immunoistochimiche o morfologiche ed analisi molecolari che richiedono un'ottimale conservazione degli acidi nucleici.

Per questo all'operatore di sala vengono fornite provette sterili contenenti RNeasy® allo scopo di preservare l'integrità del campione e la sua sterilità.

Dopo almeno 24 ore di incubazione a +4°C, necessari alla totale imbibizione del campione, i tessuti possono essere asciugati sotto cappa a flusso laminare e stoccati a -80°C in attesa di processamento (FIG. 5).

Qualora il campione venisse invece indirizzato verso la sola indagine immunoistochimica viene invece conservato in etanolo al 70% e poi al 90% per poi essere incluso in paraffina e seriato (FIG. 5).

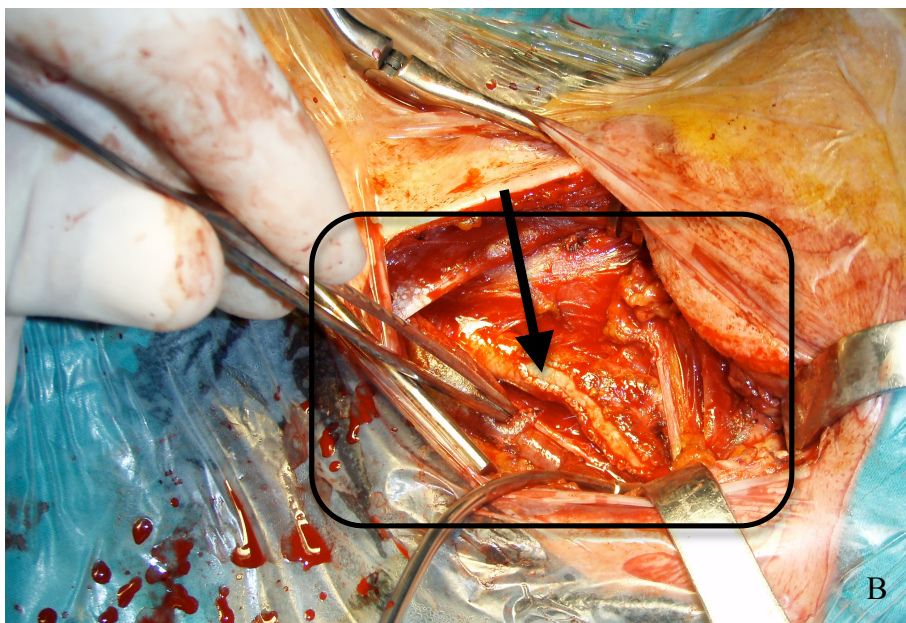
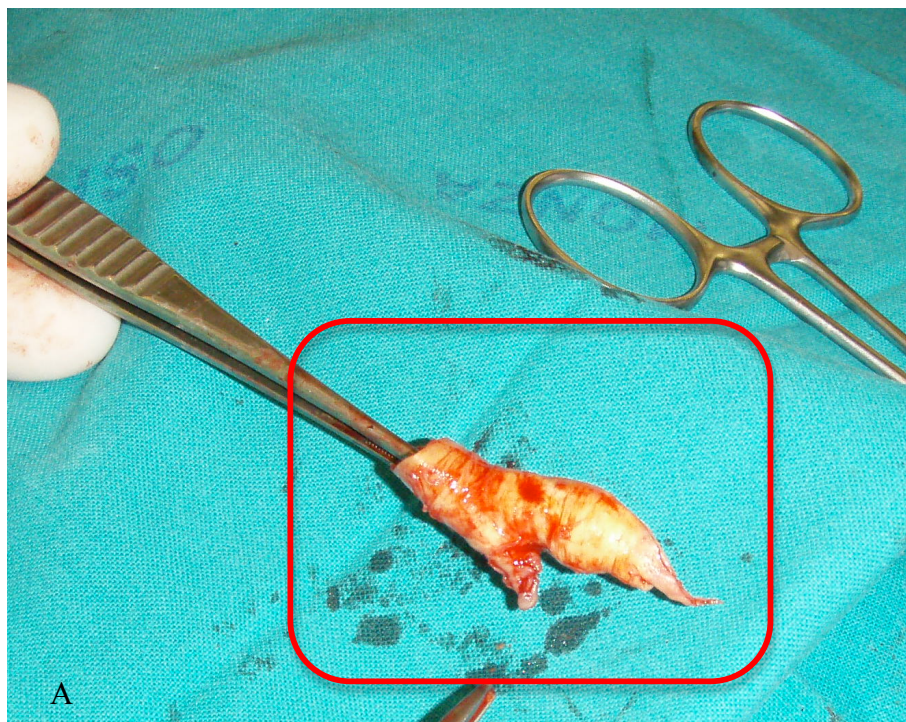


FIG.ura 5: Immagini di intervento di transendoarterectomia (T.E.A).

A: Placca carotidea rimossa interamente a seguito dell'intervento (riquadro rosso)

B: Conclusione dell'intervento con "patch" di pericardio suino inserito nella carotide esterna.

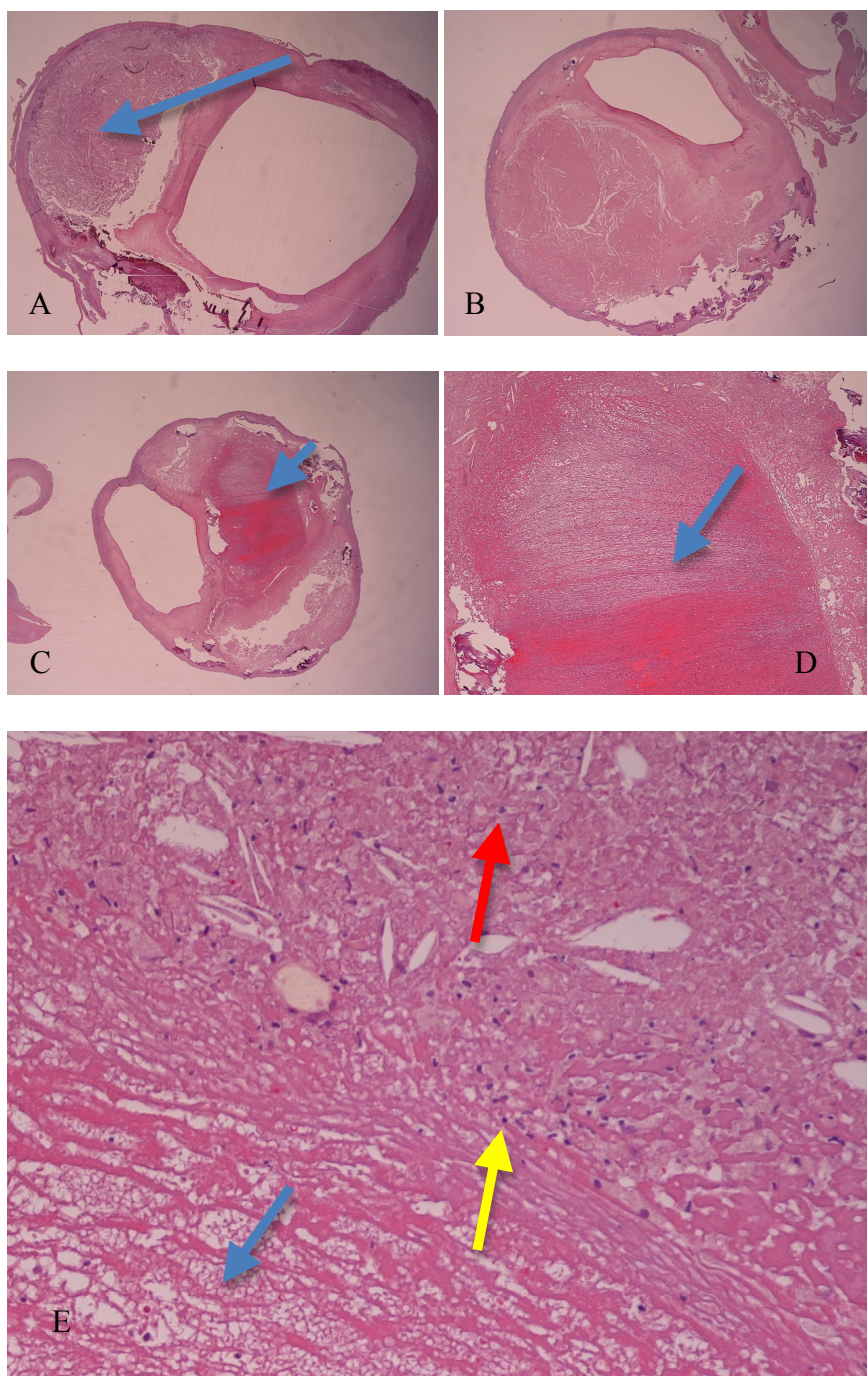


FIG.ura 6 Immagini colorate con ematossilina eosina di placca carotidea.

A,B,C,D: Sezioni successive della placca riportata in FIG.ura 51.A

E: In questo ingrandimento sono evidenziati nuclei di cellule muscolari lisce (freccia rossa) e di infiltrati mono e linfocitari (freccia gialla). È inoltre evidenziato (freccia azzurra) il tessuto fibroso che compone in gran parte la placca ateromasica.

RACCOLTA DATI CLINICI ED EMATOCHIMICI DEI PAZIENTI

Ciascun soggetto arruolato nello studio è ovviamente un paziente in cura presso il reparto di chirurgia vascolare, disponiamo per tanto della sua anamnesi e della sua storia clinica recente nonché del follow-up successivo all'intervento.

Disponiamo per ciò dei dati necessari a compilare un database clinico utile a classificare e selezionare i candidati per gli studi effettuati in collaborazione tra il nostro laboratorio di Medicina Molecolare e il reparto di Chirurgia Vascolare.

I dati presi in esame per la classificazione sono i seguenti:

Anagrafica

- ☐ Nome e Cognome, trasformato poi in codice numerico per esigenze di privacy
- ☐ Data di nascita
- ☐ Data intervento
- ☐ Età
- ☐ Sesso
- ☐ Tipo d'intervento
- ☐ Tipo e quantità di campione disponibile

Ematochimica:

- ☐ WBC
- ☐ RBC
- ☐ Conteggio piastrinico
- ☐ Emoglobina totale
- ☐ Creatininemia
- ☐ Trigliceridi
- ☐ Glicemia
- ☐ Colesterolemia totale
- ☐ HDL
- ☐ LDL

Fattori di rischio:

- ☐ Ipertensione arteriosa: principale patologia predisponente all'insorgenza di patologie vascolari.
- ☐ Dislipidemia: disturbi nel metabolismo dei grassi
- ☐ Tabagismo.
- ☐ Diabete mellito: patologia predisponente all'insorgenza di patologie vascolari.

Associazione con comorbidità:

- ❑ CAD (coronary artery disease): è l'espressione dell'aterosclerosi a livello cardiaco; la limitazione del flusso coronarico a livello delle stenosi aterosclerotiche provoca l'insufficienza coronarica, cioè un disequilibrio tra la domanda e l'apporto di sangue ossigenato al muscolo cardiaco fino a provocarne l'infarto.
- ❑ PAD o PVD (peripheral artery/vascular disease): è una forma di patologia arteriosa ostruttiva che coinvolge generalmente porzioni distali di arti inferiori e superiori può essere provocata da aterosclerosi, da processi infiammatori che esitano in stenosi vascolari e dalla formazione di emboli o trombi.
- ❑ COPD (chronic obstructive pulmonary disease): è una patologia ostruttiva cronica e solo parzialmente reversibile a carico delle vie aeree. È causata da un'infiammazione cronica e a lento decorso delle vie aeree e del parenchima polmonare.
- ❑ Per i pazienti affetti da stenosi carotidea è stato riportato anche il valore di GSM: cioè la mediana della scala dei grigi. Il GSM è un indice computerizzato dell'ecogenicità della placca, che grazie alla normalizzazione dell'immagine consente di avere una misurazione indipendente dall'operatore e dall'ecografo utilizzato. Il nostro gruppo ha dimostrato che le placche carotidee ecolucenti con basso GSM sono associate a un aumentato rischio di ictus durante stenting carotideo: placche con $GSM < 25$ hanno un rischio 7 volte maggiore di avere ictus rispetto a quelle con $GSM > 25$. Le placche ecolucenti hanno inoltre un aumentato rischio di ictus in studi di storia naturale (in pazienti trattati con la sola terapia medica), un aumentato rischio di eventi coronarici acuti, elevati indici infiammatori plasmatici (PCR e IL-6), una rapida progressione della stenosi carotidea.

DATABASE CLINICO

Le sopraelencate informazioni sono state raccolte prima in un file Excel provvisorio crittografato e poi in un file Excel o SPSS per le analisi statistiche di associazione.

ESTRAZIONE DEGLI ACIDI NUCLEICI

Estrazione dell'RNA

Dopo aver scongelato un'aliquota di PBMCs per paziente, il contenuto della cryovial viene immediatamente portato a 10 ml di volume in PBS per annullare gli effetti tossici del DMSO sulle cellule in sospensione.

Dopo 15 minuti a 1500 rpm le cellule così pellettate vengono separate dal surnatante e sono pronte per essere processate, tramite Qiagen RNeasy® Mini Kit.

Per ogni colonna la quantità massima di RNA eluibile corrisponde a 100µg che è abbondantemente superiore al limite di 10µg massimi ogni milione di cellule, un valore di 40µg di RNA è un valore più che soddisfacente e utile alle nostre analisi.

È molto importante essiccare accuratamente il pellet cellulare prima di procedere a qualunque ulteriore passaggio in quanto i buffer di lisi e di sospensione, nonché la resa del kit, sono molto sensibili ad eventuali residui di surnatante.

A questo punto occorre lisare le cellule aggiungendo 500 µl di Buffer RLT precedentemente addizionato a β-mercapto etanolo (β-ME) e pipettando più volte il pellet per omogenare il campione ed esporlo completamente al buffer di lisi.

Si aggiungono ora 500 µl di etanolo 70% all'omogenato lisato e si pipetta per miscelare le 2 soluzioni senza centrifugare.

A questo punto si procede ad aspirare e travasare il contenuto della provetta (circa 700 µl) compresi eventuali precipitati, nella colonna RNeasy mini che a suo volta occorre porre in una provetta da 2 ml che fungerà da raccoglitore dell'eluato.

Dopo aver centrifugato 15 secondi a 10000 rpm si getta l'eluato.

A questo punto si può procedere alla rimozione dei residui di DNA mediante trattamento con DNasi.

Dopo aver aggiunto 700 µl di buffer RW1 alla colonna si centrifuga per 15 secondi a 10000 rpm e si elimina l'eluato.

È opportuno ripetere questo passaggio e, per eliminare eventuali residui di etanolo dalla silice, centrifugare successivamente senza aggiunta di buffer e gettare l'eluato della colonna.

Al termine del processo di estrazione è sufficiente porre la colonnina in una nuova provetta da 2 ml, versarvi dai 30 ai 50 µl di acqua RNasi free e centrifugare a 10000 rpm per almeno 1 minuto.

A questo punto sarebbe possibile procedere ad una seconda eluizione qualora la quantità di RNA sia superiore ai 30 µg, questa è un'eventualità rara e che accade più spesso con lisati cellulari provenienti per esempio da biopsie epatiche. Inoltre una seconda eluizione porta ad una perdita dell'ordine del 15-30% che non è auspicabile viste le esigue quantità attese.

TRASCRITTOMICA

MICROARRAY

Per l'esperimento mediante microarray sono stati selezionati due pool di soggetti, uno costituito dai pazienti affetti da AAA (2 gruppi da 5+5 pazienti) ed uno dai controlli sani sempre suddiviso in 2 gruppi da 5+5 soggetti.

In totale dunque sono stati selezionati 4 gruppi da 5 soggetti ciascuno chiamati:

5 pazienti AAA = GRUPPO A

5 pazienti AAA = GRUPPO B

5 controlli = GRUPPO C

5 controlli = GRUPPO D

in tabella seguono i dati clinici dei soggetti selezionati nell'esperimento.

L'esperimento è stato eseguito seguendo la procedura del *Dye Swap* eseguendo due replicati di amplificazione invertendo i citocromi per normalizzare eventuali "preferenze" del fluoroforo nella reazione di polimerizzazione.

Parte 1

AAA POOL A marcato con Cy3 Vs POOL C marcato con Cy5

AAA POOL A marcato con Cy5 Vs POOL C marcato con Cy3

Dye Swap

Parte 2

AAA POOL B marcato con Cy3 Vs POOL D marcato con Cy5

AAA POOL B marcato con Cy5 Vs POOL D marcato con Cy3

	AAA pool A (N=5)	CTR pool C (N=5)	AAA pool B (N=5)	CTR pool D (N=5)
Età	67 (60-81)	65 (52-85)	68 (62-82)	66 (54-83)
Sesso (maschi) N (%)	5 (100)	5 (100)	3 (60)	3 (60)
Fumo N (%)	4 (80)	1 (20)	4 (80)	1 (20)
Diabete N (%)	1 (20)	0	0	0
ipertensione N (%)	3 (60)	1 (20)	3 (60)	1 (20)
Dislipidemia N (%)	4 (80)	1 (20)	3 (60)	0
CAD N (%)	1 (20)	0	0	0
CAS N (%)	1 (20)	0	0	0
POAD N (%)	1 (20)	0	0	0
COPD N (%)	3 (60)	0	3 (60)	0

AAA=abdominal aortic aneurysm patients;
 CTR=control subjects;
 CAD=coronary artery disease;
 CAS=carotid artery stenosis;
 POAD=peripheral obstructive artery disease;
 COPD=chronic obstructive pulmonary disease.

Gli array utilizzati sono rappresentativi di 14000 geni spotati sotto forma di 70mer e prodotti dalla Operon Technologies, CA, USA; serie Human AROS v1.1.

Per ogni microarray è stata eseguita una normalizzazione interna delle intensità relative, scartando i segnali deboli o anomali.

Le matrici di dati ottenute sono state normalizzate in ambiente R (<http://www.r-project.org>).

Le procedure di normalizzazione sono state eseguite tramite il pacchetto SMA Statistical Microarray Analysis package (<http://stat-www.berkeley.edu/users/terry/zarray/Software/smacode.html>)

I dati sono poi stati analizzati mediante l'algoritmo SAM "Significant Analysis of Microarray" ; il valore di delta selezionato è stato 0,8 che ha generato 91 geni differentemente espressi con un FDR (false discovery rate) del 2,2%.

Il dataset è disponibile all'indirizzo: <http://www.ebi.ac.uk/microarray-as/ae/browse.html> (E-MEXP-1346).

REAL-TIME PCR

Le analisi mediante real-time PCR eseguite sui 3 gruppi di 40 soggetti ciascuno sono state eseguite presso il laboratorio di medicina molecolare dell'Università degli Studi di Milano Bicocca in collaborazione con il laboratorio di Microbiologia della medesima università impiegando i campioni ematici provenienti dalla banca dati generata nei 3 anni di raccolta campioni effettuati grazie alla partecipazione dell'unità operativa di Scienze Chirurgiche del Prof. G.M. Biasi.

VALIDAZIONE DELL'ESTRATTO RIBONUCLEICO

La prima validazione dell'estratto è stata effettuata mediante spettrofotometria valutando ratio 260nm/280nm e quantità totale di estratto.

Abbiamo considerato accettabili valori di ratio compresi tra 1,6 e 2,2.

La rilevazione e la validazione dell'RNA estratto è stata effettuata mediante elettroforesi su gel di agarosio caricando 5 µl di estratto e acquisendo poi l'immagine al transilluminatore Biorad (FIG. 7).

La quantità minima che abbiamo stabilito di utilizzare nelle reazioni di amplificazione in real time è di 100ng RNA $\approx$ 20ng c-DNA (prodotto di retro trascrizione) con un rapporto m-RNA/RNA totale di circa il 20%.

Durante la reazione di retrotrascrizione, infatti, gli m-RNA non vengono amplificati numericamente ma solo convertiti in c-DNA grazie ad una DNA polimerasi che può amplificare solo a partire da templati di RNA a singolo filamento, da questo fatto e supposti sufficienti i nucleotidi forniti, la reazione di retrotrascrizione ci dovrebbe restituire un rapporto 1:1 tra m-RNA e c-DNA, passando così da un substrato altamente instabile ad uno stabile.

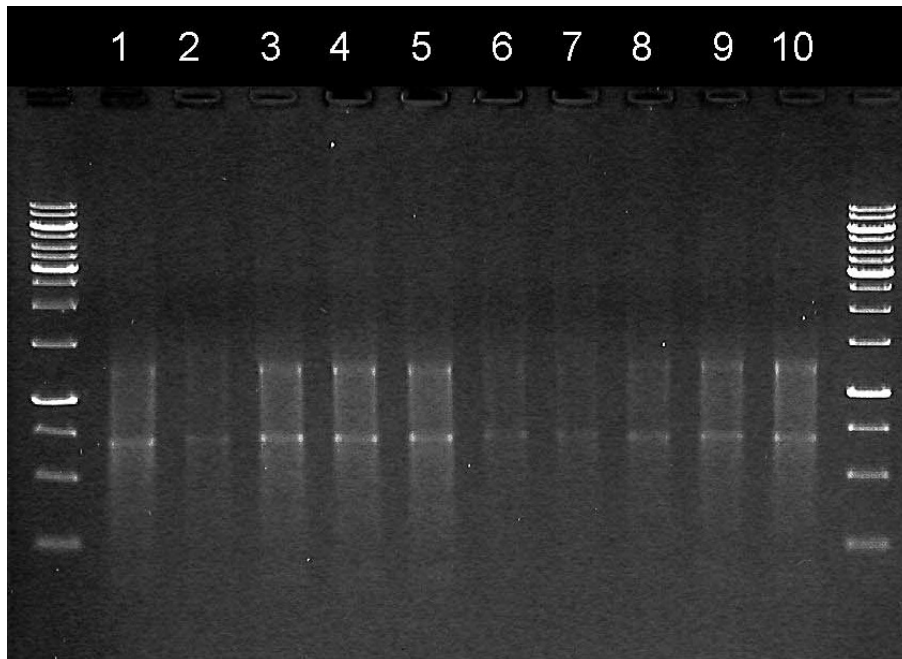


FIG. 7: RNA estratto da 10 campioni caricato addizionando 3 μ l di loading buffer a 3 μ l di RNA totale.

RETROTRASCRIZIONE DELL'RNA ESTRATTO PER REAL TIME PCR

La RT-PCR è stata eseguita secondo il protocollo standard della SUPERScript II della Invitrogen.

A seguito di precedenti esperienze abbiamo deciso di partire mediamente da circa 4 μ g di RNA estratto che in generale viene convertito in circa 1 μ g di c-DNA.

La miscela di reazione è inizialmente composta da 1 μ l di Oligo (dT) alla concentrazione di 500 μ g/ml, 4-5 μ g di RNA totale e 12 μ l di acqua Milli-Q.

Dopo uno shock termico 70°C → ghiaccio si può procedere alla preparazione della reazione finale aggiungendo:

⇒ 4 μ l 5X First Strand Buffer

⇒ 2 μ l 0,1M DTT

⇒ 1 μ l 10mM dNTP Mix a pH 7.5

dopo aver incubato per 2 minuti a 42° aggiungere 1 μ l di SUPERScript II ed incubare 50 minuti a 42°C.

Per inattivare la reazione portare a 70°C per 15 minuti.

Per rimuovere eventuali residui o sottoprodotti di RNA double strand è possibile aggiungere 1 μ l di RNasi H di Coli incubando per 20 minuti a 37°C.

REAL TIME PCR

La Real Time PCR è in grado di misurare in tempo reale l'andamento della concentrazione di un template sottoposto a PCR in funzione della quantità di fluoroforo incorporata nei prodotti.

La costruzione e l'introduzione di sonde che utilizzano marcatori fluorescenti ha reso possibile una rapida diffusione della tecnica, ed il conseguente abbandono di marcatori radioattivi e l'ottenimento di una maggiore specificità di reazione. Lee et al. (1993) progettaroni un tipo di sonda caratterizzata dall'essere un oligonucleotide dotato sia di un fluorocromo "reporter" che di un "quencher". Quando la sonda è intatta, la fluorescenza del reporter è spenta dalla vicinanza del quencher, secondo la legge di Forster; ma quando la sonda viene degradata dalla Taq polimerasi, l'attività dei fluorocromi diviene rilevabile. In questo modo si evita di ricorrere all'analisi post-PCR per risalire alla quantità di sonda degradata

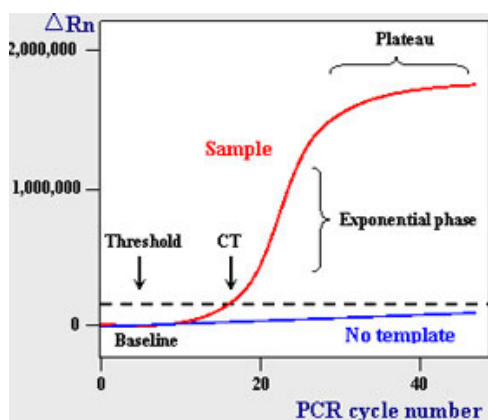
Spesso la real-time PCR è preceduta e combinata con una Retro Trascrizione RT-PCR impiegata per quantificare i livelli di espressione di specifici mRNA: la retro-trascrizione, o trascrizione inversa, produce DNA complementare al DNA singolo filamento detto c-DNA (complementary DNA) ottenuto dall'amplificazione di una sequenza di mRNA mantenendo inalterati i rapporti relativi di concentrazione delle diverse specie degli RNA presenti nella cellula al momento dell'estrazione.

In questo modo è possibile, ad esempio, misurare l'espressione relativa di un gene ad un particolare time point, in una cellula o in un tipo particolare di tessuto.

ANALISI QUANTITATIVA

Similmente alle reazioni di PCR, sono richiesti diversi passaggi per completare un'analisi quantitativa. Questi includono: - la produzione di filamenti stampo puliti; - la progettazione di primers; - l'ottimizzazione degli stati di reazione.

Per alcuni geni bersaglio, le impostazioni dei primers e le condizioni ottimizzate sono state raccolte in alcuni database (<http://www.realtimeprimers.org>) per facilitare lo sviluppo delle analisi. In una reazione tipica, il prodotto di PCR si raddoppia ad ogni ciclo di amplificazione. Siccome sono necessari molti cicli di replicazione affinché venga prodotto abbastanza DNA "fluorescente" da essere rilevabile, il diagramma della fluorescenza sul numero dei cicli esibisce un andamento sigmoidale.



Nei cicli finali, i substrati di reazione iniziano a scarseggiare, i prodotti di PCR non raddoppiano e la curva comincia ad appiattirsi. Il punto della curva in cui la quantità di fluorescenza comincia ad aumentare velocemente, solitamente alcuni scarti quadratici medi sopra la linea di base, è chiamato il ciclo soglia

(valore di Ct). Il diagramma di Ct su DNA stampo è lineare, così un confronto dei valori di Ct fra reazioni multiple permette di calcolare la concentrazione dell'acido nucleico che si vuole quantificare. La pendenza di questa linea fornisce inoltre una misura dell'efficienza della PCR. Alcuni strumenti permettono agli utenti di generare delle curve di melting che seguono il completamento della PCR. Le curve di melting forniscono un'indicazione della purezza del prodotto di reazione e rivelano la presenza di dimeri dei primers.

ANALISI STATISTICHE

I dati grezzi ricavati dal microarray sono stati normalizzati mediante il software SMA (Statistical Microarray Analysis - <http://stat-www.berkeley.edu/users/terry/zarray/Software/smacode.html>).

Ogni immagine è stata normalizzata in maniera intensità-dipendente attraverso LOWESS scatter plot smoother per rimuovere eventuali effetti sistematici nell'immagine (il parametro scelto è stato 0,1). I dati sono poi stati analizzati attraverso l'algoritmo SAM (Significant Analysis of Microarray) scegliendo 0,8 come valore di delta, questo ci ha restituito 91 geni differenzialmente espressi nei campioni in esame con un FDR (false discovery rate) del 2,2%.

Per quanto riguarda i dati di real-time abbiamo impiegato un T-Test a due cose per ricavare i p-value dei tre differenti gruppi di dieci delta ciascuno (uno per ogni gene) e verificarne la confrontabilità.

Avendo impiegato un metodo semi-quantitativo quale il Sybr Green non abbiamo impiegato ulteriori funzioni statistiche in quanto non ci avrebbero fornito informazioni di ulteriore utilità. Intendiamo invece avvalerci di metodi più specifici quando affronteremo il seguito degli esperimenti impiegando le sonde Taqman®.

DISEGNO SPERIMENTALE DELLA PIASTRA

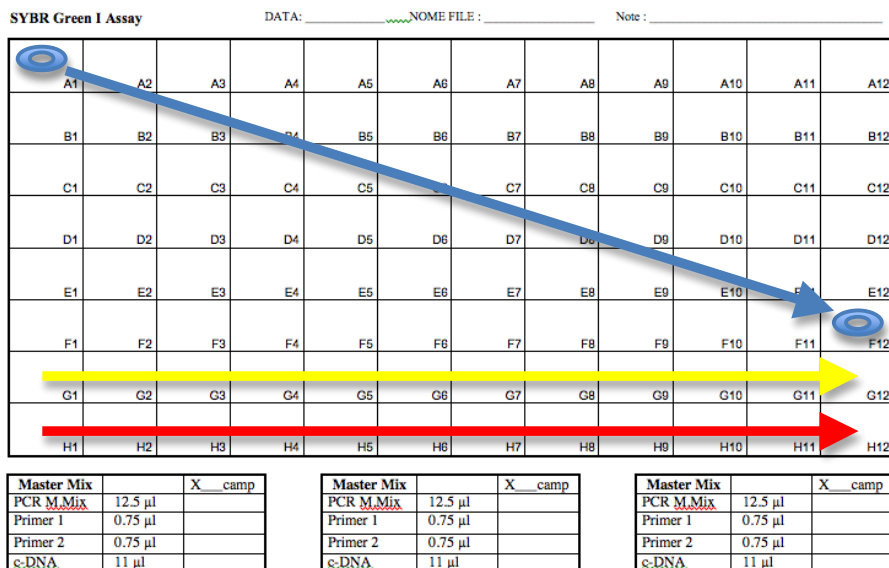


FIG. 8: disegno sperimentale esemplificativo di piastra real-time

Abbiamo deciso di realizzare 30 piastre (FIG. 8) per i campioni da noi selezionati distribuendoli nel seguente ordine:

40 controlli (pazienti AAA o pazienti TEA) spottati sequenzialmente in duplicato per un totale di 80 pozzetti (A1-F12).

Dei rimanenti 16 pozzetti, 8 (G1-G12) sono stati riservati ai controlli negativi ed 8 (H1-H12) a controlli positivi.

Questo stesso disegno di piastra è stato ripetuto per i 10 geni di ciascun gruppo portando così a 30 il totale di piastre impiegate.

Alle 30 piastre vanno poi aggiunte altre tre piastre su cui sono stati eseguiti in duplicato le real-time PCR per il gene housekeeping GADPH necessario per la normalizzazione.

Composizione della MIX

Ogni pozzetto contiene prima della reazione 25 µl di soluzione contenente 12,5 µl di MIX, 0,75 µl di primer FWD, 0,75 µl di primer RWS e 11 µl di template + acqua.

PRIMER PER LA REAL-TIME PCR

Dopo aver prodotto l'elenco dei geni candidati il nostro obiettivo è stato quello di ottenere una validazione mediante RT-PCR. Abbiamo proceduto alla selezione dei primer mediante gli strumenti offerti gratuitamente dal sito Primer3

(<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) dopo aver selezionato la sequenza codificante e le informazioni relative al gene sul sito (<http://www.ensembl.org/index.html>) e verificandoli poi mediante Primerblast (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome).

DEFINIZIONE DELLE CONCENTRAZIONI OPERATIVE DEI PRIMER

La concentrazione ottimale dei primer può essere ricavata analizzando la curva di dissociazione di n reazioni a concentrazioni crescenti di primer a partire da 75 fino ad un massimo di 300 μ M.

Occorre approntare concentrazioni crescenti di suddivisi su n=9 punti (10 geni, 10 coppie di primer e $5 < n < 9$ diluizioni diverse che variano da 75 a 300 μ M $\rightarrow$ pmoli/ μ l) (FIG. 9).

DILUIZIONI PRIMERS

Posizione	1	2	3	4	5	6	7	8	9
[μ M] Iniziale	75	100	150	175	200	225	250	275	300
[μ M] Finale	2,25	3	4,5	5,25	6	6,75	7,5	8,25	9

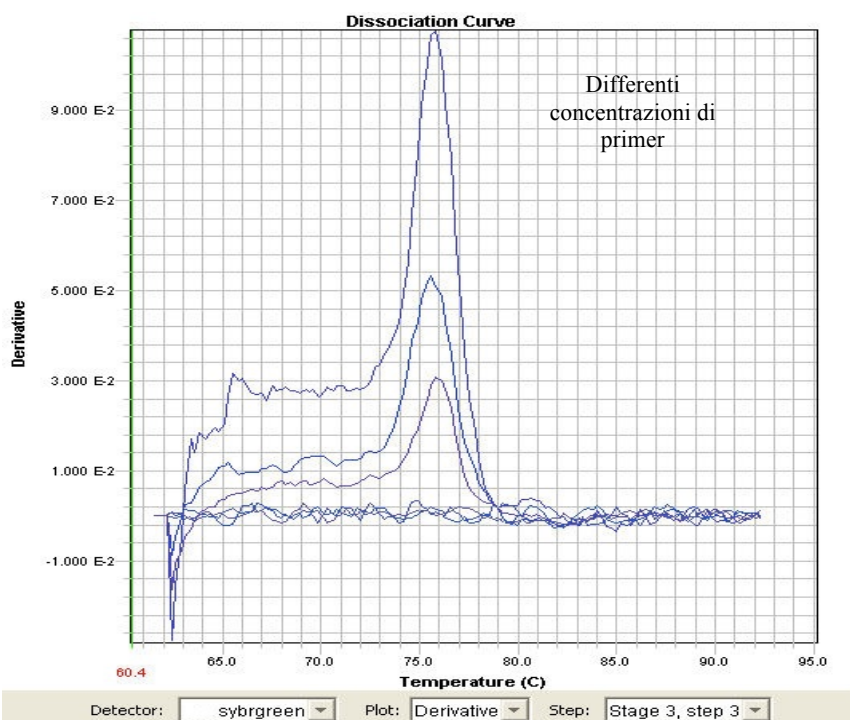


FIG. 9: curve di dissociazione per diverse concentrazioni di primer

METABOLISMO LIPIDICO

MONOGLYCERIDE LIPASE – MGLL

	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%
Forward primer	AGACGCACAGGAAGCAAAGT	20	54.36	50.00%
Reverse primer	CGCTGCGATTCTCCACTACT	20	54.18	55.00%

Products on target templates

>[NM_007283.5](#) Homo sapiens monoglyceride lipase (MGLL), transcript variant 1, mRNA

```
product length = 197
Forward primer 1 AGACGCACAGGAAGCAAAGT 20
Template 114 ..... 133

Reverse primer 1 CGCTGCGATTCTCCACTACT 20
Template 310 ..... 291
```

FREE FATTY ACID RECEPTOR 2 – FFAR2

	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%
Forward primer	GCCTGGTGCTCTTCTTCATC	20	52.88	55.00%
Reverse primer	AGGTGGGACACGTTGTAAGG	20	53.76	55.00%

Products on target templates

>[NM_005306.2](#) Homo sapiens free fatty acid receptor 2 (FFAR2), mRNA

```
product length = 178
Forward primer 1 GCCTGGTGCTCTTCTTCATC 20
Template 551 ..... 570

Reverse primer 1 AGGTGGGACACGTTGTAAGG 20
Template 728 ..... 709
```

ADIPONECTIN RECEPTOR 1 – ADIPOR 1

	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%
Forward primer	CTTCTACTGCTCCACAGC	20	54.31	60.00%
Reverse primer	GACAAAGCCCTCAGCGATAG	20	52.73	55.00%

Products on target templates

>[NM_001127687.1](#) Homo sapiens adiponectin receptor 1 (ADIPOR1), transcript variant 2, mRNA

```
product length = 196
Forward primer 1 CTTCTACTGCTCCACAGC 20
Template 940 ..... 959

Reverse primer 1 GACAAAGCCCTCAGCGATAG 20
Template 1135 ..... 1116
```

PHOSPHOLIPASE A2, (GRUPPO IB) – PLA2G1B

	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%
Forward primer	GTGCTAGCTGTGCTGCTCAC	20	55.96	60.00%
Reverse primer	GGCCTGGTCATAGCAGTTGT	20	54.17	55.00%

Products on target templates

>[NM_000928.2](#) Homo sapiens phospholipase A2, group IB (pancreas) (PLA2G1B), mRNA

```
product length = 219
Forward primer 1 GTGCTAGCTGTGCTGCTCAC 20
Template 49 ..... 68

Reverse primer 1 GGCCTGGTCATAGCAGTTGT 20
Template 267 ..... 248
```

HYDROXYSTEROID (17-BETA) DEYDROGENASE 14 – HSD17B14

	Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%
Forward primer	GCTGGAGCTGAACCTACTGG	20	54.31	60.00%
Reverse primer	AAGCTTTGGTCATGGCTGTT	20	52.41	45.00%

Products on target templates

>[NM_016246.2](#) Homo sapiens hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 14 (HSD17B14), mRNA

```
product length = 173
Forward primer 1 GCTGGAGCTGAACCTACTGG 20
Template 596 ..... 615

Reverse primer 1 AAGCTTTGGTCATGGCTGTT 20
Template 768 ..... 749
```

ACYL-COENZYME A DEHYDROGENASE – ACADS

	Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%
Forward primer	GCGACTCATGGGTTCTGAAT	20	52.20	50.00%
Reverse primer	TGCGACAGTCCTCAAAGATG	20	52.19	50.00%

Products on target templates

>[NM_000017.2](#) Homo sapiens acyl-Coenzyme A dehydrogenase, C-2 to C-3 short chain (ACADS), nuclear gene encoding mitochondrial protein, mRNA

```
product length = 222
Forward primer 1 GCGACTCATGGGTTCTGAAT 20
Template 639 ..... 658

Reverse primer 1 TGCGACAGTCCTCAAAGATG 20
Template 860 ..... 841
```

LOW DENSITY LIPOPROTEIN RECEPTOR-RELATED PROTEIN 5 – LRP5

	Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%
Forward primer	CATCCTGGTGTCCACTCCT	20	53.09	55.00%
Reverse primer	TGAACAGCAAGAAGGTGGTG	20	52.53	50.00%

Products on target templates

>[NM_002335.2](#) Homo sapiens low density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5), mRNA

```
product length = 179
Forward primer 1 CATCCTGGTGTCCACTCCT 20
Template 2748 ..... 2767

Reverse primer 1 TGAACAGCAAGAAGGTGGTG 20
Template 2926 ..... 2907
```

IMMUNITA' TOLL-LIKE RECEPTOR ADAPTOR MOLECULE 1 – TICAM 1

	Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%
Forward primer	CAGGAGCCTGAGGAGATGAG	20	53.12	60.00%
Reverse primer	CTGGGTAGTTGGTGCTGGTT	20	54.00	55.00%

Products on target templates

>[NM_182919.2](#) Homo sapiens toll-like receptor adaptor molecule 1 (TICAM1), mRNA

```
product length = 163
Forward primer 1 CAGGAGCCTGAGGAGATGAG 20
Template 993 ..... 1012

Reverse primer 1 CTGGGTAGTTGGTGCTGGTT 20
Template 1155 ..... 1136
```

INTERLEUKIN 1 RECEPTOR ACCESSORY PROTEIN-LIKE 1 – IL1RAPL1 TUMOR NECROSIS FACTOR

	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%
Forward primer	TGCCCTTGAAATCCTACCTG	20	51.31	50.00%
Reverse primer	CGAAGTCTGGTTTCCAGCTC	20	52.88	55.00%

Products on target templates

>[NM_014271.3](#) Homo sapiens interleukin 1 receptor accessory protein-like 1 (IL1RAPL1), mRNA

```
product length = 204
Forward primer 1  TGCCCTTGAAATCCTACCTG  20
Template        1795  ..... 1814

Reverse primer 1  CGAAGTCTGGTTTCCAGCTC  20
Template        1998  ..... 1979
```

TUMOR NECROSIS FACTOR TYPE 1 RECEPTOR ASSOCIATED PROTEIN – TRAP1

	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%
Forward primer	CTGCACCTTCGTGAGTTTGA	20	52.70	50.00%
Reverse primer	ACCCGAGCACATTTCTCATC	20	52.01	50.00%

Products on target templates

>[NM_016292.2](#) Homo sapiens TNF receptor-associated protein 1 (TRAP1), mRNA

```
product length = 166
Forward primer 1  CTGCACCTTCGTGAGTTTGA  20
Template        1698  ..... 1717

Reverse primer 1  ACCCGAGCACATTTCTCATC  20
Template        1863  ..... 1844
```

GAPDH – Gene housekeeping

	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%
Forward primer	GAGTCAACGGATTGGTCGT	20	52.50	50.00%
Reverse primer	TTGATTTTGGAGGGATCTCG	20	49.35	45.00%

Products on target templates

>[NM_002046.3](#) Homo sapiens glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), mRNA

```
product length = 238
Forward primer 1  GAGTCAACGGATTGGTCGT  20
Template        122  ..... 141

Reverse primer 1  TTGATTTTGGAGGGATCTCG  20
Template        359  ..... 340
```

Un'importante caratteristica dei primer impiegati per le reazioni di real-time è quella di essere disegnati per annealare esclusivamente su sequenze codificanti in modo da escludere prodotti indesiderati generati da inquinamento da materiale genomico.

I primer selezionati debbono inoltre avere condizioni di elevata stringenza per le sequenze bersaglio allo scopo di garantire la maggiore purezza possibile del prodotto minimizzando la presenza di specie contaminanti che aumentino il rumore di fondo riducendo la specificità della reazione.

Ogni coppia di primer viene inoltre sottoposta ad un test di dissociazione impiegando una Master Mix completa aggiungendo la coppia di primer da testare in differenti concentrazioni e fornendo acqua anziché c-DNA come template.

RISULTATI

RACCOLTA CAMPIONI ED ANALISI COMPARATIVE

BIOBANCA

Durante il triennio 2006-2009 abbiamo raccolto 420 campioni ematici e tissutali di pazienti sottoposti ad intervento chirurgico presso il reparto di chirurgia Vascolare dell' Ospedale San Gerardo di Monza diretto dal Prof. G.M.Biasi.

INTERVENTO	PAZIENTI
A.A.A.	77
A.A.A. ENDOVASCOLARE	20
T.E.A. CAROTIDEA	275
STENT CAROTIDEO	39
ANEURISMA ARTERIA ILIACA ENDOVASCOLARE	3
ANEURISMA AORTA TORACICA	2
ANEURISMA AORTA SPLENICA	1
ANEURISMA POPLITEO	1
OSTRUZIONE ARTERIOSA	1
STENT CAROTIDEO + AAA	1
TOTALE	420

Stent carotideo ed Aneurisma dell'Aorta Addominale eseguito con tecniche endovascolari, sono 2 interventi non invasivi che non portano alla produzione di un campione istologico e di questi pazienti non è infatti disponibile il campione tissutale ma solo ematico.

Altri interventi poco comuni come: aneurisma dell' arteria iliaca, aneurisma dell' aorta toracica, aneurisma dell' aorta splenica ed aneurisma popliteo, rientrano nella casistica delle patologie cardiovascolari su base dilatativa come i più comuni A.A.A.

Come detto in precedenza per ogni paziente sono stati raccolti dati anamnesici ed ematochimici al fine di creare un database quanto più possibile completo per poter meglio definire gruppi di elevata omogeneità all'interno dei candidati all'indagine genetica.

DATABASE CLINICO

Nella sopracitata popolazione le caratteristiche anamnesiche rispondono alle seguenti percentuali:

Fattori di rischio cardiovascolare:

- ☐ Dislipidemia: 32%
- ☐ Tabagismo: 55%
- ☐ Diabete mellito: 29%
- ☐ Ipertensione arteriosa: 46%

Associazione con comorbidità:

- ☐ CAD (coronary artery disease): 28%
- ☐ PAD (peripheral artery disease): 17%
- ☐ COPD (chronic obstructive pulmonary disease): 32%

Nei pazienti affetti da stenosi carotidea è emerso che il valore medio di GSM (grey scale median) era pari a 22 e che la percentuale di stenosi media era pari a 80.5%.

Per quanto riguarda invece i pazienti arruolati per la prima parte dello studio cioè l'analisi mediante microarray i dati anamnesici dei soggetti sono i seguenti:

	AAA POOL A (n=5)	CTR POOL C (n=5)	AAA POOL B (n=5)	CTR POOL D (n=5)
ETA' media	67	65	68	66
SESSO	100% MASCHI	100% MASCHI	60% MASCHI	60% MASCHI
FUMATORI	4	1	4	1
DIABETICI	1	0	0	0
IPERTESI	3	1	3	1
DISLIPIDEMICI	4	1	3	0
CAD	1	0	0	0
CAS	1	0	0	0
POAD	1	0	0	0
COPD	3	0	3	0

- ☐ CTR = CONTROLLI
- ☐ AAA = PAZIENTI AFFETTI DA ANEURISM ADDOMINALE
- ☐ CAD = CORONARY ARTERY DISEASE

- ❑ CAS = CAROTID ARTERY STENOSIS
- ❑ POAD = PERIPHERAL OBSTRUCTIVE ARTERY DISEASE
- ❑ COPD = CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE

Per la seconda parte dello studio, eseguita presso i laboratori di medicina molecolare dell'Università di Milano Bicocca, sono stati arruolati 120 soggetti (40 controlli sani, 40 pazienti affetti da AAA e 40 pazienti affetti da stenosi carotidea e sottoposti ad intervento di endoarterectomia). Per i 120 soggetti esaminati le caratteristiche sopra riportate assumono i seguenti valori :

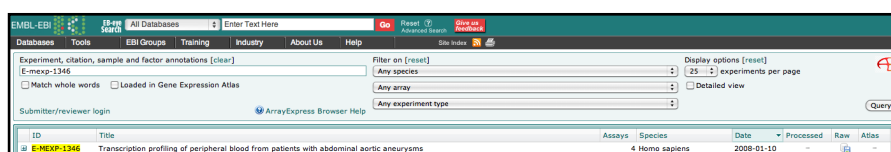
	AAA PAZIENTI (n=40)	CONTROLLI (n=40)	TEA PAZIENTI (n=40)
ETA'	68	71	69
SESSO	87,5 % MASCHI 35	87,5 % MASCHI 35	87,5 % MASCHI 35
FUMATORI	65% 26	37,5% 15	77,5% 31
DIABETICI	7,5% 3	0% 0	5% 2
IPERTESI	77,5% 31	25% 10	87,5% 35
DISLIPIDEMICI	70% 28	5% 2	57,5% 23
CAD	30% 12	0 0%	27,5% 11
CAS	20% 8	0 0%	20% 8
POAD	17,5% 7	0 0%	12,5% 5
COPD	50% 20	0 0%	45% 18

Le caratteristiche anamnesiche dei pazienti non forniscono come è ovvio un dato apprezzabile dal punto di vista sperimentale, sono però indispensabili per garantire l'omogeneità del campione e la comparabilità dei dati.

I dati anamnesici ed ematochimici dei singoli pazienti dei gruppi AAA, TEA e CONTROLLO sono stati analizzati mediante T-test a due code per evidenziarne la comparabilità.

MICROARRAY

Referenza Array: <http://www.ebi.ac.uk/microarray-as/ae/browse.html>



Tra i 14000 trascritti rappresentati sugli array dopo aver processato i dati grezzi e aver applicato i criteri di selezione e filtraggio dei dati sono risultati 3981 trascritti degni di interesse.

Dall'analisi dei 10 campioni raccolti in due distinti pool A e B, da 5 pazienti ciascuno e raffrontati coi relativi controlli dei pool C e D, dopo l'applicazione dell'analisi SAM, sono emersi 91 geni differenzialmente espressi nei 2 gruppi di pazienti rispetto ai controlli. di questi 76 overespressi e 15 downregolati.

Come detto il fold scelto per il cut-off dei dati è stato $d > 1,6$ mentre il False Discovery Rate (F.D.R.) fornito dall'algoritmo S.A.M. è del 2,2%. A seguire i dati del microarray:

(**d-value**: significance analysis of microarrays (SAM) t-statistic)

Nome del Gene	Simbolo	Accession N°	Gene ID	d
GENI OVERESPRESSI IN PAZIENTI AFFETTI DA AAA				
Hemoglobin, alpha 2	HBA2	V00488	3040	5.30
Monoglyceride lipase	MGLL	U67963	11343	4.79
Guanylate kinase 1	GUK1	L76200	2987	3.52
Hemoglobin, epsilon 1	HBE1	NM_005330	3046	3.49
Cell death-inducing DFFA-like effector a	CIDEA	AF041378	1149	3.34
ATPase, Na ⁺ /K ⁺ transporting, alpha polypeptide-like 1	ATP12A	L42563	479	3.21
PDZ domain containing RING finger 4	PDZRN4	AL133067	29951	2.92
CGI-69 protein	CGI-69	NM_016016	51629	2.88
Hemoglobin, delta	HBD	V00505	3045	2.78
Defensin, alpha 1,	DEFA1	M26602	1667	2.48

myeloid-related sequence				
Hemoglobin, theta 1	HBQ1	NM_005331	3049	2.44
Zinc finger and BTB domain containing 39	ZBTB39	AB002350	9880	2.44
Immunoglobulin lambda joining 3	IGLJ3	X57812	28831	2.42
Makorin, ring finger protein, 1	MKRN1	NM_013446	23608	2.40
Cyclin B3	CCNB3	AL137550	85417	2.36
Zinc finger protein 193	ZNF193	U62392	148022	2.29
Toll-like receptor adaptor molecule 1	TICAM1	AF070530	7746	2.29
SEC24 (Saccharomyces cerevisiae) related gene family, member D	SEC24D	AB018298	9871	2.27
Serologically defined colon cancer antigen 1	SDCCAG1	NM_004713	9147	2.24
Ubiquitin-conjugating enzyme E2M (homologous to yeast UBC12)	UBE2M	AF075599	9040	2.19
Free fatty acid receptor 2	FFAR2	AF024690	2867	2.18
Glycophorin C (Gerbich blood group)	GYPC	NM_002101	2995	2.16
Protein (peptidyl-prolyl cis/trans isomerase) NIMA-interacting1	PIN1	U49070	5300	2.14
Three prime repair exonuclease 2	TREX2	AF151107	11219	2.12
MTERF domain containing 2	MTERFD2	BX648184	130916	2.07
Flotillin 1	FLOT1	AF089750	10211	2.01
Interleukin 1 receptor accessory protein-like 1	IL1RAPL1	AJ243874	11141	2.00
Chorionic somatomammotropin hormone-like 1	CSHL1	BC029365	1428	1.99
Solute carrier family 25, member 37	SLC25A37	AF223466	1444	1.99
Glioma-associated oncogene homolog (zinc finger protein)	GLI1	X07384	2735	1.99
Crystallin, mu	CRYM	L02950	51312	1.99
Nucleoporin 88 kD	NUP88	Y08612	2039	1.93

Erythrocyte membrane protein band 4.9 (dematin)	EPB49	U28389	4927	1.93
Splicing factor, arginine/serine-rich (transformer 2 Drosophila homolog) 10	SFRS10	U68063	6434	1.91
ATG5 autophagy related 5 homolog (S. cerevisiae)	ATG5	Y11588	9474	1.90
Chromosome 20 open reading frame 29	C20orf29	AK002030	55317	1.90
S100 calcium-binding protein A6 (calcyclin)	S100A6	J02763	6277	1.90
Lipocalin 2 (oncogene 24p3)	LCN2	X99133	3934	1.89
Potassium channel tetramerisation domain containing 12	KCTD12	AF359381	115207	1.87
Small EDRK-rich factor 2	SERF2	NM_005770	10169	1.86
Platelet factor 4 variant 1	PF4V1	M26167	5197	1.85
Ribosomal protein L18	RPL18	L11566	6141	1.84
Erythrocyte membrane protein band 7.2 (stomatin)	STOM	U33931	2040	1.84
Paralemmin	PALM	Y16270	5064	1.80
Myelin transcription factor 2	MYT2	AF006822	8827	1.79
Adiponectin receptor 1	ADIPOR1	AK001484	51094	1.78
Interferon, alpha 13	IFNA13	BC069427	3447	1.78
SMC (mouse) homolog, X chromosome	SMCX	L25270	8242	1.77
Nuclear factor I/B	NFIB	U85193	4781	1.76
Similar to HSPC323	LOC284422	AF161441	284422	1.75
Phospholipase A2, group IB (pancreas)	PLA2G1B	M21054	5319	1.75
Zinc finger protein 145 (Kruppel-like, expressed in promyelocytic leukemia)	ZBTB16	Z19002	28904	1.73
Immunoglobulin kappa variable 1D-8	IGKV1D-8	M63438	7704	1.73
Potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, member 3	KCNA3	M85217	51171	1.72

Hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 14	HSD17B14	NM_016246	3738	1.72
Mitogen-activated protein kinase kinase 3	MAP2K3	D87116	509	1.71
ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F1 complex, gamma polypeptide 1	ATP5C1	D16562	5606	1.71
Translocase of inner mitochondrial membrane 8 (yeast) homolog A	TIMM8A	U66035	1678	1.71
HUS1 (Saccharomyces pombe) checkpoint homolog	HUS1	AF076844	3364	1.69
Transcription elongation factor A (SII), 2	TCEA2	D50495	6919	1.69
Tumor necrosis factor type 1 receptor-associated protein	TRAP1	NM_016292	10131	1.69
Karyopherin alpha 4 (importin alpha 3)	KPNA4	AB002533	3840	1.68
Chaperonin containing TCP1, subunit 6A (zeta 1)	CCT6A	L27706	908	1.67
Immunoglobulin lambda variable 1-47	IGLV1-47	Z73663	28822	1.67
MutL homolog 3 (Escherichia coli)	MLH3	AB039667	50801	1.67
Potassium inwardly-rectifying channel, subfamily K, member 4	KCNK4	AF247042	27030	1.67
RNA-binding protein S1, serine-rich domain	RNPS1	L37368	10921	1.66
Zinc finger protein 384	ZNF384	U80738	7177	1.66
Tryptase, alpha	TPSAB1	M30038	171017	1.66
Ring finger protein 44	RNF44	AB029023	51374	1.65
Apoptosis related protein APR-3	apr-03	NM_016085	22838	1.65
Basigin	BSG	X64364	35	1.64
Aminolevulinate, delta-, synthase 2 (sideroblastic/hypochromic anemia)	ALAS2	X60364	212	1.64
Acyl-Coenzyme A dehydrogenase, C-2 to C-	ACADS	Z80345	682	1.64

3 short chain				
Sarcosine	SLN	U96094	6588	1.63
Myogenic factor 6	MYF6	X52011	4618	1.62
GENI DOWNREGOLATI IN PAZIENTI AFFETTI DA AAA				
Eukaryotic translation elongation factor 1 beta 2	EEF1B2	X60489	1933	-1.97
Regulator of G-protein signaling 2, 24 kD	RGS2	L13463	5997	-1.97
Protein tyrosine phosphatase, receptor type, c polypeptide	PTPRC	Y00062	5788	-2.04
ARP2 (actin-related protein 2, yeast) homolog	ACTR2	AF006082	10097	-2.17
Similar to chloride intracellular channel protein 1 (Nuclear chloride ion channel 27) (NCC27) (p64 CLCP) (Chloride channel ABP)	LOC390363	XM_495936	390363	-2.28
High-mobility group (nonhistone chromosomal) protein 1 like 10	HMG1L5	L08048	10354	-2.37
Receptor-associated protein of the synapse, 43 kD	RAPSN	Z33905	5913	-2.46
Chromosome 12 open reading frame 35	C12orf35	AK000703	55196	-2.59
Homo sapiens Bruton's tyrosine kinase	BTK	U78027	695	-2.76
Ribosomal protein L17	RPL17	X53777	6139	-2.85
Complement factor H-related 4	CFHR4	X98337	10877	-2.94
Immunoglobulin superfamily containing leucine-rich repeat	ISLR	AB024536	3671	-3.44
Low density lipoprotein receptor-related protein 5	LRP5	AF077820	4041	-3.46
Apoptosis antagonizing transcription factor	AATF	AJ249940	26574	-4.30
Anti-Mullerian hormone receptor, type II	AMHR2	U29700	269	-5.62

SELEZIONE DEI GENI DA VALIDARE MEDIANTE REAL TIME PCR

Tra i 91 geni differenzialmente espressi individuati all'interno dell'array è stato selezionato, in prima battuta, un più ristretto pool genico, la cui espressione è stata misurata in un campione più esteso di popolazione (36 pazienti affetti da AAA e 36 controlli).

Noi abbiamo deciso di andare oltre questa analisi estendendola a tre gruppi di soggetti di 40 individui ciascuno includendo nell'analisi anche pazienti affetti da stenosi carotidea trattati chirurgicamente.

I tre gruppi così delineati sono dunque

1. Controlli
2. Pazienti affetti da aneurisma dell'aorta addominale
3. Pazienti affetti da stenosi carotidea

Gli aneurismi dell'aorta addominale e l'ostruzione carotidea sono due differenti patologie dall'eziologia molto complessa e in parte non ancora chiarita.

Come precedentemente detto le patologie dilatative come l'aneurisma dell'aorta addominale e quelle stenosanti quali le occlusioni carotidee, coinvolgono un numero enorme di fattori che vanno dalla componente genetica a quella ambientale e che sono difficilmente collocabili in uno schema eziopatogenetico ben preciso.

L'analisi eseguita sui 91 geni evidenziati dal microarray mediante "gene ontology analysis" ha consentito di individuare tre processi biologici in cui i geni differenzialmente espressi sembrano essere prevalentemente coinvolti.

Sono così stati individuati tre processi biologici d'interesse:

1. Trasporto dell'ossigeno
2. Regolazione positiva dell'attività delle protein-chinasi
3. Metabolismo lipidico

Questi processi (FIG. 10) sono stati selezionati sulla base di dati ottenuti analizzando un campione di pazienti affetti da aneurisma, azzardandoci a compiere un salto logico abbiamo deciso che per generare dei dati confrontabili e di interesse anche per il gruppo dei pazienti con stenosi carotidea fosse opportuno scegliere geni riguardanti processi comuni alle due patologie, vale a dire metabolismo lipidico ed immunità naturale.

Infiammazione

- a. **Metabolismo Lipidico**
- b. **Immunità**

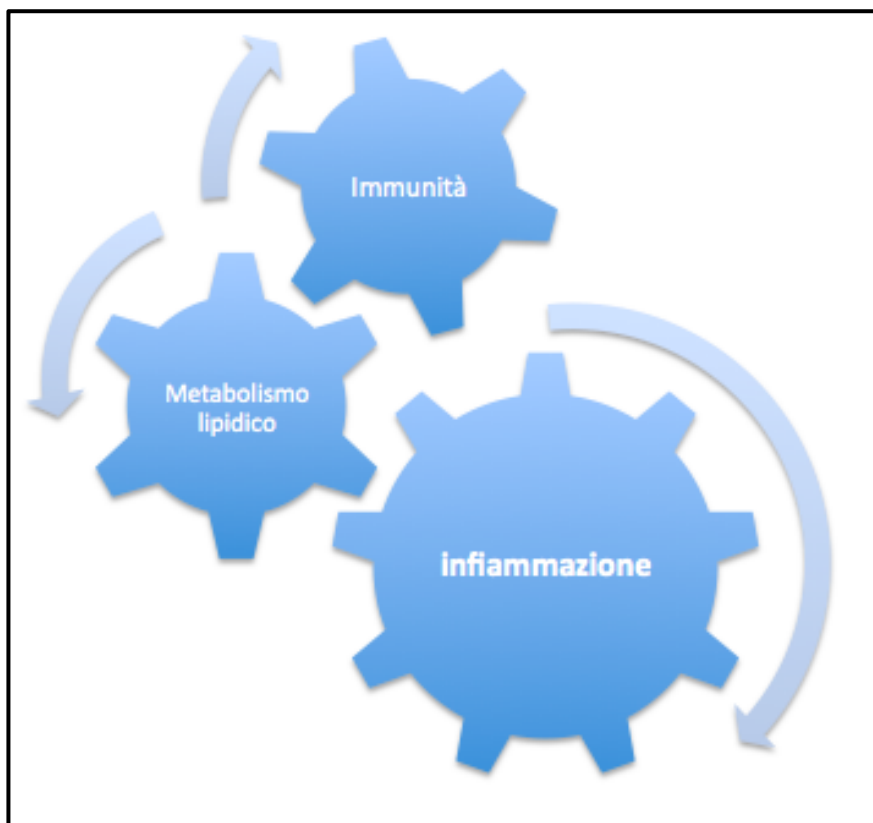


FIG. 10: Relazioni tra infiammazione, metabolismo lipidico ed immunità.

Abbiamo definito metabolismo lipidico ed immunità come principali concorrenti alla definizione del processo infiammatorio a carico dell'apparato vascolare.

Sia le patologie aneurismatiche su base dilatativa che la stenosi carotidea hanno, infatti, una comune e nota concausa nell'infiammazione.

Infiammazione è però un termine che comprende un numero enorme di processi biologici e patologici che coinvolgono, nel caso delle patologie arteriosclerotiche, sia il sistema immunitario che il metabolismo lipidico.

È proprio da accumuli di LDL ossidate che prende le mosse il processo di infiammazione a carico delle arterie di medio e grosso calibro che porta poi alla cronicizzazione dell'infiammazione e al manifestarsi dell'arteriosclerosi.

Per quanto riguarda gli aneurismi, recenti studi suggeriscono che la principale concausa possa essere la degradazione delle proteine elastiche di parete ad opera di diverse famiglie di Metalloproteinasi secrete da macrofagi, fibroblasti e cellule muscolari vascolari lisce della tonaca media del vaso (Vascular Smooth Muscle Cells: VSMCs) presenti nel sito di formazione dell'aneurisma.

È però sempre l'accumulo di lipidi, ossidati in situ, a richiamare i monociti circolanti che, differenziandosi in macrofagi, assumono un fenotipo secernente producendo le metalloproteinasi che vanno poi a degradare la componente elastica del vaso.

Vi è dunque sempre un evento iniziatore, nella maggior parte dei casi l'ossidazione di depositi lipidici, che generalmente conduce all'instaurarsi di un processo infiammatorio acuto e poi cronico alla base delle patologie arteriosclerotiche.

Geni legati al metabolismo lipidico ai processi immunitari ed ai mediatori dell'infiammazione si candidano ad essere un buon punto di partenza per l'approfondimento della patogenesi delle patologie arteriosclerotiche.

Una più accurata conoscenza delle modificazioni a cui vanno incontro le specie cellulari coinvolte, in questa risposta come per esempio i PBMCs, sarebbe di estrema utilità per poter proporre nuovi indicatori utili ad una diagnosi precoce.

I geni selezionati sono i seguenti:

Metabolismo Lipidico:

1. Monoglyceride lipase - MGLL - U67963 - 11343
2. Free fatty acid receptor 2 - FFAR2 - AF024690 – 2867
3. Adiponectin receptor 1 - ADIPOR1 - AK001484 – 51094
4. Phospholipase A2, group IB (pancreas) - PLA2G1B - M21054 – 5319
5. Hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 14 - HSD17B14 - NM_0162463738
6. Acyl-Coenzyme A dehydrogenase, C-2 to C-3 short chain - ACADS Z80345 – 682
7. Low density lipoprotein receptor-related protein 5 - LRP5 - AF077820 - 4041

Immunità:

1. Toll-like receptor adaptor molecule 1 - TICAM1 - AF070530 - 7746
2. Interleukin 1 receptor accessory protein-like 1 - IL1RAPL1 - AJ24387411141
3. Tumor necrosis factor type 1 receptor-associated protein - TRAP1 NM_016292 – 10131

I GENI SELEZIONATI

METABOLISMO LIPIDICO

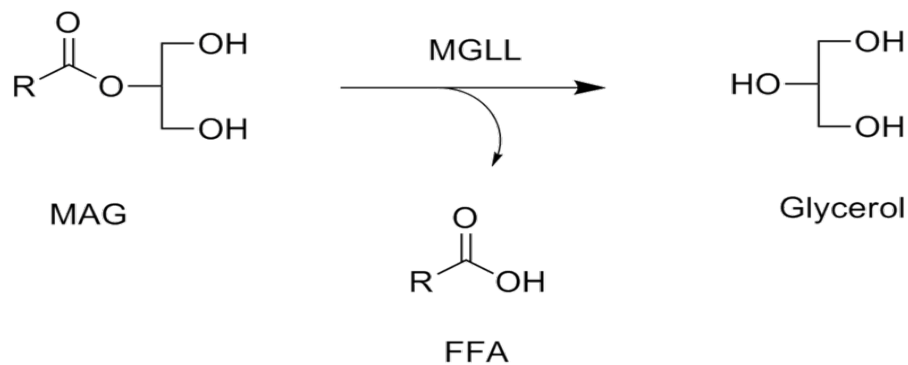
1. MGLL: MONOGLYCERIDE LIPASE (3p13-q13.33)

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/11343?ordinalpos=2&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Gene.Gene_ResultsPanel.Gene_RVDocSum

È un gene che codifica per un enzima che coopera con il gene LIPE (Hormone-Sensitive Lipase) nell'idrolisi dei depositi di trigliceridi all'interno di adipociti ed altre cellule ad acidi grassi e glicerolo.

MGLL può anche complementare l'operato di LPL (Lipoprotein Lipase) nel completare l'idrolisi dei monogliceridi risultanti dalla degradazione di trigliceridi lipoproteici

MGLL è un enzima nel metabolismo dell'endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol (2-AG) ad acido grasso libero (FFA) e glicerolo. Il contributo di MGLL al metabolismo di 2-AG sembra essere circa l'85% del totale.



Il 2-AG è un agonista di CB_1 un recettore per i cannabinoidi presente in gran quantità a livello del sistema nervoso centrale ma anche in altri tipi cellulari tra cui il tessuto ghiandolare di tiroide e surrene ma soprattutto, per ciò che concerne i nostri studi, nel tessuto adiposo, nei muscoli, nelle cellule endoteliali e nel fegato nelle cellule di Kupffer e in quelle stellate (72, 73, 74, 75, 76, 77).

Elevati livelli di MGLL correlano con un elevato stress metabolico lipidico e la conseguente liberazione di quantità più elevate di FFA contribuisce ad attivare la risposta immunitaria e a richiamare cellule monocitarie nelle zone di accumulo adiposo ed in prossimità delle cellule endoteliali dei vasi.

2. FFAR2: FREE FATTY ACID RECEPTOR 2 (19q13.1)

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2867?ordinalpos=3&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Gene.Gene_ResultsPanel.Gene_RVDocSum

Questo gene codifica per un membro della famiglia GP40 delle G protein-coupled receptors che si trovano in un cluster sul cromosoma diciannove.

La proteina codificata è un recettore per acidi grassi a catena corta che potrebbe essere coinvolto nelle risposte infiammatorie e nella regolazione dei livelli plasmatici di lipidi.

L'm-RNA di FFAR2 è espresso principalmente nelle cellule del sistema immunitario, in particolare nei polimorfonucleati (PMN o granulociti neutrofili).

Gli FFA (Free Fatty Acid) hanno effetti specifici sulle popolazioni leucocitarie in particolare sui PMN dove sembra che legandosi a FFAR2 attivino la risposta mediata da neutrofili.

FFAR2 è inoltre espresso durante il differenziamento dei progenitori leucocitari in monociti o neutrofili ed essendo espresso principalmente sui tessuti ematopoietici potrebbe avere un ruolo importante nel differenziamento e/o attivazione dei leucociti. (78, 79, 81,82, 83)

3. ADIPOR1: ADIPONECTIN RECEPTOR 1 (1q32.1)

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/51094?ordinalpos=3&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Gene.Gene_ResultsPanel.Gene_RVDocSum

Questo gene insieme ad ADIPOR1 codifica per i recettori dell'adiponectina, un ormone proteico coinvolto in processi metabolici quali la regolazione dei livelli di glucosio ed il catabolismo degli acidi grassi.

L'adiponectina viene secreta nel flusso sanguigno dalle cellule del tessuto adiposo in quantità elevate rispetto a quelle di altri ormoni.

Negli adulti la quantità di adiponectina secreta è inversamente proporzionale alla quantità di massa grassa corporea.

L'adiponectina e quindi i suoi recettori sembrano essere coinvolti oltre che nel controllo del metabolismo glucidico e lipidico, anche nella regolazione della risposta immunitaria in pazienti a rischio per il diabete di tipo 1, risultano quindi essere un elemento di connessione tra immunità e metabolismo.

Elevata insulino –resistenza correla con bassi livelli di ADIPOR (1e2). In un lavoro di recente pubblicazione sono stati misurati i livelli di espressione di ADIPOR1 su PBMCs, i risultati sono stati i seguenti espressione relativa del gene ADIPOR1

0.9 ± 0.1 per CD3+,
 1.6 ± 0.3 per CD14+,
 2.5 ± 0.3 per CD19+,
 1.9 ± 0.3 per CD56+,
 3.1 ± 1.7 in cellule ADIPOR1+.

Da questi dati emerge che ADIPOR1 viene espresso sia dalla linea monocitaria che da quella linfocitaria (B,T ed NK) suggerendone un ruolo di più ampio spettro nell'attivazione della risposta immunitaria in pazienti con carichi metabolici anomali. (85, 86, 87)

L'adiponectina inoltre sopprime l'espressione di molecole di adesione da parte delle cellule endoteliali vascolari e la produzione di citochine da parte dei macrofagi, inibendo in questo modo i processi infiammatori che si instaurano durante le prime fasi dell'aterosclerosi. In base a questi dati potrebbe dunque essere plausibile una correlazione tra ipoadiponectinemia e sviluppo di patologie aterosclerotiche (84).

È possibile interpretare l'aumento dei livelli del trascritto di ADIPOR1 in due modi diversi.

Il primo come una risposta positiva, in senso protettivo dovuta ad un'aumentata disponibilità di adiponectina nel flusso sanguigno, il secondo invece come una risposta a ridotti livelli di adiponectina nel sangue che a questo punto risulterebbe essere una concausa e non più un impedimento all'instaurarsi di un processo infiammatorio vascolare.

4. PLA2G1B: PHOSPHOLIPASE A2, GROUP IB (Pancreas) (12q23-qter)

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5319?ordinalpos=1&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Gene.Gene_ResultsPanel.Gene_RVDocSum

La fosfolipasi A2 catalizza il rilascio di acidi grassi dal catabolismo delle glicero-3-fosfocoline all'interno del più ampio complesso di processi metabolici che coinvolgono i fosfolipidi (digestione dei fosfolipidi).

Le fosfolipasi in generale impiegano come substrato metabolico i fosfolipidi che degradano rilasciando liso fosfolipidi ed acidi grassi.

Uno degli acidi grassi che possono venire prodotti è l'acido arachidonico che diviene a sua volta substrato delle ciclossigenasi 1 e 2 che lo trasformano in eicosanoidi, specie chimiche che raggruppano sia le prostaglandine che i leucotrieni, mediatori primari nella risposta infiammatoria agendo su endotelio e mastociti (produttori di istamina ed eparina)

Il gruppo più noto è quello degli enzimi pancreatici dei mammiferi secreti sotto forma di zimogeno.

Altre varianti sono state isolate da cervello, fegato, milza intestino, dai macrofagi, dai leucociti e dagli eritrociti così come nell'essudato infiammatorio.

PLA2 fornisce inoltre i precursori per gli eicosanoidi quando impiega come substrato metabolico acido arachidonico e per la formazione del fattore di attivazione piastrinica PAF (Platelet-Activating Factor) quando metabolizza un fosfolipide che abbia in posizione 1 (sn-1) un legame alchil-etero.

Nei pazienti con infiammazioni sono stati riscontrati elevati livelli di PLA2 confermandone il ruolo attivo nella regolazione della risposta immunitaria, dimostrato, come detto dalla capacità di PLA2 di promuovere la biosintesi degli eicosanoidi (88, 89, 90).

5. HSD17B14 – HYDROXYSTEROID (17-BETA) DEHYDROGENASE 14 (19q13.33)

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/51171?ordinalpos=1&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Gene.Gene_ResultsPanel.Gene_RVDocSum

È un gene codificante una proteina principalmente impiegata nel metabolismo degli steroidi intervenendo sul carbonio in posizione 17 (C17), può impiegare come altri substrati acidi grassi, prostaglandine e sostanze esogene. (91)

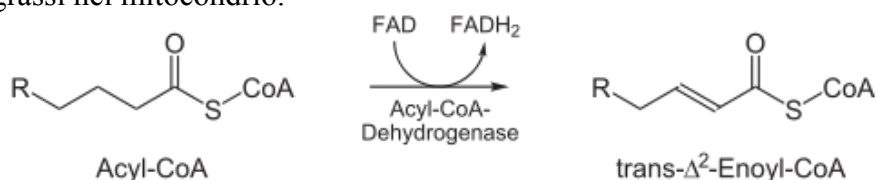
Anche HSD17B14 sembra essere coinvolto nelle vie metaboliche che contribuiscono al controllo delle prostaglandine e quindi un aumento dell'espressione di questo enzima potrebbe facilmente correlare con un aumento della biodisponibilità di prostaglandine a livello ematico in conseguenza di uno stato infiammatorio.

6. ACADS - ACYL-COENZYME A DEHYDROGENASE, C-2 TO C-3 SHORT CHAIN (12q24.31)

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/35?ordinalpos=2&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Gene.Gene_ResultsPanel.Gene_RVDocSum

Questo gene codifica per una flavo proteina tetramerică mitocondriale membro della famiglia delle acil-CoA deidrogenasi. (92, 93)

Questo enzima catalizza la fase iniziale della β -ossidazione degli acidi grassi nel mitocondrio.



ACADS appartiene alla classe di acil-CoA deidrogenasi che impiegano come substrati acidi grassi a corta catena.

In soggetti con elevati carichi alimentari lipidici è lecito aspettarsi un'elevata espressione di questo come di altri enzimi coinvolti nel metabolismo degli acidi grassi.

7. LRP5 - LOW DENSITY LIPOPROTEIN RECEPTOR-RELATED PROTEIN 5 (11Q13.4)

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4041?ordinalpos=1&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Gene.Gene_ResultsPanel.Gene_RVDocSum

Questo gene codifica per un recettore lipoproteico transmembrana a bassa densità che lega ed internalizza ligandi nel processo di endocitosi recettore-mediata.

Funge da co-recettore con la famiglia di proteine Frizzled (G protein-coupled receptor attive nel pathway di Wnt) (FIG. 11).

Fu clonata sulla base della sua associazione nel diabete di tipo 1 in uomo e sembra quindi essere connessa a questa patologia.

In base agli studi di associazione sembra anche essere relata ai processi di regolazione della densità ossea ed inoltre, mutazioni in questo gene causano la vitreoretinopatia essudativa familiare.

Mutazioni in LRP5 o una sua downregolazione correlano con lo sviluppo di diabete ed obesità. (94, 95, 96, 97, 98)

Molti componenti del pathway di Wnt sono coinvolti nella proliferazione delle cellule β del pancreas, nel normale metabolismo del colesterolo e nella secrezione di insulina indotta da glucosio.

L'aumento di volume (contenuto in grassi) degli adipociti porta all'instaurarsi di uno stato infiammatorio nelle stesse cellule a causa dell'intervento dei macrofagi. Questo porta ad una riduzione della secrezione di adiponectina ed all'aumento di citochine e chemochine tra cui IL-6, IL-8 ed MCP-1 che è stata riconosciuta responsabile del reclutamento dei macrofagi all'interno del tessuto adiposo.

L'aumentato rilascio di citochine blocca il differenziamento dei preadipociti e ad un conseguente ridotto accumulo lipidico ed induzione di adiponectina che però promuove un accumulo ectopico di lipidi aggravando lo stato infiammatorio.

Sia IL-6 che TNF sono collegati a questo fenomeno di blocco del differenziamento dei preadipociti, questo è a sua volta associato con un incremento della risposta mediata da Wnt che mantiene le cellule in uno stato indifferenziato e pro-infiammatorio.

Lo stato pro-infiammatorio instauratosi induce un'insulino-resistenza locale, compreso una diminuzione dell'effetto inibitorio sul rilascio di FFA che quindi aumentano andando a loro volta ad accentuare lo stato infiammatorio.

Una diminuzione dei livelli di LRP5 è in apparenza strana in quanto mediatore primario nelle vie Wnt mediate. La sua espressione potrebbe però essere diminuita come meccanismo protettivo nel

tentativo di “smuovere” gli adipociti dallo stato indifferenziato in cui si trovano promuovendone il differenziamento ad adipociti e la corretta internalizzazione degli acidi grassi riducendo la concentrazione degli FFA che, come detto, hanno a loro volta, una funzione pro-infiammatoria.

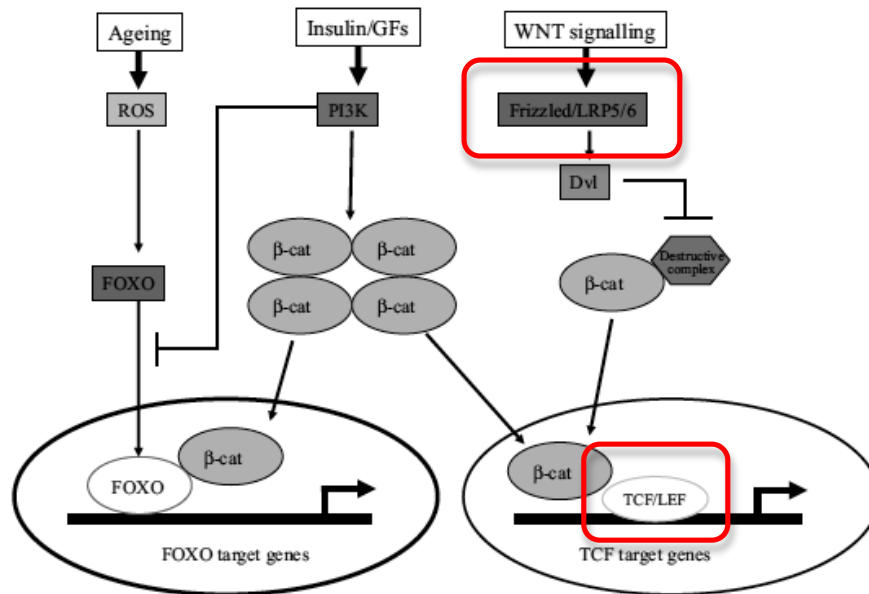


FIG. 11: LRP5 e le sue interazioni.

IMMUNITA'**8. TICAM1: TOLL-LIKE RECEPTOR ADAPTOR MOLECULE 1 (19p13.3)**

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/148022?ordinalpos=1&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Gene.Gene_ResultsPanel.Gene_RVDocSum

TICAM1 è più comunemente noto in letteratura col nome di TRIF o come molecola adattatrice nelle risposte TLR-mediate.

Codifica per una proteina coinvolta nei meccanismi di riconoscimento propri dell'immunità innata e quindi del riconoscimento di patogeni esogeni.

Questi adattatori funzionano legandosi a TLR3 e 4 attraverso TICAM2 mediando le risposte indotte da NF-kappa-B ed IRF (interferon-regulatory factor) e inducendo l'apoptosi.

Come effetto terminale la cascata regolatoria dei TLR (e quindi di TRIF/TICAM) si ha un aumento dell'espressione di citochine e chemochine unitamente alla stimolazione delle cellule del sistema immunitario (FIG. 12).

Sembra che esista un processo interattivo tra TICAM (recettori per l'interleuchina 1) ed i recettori toll-like, suggerendo una possibile correlazione tra l'overespressione di questi geni e la risposta immunitaria innata unitamente agli stress ossidativi (99, 100, 101).

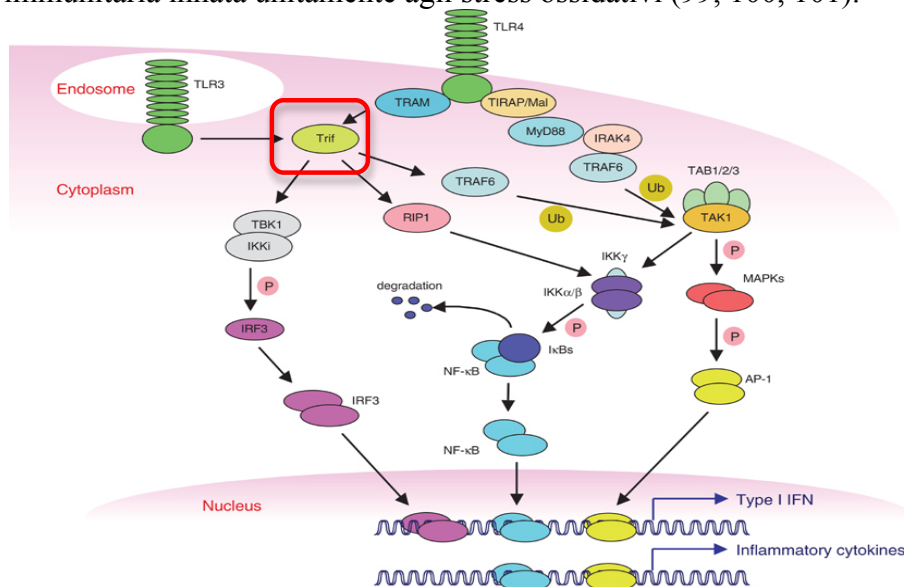


FIG. 12: Cell Death and Differentiation (2006) 13, 816–825. doi:10.1038/sj.cdd.4401850
Nel rettangolo rosso TRIF/TICAM1, nello schema le sue interazioni.

9. IL1RAPL1: INTERLEUKIN 1 RECEPTOR ACCESSORY PROTEIN-LIKE 1 (Xp22.1-p21.3)

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/11141?ordinalpos=1&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Gene.Gene_ResultsPanel.Gene_RVDocSum

questo gene codifica per una proteina membro della famiglia dei recettori dell'interleuchina 1. Localizzano sul cromosoma X in regioni legate a ritardi nello sviluppo del sistema nervoso. Delezioni e mutazioni in questo gene sono state riscontrate in pazienti affetti da ritardo mentale. (102, 103, 104).

Dai dati attualmente disponibile non sembra evidente un collegamento tra aterosclerosi e IL1RAPL1, possiamo però ipotizzare un suo coinvolgimento qualora considerassimo il collegamento con il recettore dell'interleuchina 1 in quanto la IL-1 è la prima citochina pro-infiammatoria individuata ed è inoltre coinvolta nelle reazioni alle infezioni.

10. TRAP1: TNF RECEPTOR-ASSOCIATED PROTEIN 1 (16p13.3)

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/10131?ordinalpos=2&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Gene.Gene_ResultsPanel.Gene_RVDocSum

È un gene che codifica per una heat-shock protein (HSP90L o HSP75). La sua localizzazione è mitocondriale.

Come le altre HSP ha un ruolo importante nella trasduzione dei segnali, nel protein folding e nell'evoluzione morfologica. (105, 106, 107)

Le HSP90 agiscono di solito in regime cooperativo con alte cochaperonine giocando un ruolo importante nel folding di proteine neo sintetizzate o stabilizzando e re imponendo un folding corretto a proteine denaturate a causa di stress cellulari.

Sembra che a particolari condizioni di stress corrispondano livelli più elevati di TRAP1, specialmente nelle cellule neoplastiche.

Linee cellulari con TRAP1 overespresso si sono dimostrate molto più resistenti allo stress ossidativo, in particolare ai danni al DNA indotti da H₂O₂ e sono resistenti all'induzione di apoptosi mediante chemioterapici.

TRAP1 interagisce con due proteine EXT1 ed EXT2 codificanti per Exostosin-1 e 2. EXT1 e 2 sono due enzimi glicosiltransferasici implicati nella biosintesi dell'eparansolfato (HS). A sua volta HS interagisce con svariate proteine promuovendo alcuni importanti processi come angiogenesi e coagulazione, sembra inoltre fungere da

recettore per alcune proteine virali anche se molte delle sue funzioni sono ancora oggetto di studio.

Dunque TRAP1 attraverso EXT e HP si ricollega alla regolazione dei processi coagulativi ed angiogenetici che accompagnano le patologie aterosclerotiche.

VALIDAZIONE DEI GENI DIFFERENZIALMENTE ESPRESSI MEDIANTE REAL-TIME PCR

I primers selezionati sono stati preventivamente controllati in-silico tramite primerBLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome), questo software consente di avere una idea indicativa di tutti i possibili annealing dei primer sui c-DNA presenti in banca dati.

Abbiamo cercato di selezionare primer che generassero il minor numero di prodotti aspecifici e col maggior numero di differenze rispetto alla sequenza del c-DNA del nostro templato.

Annealing corretto

>[NM_198289.2](#) Homo sapiens cell death-inducing DFFA-like effector a (CIDEA),

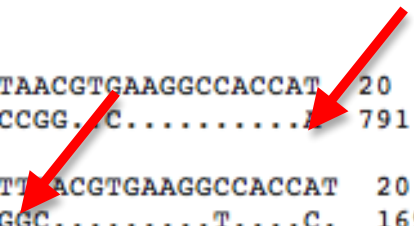
```
product length = 230
Forward primer 1  CTTAACGTGAAGGCCACCAT  20
Template        723  ..... 742

Reverse primer 1  CCCTATCCACACGTGAACCT  20
Template        952  ..... 933
```

Annealing con mismatch

```
product length = 941
Forward primer 1  CTTAACGTGAAGGCCACCAT  20
Template        772  ..CCGG..C..... 791

Forward primer 1  CTTAACGTGAAGGCCACCAT  20
Template        1712  TGGC.....T....C. 1693
```



Dopo avere selezionato almeno due coppie di primer per ciascun gene abbiamo eseguito un test di dissociazione per eliminare le coppie che dessero, a determinate concentrazioni, dei picchi di fluorescenza anomali e che potessero quindi alterare l'esito dell'esperimento.

La freccia azzurra (FIG. 13) indica i picchi generati da coppie di primer che si legano aspecificamente al templato generando sottoprodotti aspecifici da scartare, quella rossa indica invece le curve di dissociazione dei prodotti specifici dei primer che possono essere impiegati con la ragionevole convinzione che non andranno ad inficiare le letture dello strumento.

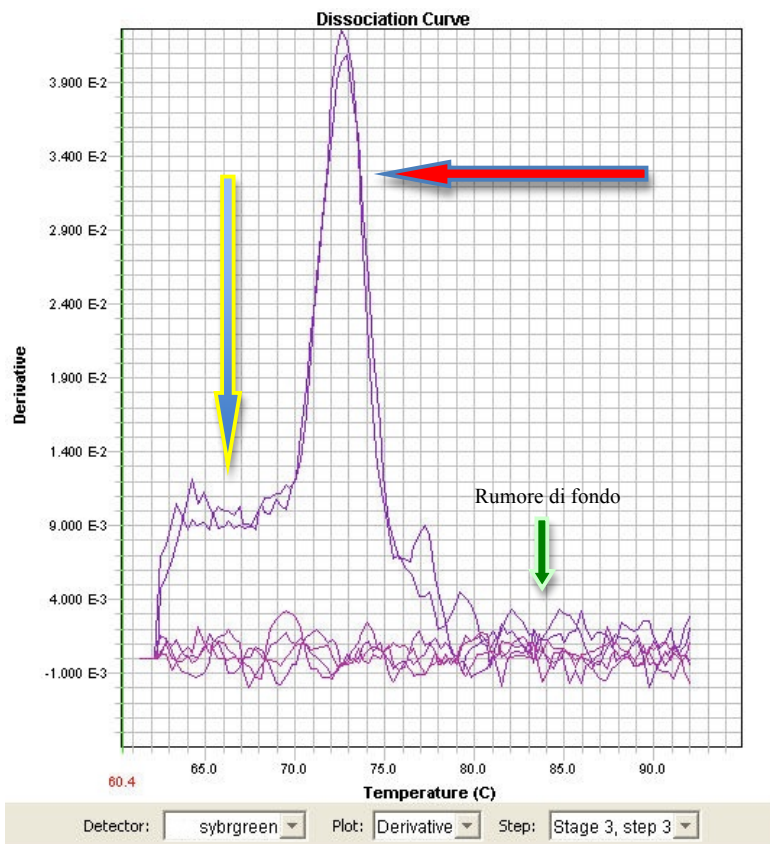


FIG. 13: Esempio di curva di dissociazione

il gene GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) è stato impiegato come controllo interno in quanto nella linea ematopoietica risulta essere espresso in modo uniforme a livelli facilmente detectabili. Da analisi preliminare su campioni di controllo interno risulta una media di C_T che si attesta intorno a 21 (C_T medio=21).

I risultati ottenuti dalle real-time PCR eseguiti in doppio per ciascun campione sono stati raffrontati secondo il metodo del $\Delta\Delta C_T$.

La media dei C_T dello stesso campione è stata raffrontata con la media dei C_T del gene di controllo (GAPDH).

Il valore così ottenuto è il primo ΔC_T .

Lo stesso procedimento è stato ripetuto per i 10 geni selezionati per i 40 soggetti dei 3 gruppi sperimentali per un totale di 1200 valori di ΔC_T .

I valori di ΔC_T sono stati raffrontati mediante T-Test a due code gene per gene, paziente TEA vs controllo e paziente AAA vs controllo, al

fine di ottenere un p-value che indicasse la raffrontabilità dei gruppi di dati ottenuti.

Solo a questo punto, avendo ottenuto $p\text{-value} < 0.05$, siamo passati a ricavare i valori di $\Delta\Delta C_T$, anche se di fatto risulta essere un raffronto arbitrario, eseguito sulle medie dei valori di ΔC_T di ogni gruppo sperimentale (controlli, pazienti TEA e pazienti AAA) per i singoli geni.

Il valore “X” ottenuto dall’equazione $X=2^{-\Delta\Delta C_T}$ ci restituisce un arbitrario valore di “fold”, cioè un’indicazione di quanto il gene di interesse sia espresso in più o in meno rispetto allo stesso gene nei pazienti del gruppo controllo.

Il valore di “fold” è in questo caso un valore numerico qualitativo adimensionale, ma che fornisce comunque un’indicazione plausibile del rapporto di espressione del gene in analisi, tra controlli e pazienti.

Dai risultati ottenuti appaiono confermate le tendenze rilevate con il microarray precedentemente eseguito, e vengono inoltre confermati i dati anche sui pazienti affetti da ostruzione carotidea, evidenziando la presenza di tratti comuni a livello di modificazioni trascrizionali nelle due patologie.

RISULTATI NUMERICI REALTIME

PAZIENTI AFFETTI DA AAA Vs CONTROLLI

AAA VS CTRL	MGLL	FFAR2	ADIPO1	PLA2G1B	HSD17B14
MEDIA	3.882	3.387	6.975	2.961	4.498
DDCT	-1,434	-0,441	-1,218	-0,665	-2,619
FOLD	2,70	1,36	2,33	1,59	6,14
T TEST	0,000986348	0,014722573	1,84182E-03	0,00043179	2,95921E-05
	ACADS	LRP5	TICAM1	IL1RAPL1	TRAP1
MEDIA	1.980	4.284	3.785	4.183	1.618
DDCT	-1,782	0,658	-0,565	-2,430	-1,314
FOLD	3,44	0,63	1,48	5,39	2,49
T TEST	9,62007E-05	0,014932002	0,018367989	3,1962E-04	0,00089126

IN EVIDENZA

AAA vs CONTROLLI		
GENE	FOLD	pValue
MGLL	2,7	0,000986348
FFAR2	1,36	0,014722573
ADIPO1	2,33	1,84E-03
PLA2G1B	1,59	0,00043179
HSD17B14	6,14	2,96E-05
ACADS	3,44	9,62E-05
LRP5	0,63	0,014932002
TICAM1	1,48	0,018367989
IL1RAPL1	5,39	3,20E-04
TRAP1	2,49	0,00089126

PAZIENTI AFFETTI DA TEA Vs CONTROLLI

TEA VS CTRL	MGLL	FFAR2	ADIPO1	PLA2G1B	HSD17B14
MEDIA	3.784	3.279	6.985	3.009	4.906
DDCT	-1,532	-0,550	-1,209	-0,616	-2,211
FOLD	2,89	1,46	2,31	1,53	4,63
T TEST	0,0020185	0,08359461	0,00070896	0,018481044	1,0553E-04
	ACADS	LRP5	TICAM1	IL1RAPL1	TRAP1
MEDIA	2.215	4.517	3.882	4.312	1.691
DDCT	-1,547	0,890	-0,467	-2,300	-1,241
FOLD	2,92	0,54	1,38	4,93	2,36
T TEST	3,126E-05	0,00475383	0,02873310	6,45241E-04	0,010343593

IN EVIDENZA

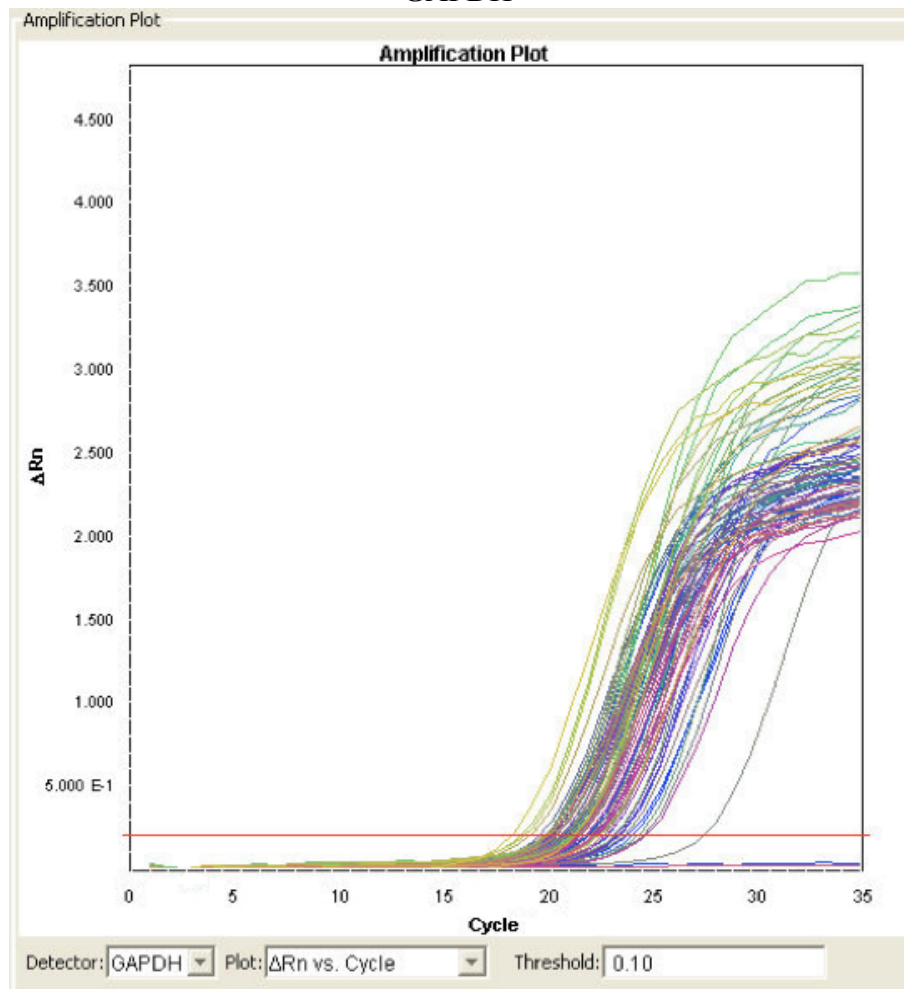
TEA vs CONTROLLI		
GENE	FOLD	pValue
MGLL	2,89	0,002018546
FFAR2	1,46	0,083594614
ADIPO1	2,31	7,09E-04
PLA2G1B	1,53	0,018481044
HSD17B14	4,63	1,06E-05
ACADS	2,92	3,12E-06
LRP5	0,54	0,004753831
TICAM1	1,38	0,028733103
IL1RAPL1	4,93	6,45E-05
TRAP1	2,36	0,010343593

I dati ricavati confermano dunque i dati del microarray estendendone la validità ai campioni ematici di pazienti affetti da stenosi carotidea sottoposti ad intervento chirurgico.

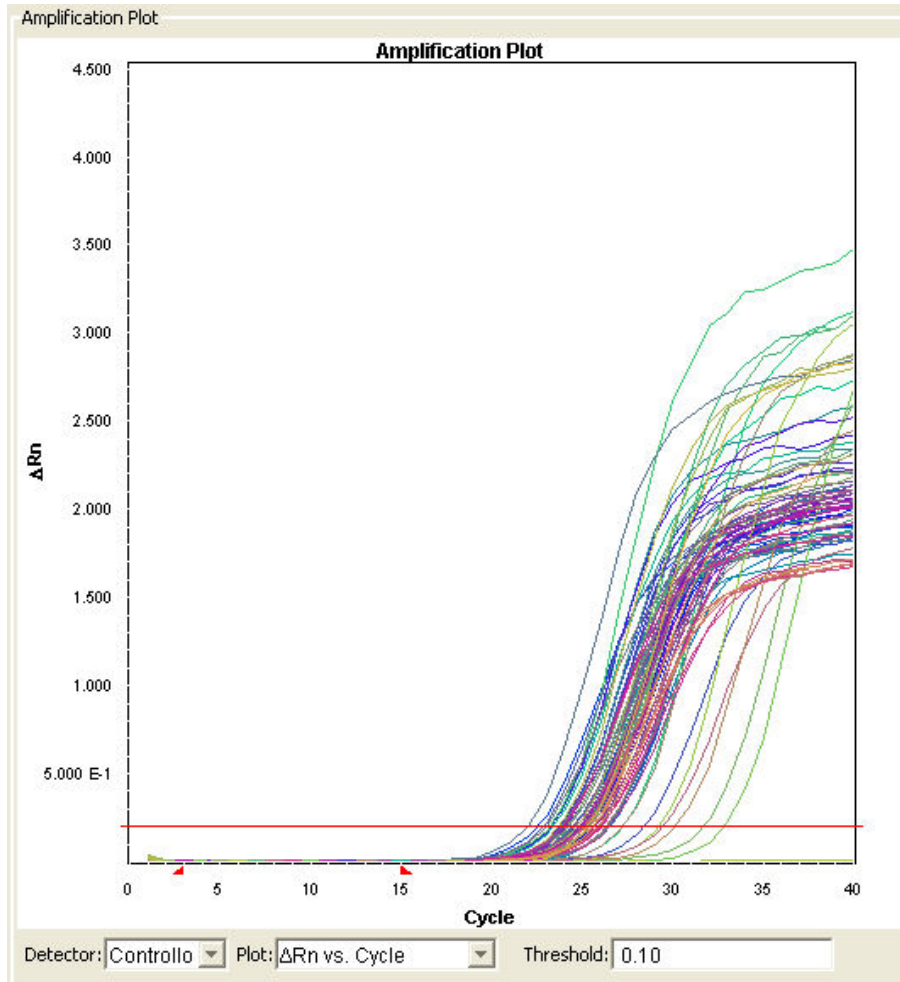
L'analisi statistica conferma la bontà del campione e la comparabilità dei dati prodotti.

CURVE GRAFICHE REALTIME

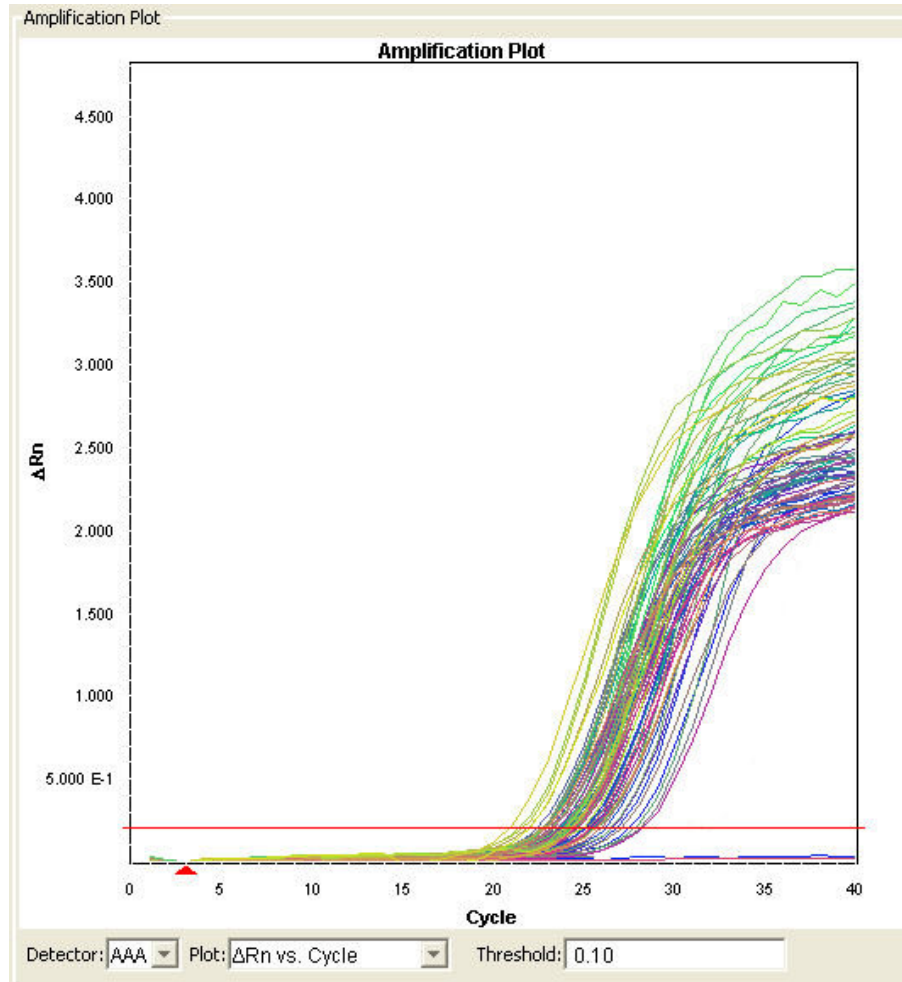
GAPDH



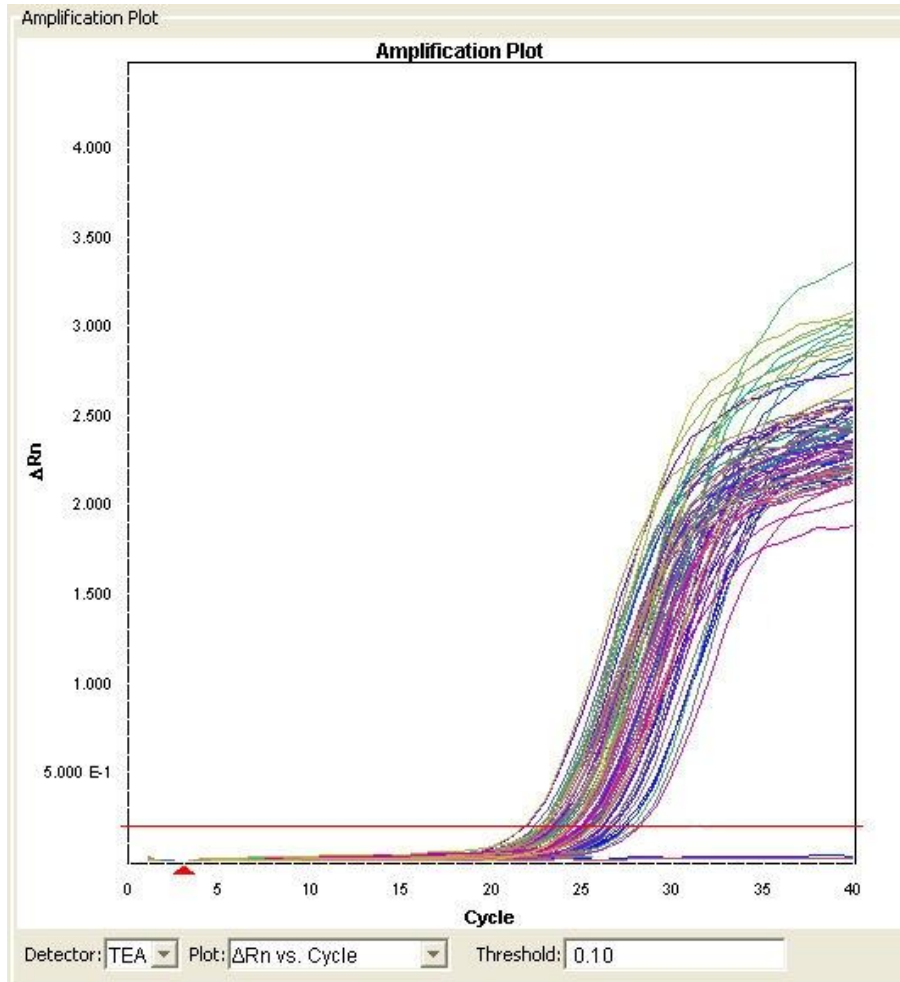
CONTROLLI



PAZIENTI AFFETTI DA A.A.A.



PAZIENTI AFFETTI DA STENOSI CAROTIDEA



DISCUSSIONE

In questo lavoro abbiamo cercato di affrontare una parte del complesso sistema eziopatogenico alla base delle patologie arteriosclerotiche, focalizzandoci in particolare su pazienti affetti da aneurisma dell'aorta addominale e da pazienti affetti da stenosi carotidea, entrambi sottoposti ad intervento chirurgico "invasivo" per la risoluzione del problema.

Questo tipo di lavori implicano un notevole impiego di tempo per la collezione e la scelta dei pazienti da esaminare, è infatti necessario avere pool di soggetti il più possibile numerosi ma anche omogenei dal punto di vista clinico ed ematochimico, cercando di assicurarsi che, per quanto possibile, i pazienti non presentino alterazioni fisiologiche atipiche in grado di compromettere la validità degli esperimenti.

Il lavoro è essenzialmente suddiviso in tre parti.

- 1) Reclutamento di pazienti e controlli per lo studio di espressione genica.
- 2) Microarray e validazione mediante real-time PCR dei soli pazienti affetti da aneurisma dell'aorta addominale.
- 3) Studio mediante real-time PCR dei livelli di espressione di un secondo pool di geni rispetto ad un gruppo controllo in pazienti affetti da aneurisma dell'aorta addominale e da stenosi carotidea sottoposti ad intervento chirurgico.

Il punto 2 è stato eseguito presso l'ospedale Careggi di Firenze sotto la supervisione della Prof.ssa Betti Giusti e della Prof.ssa Rosanna Abbate nell'ambito di una collaborazione facente parte del programma di ricerca FIRB GENOPOLIS per lo studio delle patologie arteriosclerotiche mediante tecnologie all'avanguardia.

I pazienti impiegati al punto 3 provengono invece dal reparto di chirurgia vascolare del Prof. Giorgio M. Biasi dell'ospedale San Gerardo di Tintori di Monza, afferente al dipartimento di scienze chirurgiche dell'UNIMIB.

È stato un grande impegno e molto difficoltoso raccogliere i 420 campioni ematici e tissutali che ad oggi compongono la nostra "banca" e solo dopo aver raggiunto un numero congruo è stato possibile passare alla parte di analisi vera e propria dei campioni.

Grazie al lavoro svolto dal gruppo della Prof.ssa Abbate a Firenze in collaborazione con la Prof.ssa M. Lavitrano è stato possibile ridurre la scelta dei geni da analizzare a 91 potenziali obiettivi tra cui abbiamo poi scelto, come detto in precedenza: MGLL, FFAR2, ADIPO1, PLA2G1B, HSD17B14, ACADS, LRP5, TICAM1, IL1RAPL1, TRAP1.

La scelta dei geni che abbiamo scelto di analizzare mediante real-time PCR presso il nostro laboratorio è in parte integrativa al lavoro svolto presso l'ospedale Careggi ed in parte basata su nuovi presupposti anche se la base comune di partenza è stata in entrambi i casi il risultato del microarray.

Il nostro obiettivo è stato quello di prendere in considerazione geni coinvolti nel metabolismo lipidico, nell'infiammazione e nella mediazione della risposta immunitaria come reazione a fenomeni di stress cellulare endogeni ed esogeni (radicali dell'ossigeno e infezioni microbiche o virali).

Pur nella sua complessità l'arteriosclerosi è sempre una patologia infiammatoria che quindi coinvolge le decine di processi sottintesi a questa parola.

Come desideravamo evidenziare nell'immagine 74 il metabolismo lipidico concorre insieme con i processi immunitari a "mettere in movimento" i processi infiammatori che a loro volta contribuiscono a mantenere in moto immunità e anomalie metaboliche lipidiche.

CRITICITA'

Sono sempre molti i punti critici di un lavoro che ha come punto focale dell'indagine il paziente e non la singola cellula o il singolo processo metabolico. L'essere umano è l'opposto della semplificabilità e della modellizzabilità che sono generalmente perseguite durante un esperimento scientifico.

In questo caso la prima delle criticità potrebbe essere la scelta di impiegare come reale soggetto sperimentale i PBMCs e non la placca o la parete dell'arteria dei pazienti. Per questa ipotetica obiezione esistono delle argomentazioni pro e contro.

I contro riguardano il fatto che in effetti il soggetto affetto da una patologia arteriosclerotica manifesta i propri sintomi principalmente a carico della parete del vaso e non delle cellule ematiche mononucleate, per altro circolanti e non residenti in sede di lesione.

A sostegno di questa scelta si possono portare diverse motivazioni, prima tra le quali la difficoltà di reperire campioni tissutali provenienti da pareti arteriose sia dei pazienti, sia, soprattutto, dei controlli. Durante gli interventi, oltre a risolvere la problematica occlusiva, l'obiettivo primario del chirurgo è quello di non arrecare danni al vaso ed in particolare al tessuto endoteliale che lo tappezza internamente; rimuovere una porzione di vaso non farebbe altro che danneggiare il paziente aumentandone esponenzialmente le probabilità di andare incontro ad un evento restenotico inficiando l'esito positivo dell'intervento.

In secondo luogo i PBMCs possono essere facilmente reperiti sia nei pazienti che in individui sani o apparentemente sani e consentono di avere a disposizione in modo relativamente agevole un numero congruo di controlli.

La stessa facilità di individuazione di soggetti di controllo sarebbe impossibile se ci si focalizzasse sullo studio della parete dei vasi, in quanto occorrerebbe prelevare in tempi celeri tessuti arteriosi da pazienti deceduti in seguito ad eventi traumatici e non patologici. Si presenterebbe poi l'accessoria difficoltà di individuare soggetti di età avanzata che non presentino però un quadro clinico compromesso da patologie su base infiammatoria o altre patologie frequenti nell'anziano che variano da problemi cardiovascolari a formazioni neoplastiche e che possano in definitiva, alterarne lo "stato trascrizionale" del soggetto.

Una seconda criticità è sicuramente il metodo adottato per la real-time PCR. Attualmente l'impiego di sonde Taqman® è preferito all'impiego del Sybr green in quanto impiegando di fatto un terzo primer consente di avere una maggiore specificità nell'identificazione delle sequenze bersaglio e curve di reazione solitamente più omogenee e ripetibili.

La caratteristica del metodo SYBR Green che ci ha fatto propendere per questa scelta è stata in prima istanza l'economicità del prodotto e la maggior celerità di messa a punto di un metodo di analisi qualitativo.

Per questa prima fase infatti, dopo tre anni di screening, abbiamo deciso di procedere speditamente verso un'analisi che ci desse delle indicazioni qualitative di rapporti di espressione e non verso un metodo quantitativo. Da questi dati procederemo poi verso nuove analisi di tipo quantitativo utilizzando sonde Taqman® e soprattutto rette di tarature commerciali sulle quali basarci per la definizione del numero di copie realmente presenti nei campioni.

Per ottenere dati quantitativi mediante SYBR Green sarebbe stato necessario clonare ogni costrutto rappresentante i nostri geni in un plasmide e costruire una retta di taratura a concentrazioni note da cui ricavare l'equazione di una retta dalla quale ricavare i reali valori numerici quantitativi in funzione dei risultati ottenuti dalle real-time PCR.

Come evidente un lavoro di questo tipo avrebbe richiesto un tempo maggiore ed una spesa maggiore.

Impiegando invece il solo SYBR Green per una valutazione qualitativa abbiamo potuto ridurre costi e tempo per questa prima fase

necessaria ad ottenere almeno un iniziale pool di dati sul quale cominciare a ragionare per decidere dei futuri esperimenti.

Esperimenti che verranno svolti, come detto, con la metodica Taqman® su un campione più numeroso, già con una indicazione positiva di ottenere con una probabilità elevata dati indicanti variazioni significative nell'espressione dei geni in esame.

Un'ultima indicazione sulla numerosità del campione. Quaranta pazienti per ogni gruppo sperimentale possono sembrare pochi in apparenza ma è un numero coerente con altri studi di questo tipo. Questa non è ovviamente una giustificazione di per sé ma un'indicazione di come una numerosità del campione superiore a 30 sia sufficiente ad ottenere dati coerenti ed attendibili oltre che accettabili dal punto di vista editoriale. Lavorare su campioni confrontabili in numero elevato è spesso impossibile in quanto il numero dei soggetti di partenza è molto alto ma la variabilità dei loro parametri non li rendono accorpabili in gruppi altrettanto numerosi ed occorre creare dei sottogruppi molto più omogenei ma conseguentemente meno numerosi, ma che forniscono dati molto utili e spesso generalizzabili a popolazioni più numerose.

IL SENSO DEL LAVORO SVOLTO

Il lavoro che svolto è grossolanamente suddivisibile in due periodi successivi: la raccolta ed il processamento dei campioni e l'analisi degli acidi nucleici.

Il nostro obiettivo primario in questo lavoro era quello di creare una "collezione" di campioni, tissutali ed ematici (da cui poi estrarre e separare gli acidi nucleici) da cui partire per future ricerche avendo a disposizione un ricco campione entro cui cercare anomalie trascrizionali e traduzionali da poter impiegare, in prima istanza, per migliorare gli attuali strumenti diagnostici e terapeutici in seconda battuta.

Questo ragionamento apparentemente strano ha in realtà un senso nella difficoltà attuale di individuare precocemente le lesioni arteriose, soprattutto quelle di origine aneurismatica che sono e rimangono le più pericolose per la vita del paziente oltre che le più difficili da individuare in quanto sostanzialmente asintomatiche.

Fortunatamente la chirurgia offre metodiche risolutive per questo tipo di patologie e una diagnosi precoce consentirebbe di ridurre drasticamente la mortalità e le invalidità legate a mancate diagnosi.

Per individuare soggetti "a rischio" attualmente ci si basa sulla compresenza dei noti fattori di rischio cardiovascolari quali

dislipidemie, diabete, alterazioni della pressione sistolica e diastolica, elevati valori di colesterolo, stato infiammatorio eccetera.

Spesso però sia le stenosi carotidee e gli aneurismi si sviluppano anche in soggetti che non presentano o che presentano alterazioni moderate in questi parametri. Sarebbe dunque importante trovare dei nuovi markers univoci per lo screening e l'identificazione dei soggetti a rischio.

Lo scopo generale del lavoro è quello di fornire un contributo alla comprensione dei processi fisiopatologici alla base delle patologie arteriosclerotiche siano esse stenotiche o dilatative.

CONCLUSIONI

I dati ottenuti sia dal microarray che dai set di esperimenti eseguiti mediante real-time hanno confermato il coinvolgimento del metabolismo lipidico nelle alterazioni metaboliche correlate con l'arteriosclerosi.

Altro importante punto è quello che indica come queste alterazioni siano riscontrabili anche a livello delle popolazioni di cellule mononucleate circolanti, confermando indirettamente e poi direttamente in seguito all'analisi genetica, il coinvolgimento del comparto immunitario come concausa e come coprotagonista della patogenesi.

È stato inoltre possibile validare i dati di real-time oltre che su pazienti affetti da AAA anche su pazienti affetti da stenosi carotidea, sottolineando la probabile base comune di queste patologie.

È altresì vero che questi due gruppi di pazienti presentano entrambi un'elevata percentuale di soggetti con disturbi metabolici e stress infiammatori cronici e acuti, rendendo in qualche modo difficile distinguere la comune base patologica da un'alterazione trascrizionale comune in quanto affetti da comuni patologie sussidiarie a quella arteriosclerotica in esame.

Il primo obiettivo per lo sviluppo a breve termine di questo progetto è quello di realizzare un chip dedicato ai pazienti affetti da stenosi carotidea e confrontarlo con quello dei pazienti affetti da aneurisma per verificare eventuali tratti comuni ma soprattutto i tratti non in comune per valutare quali geni di fatto caratterizzino le patologie stenotiche da quelle dilatative in quanto come spesso accade i dati più stimolanti emergono dalle differenze e non dalle analogie.

In definitiva abbiamo gli esperimenti svolti, ci restituiscono dei fotogrammi di una patologia molto complessa ma che, di fatto, indubitabilmente coinvolge come macrogruppo tutti i processi che

normalmente vengono definiti infiammatori e legati a questi biunivocamente immunità e dismetabolie lipidiche.

Acidi grassi e sistema immunitario sono legati da un network molto fitto che ha tra i suoi snodi primari gli acidi grassi ed il loro metabolismo insieme al metabolismo dei fosfolipidi che hanno sia funzioni strutturali che trasduzionali in molte vie di attivazione e controllo del comparto immunitario.

Cercando di riassumere e collegare i dati ottenuti vorremmo provare a ricostruire delle connessioni tra i dieci geni presi in esame.

MGLL come descritto in precedenza codifica per un enzima che catalizza la degradazione degli acidi grassi monovalenti a glicerolo liberando acidi grassi liberi nel flusso sanguigno. Tra i suoi substrati è presente anche l'endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol (2-AG) derivato dell'acido arachidonico che ci riconduce al metabolismo delle prostaglandine e quindi agli stimoli infiammatori.

Gli FFA (free fatty acid) sono un substrato per il recettore FFAR2 che come effetto a quello di stimolare la proliferazione dei neutrofili.

ADIPOR1 è invece un recettore dell'adiponectina, un ormone proteico secreto dagli adipociti che sopprime l'espressione di molecole di adesione da parte delle cellule endoteliali vascolari e la produzione di citochine da parte dei macrofagi, inibendo in questo modo i processi infiammatori che si instaurano durante le prime fasi dell'aterosclerosi.

In base a questi dati potrebbe dunque essere plausibile una correlazione tra ipoadiponectinemia e sviluppo di patologie aterosclerotiche (84).

È possibile interpretare l'aumento dei livelli del trascritto di ADIPOR1 in due modi diversi.

Il primo come una risposta positiva, in senso protettivo dovuta ad un'aumentata disponibilità di adiponectina nel flusso sanguigno, il secondo invece come una risposta a ridotti livelli di adiponectina nel sangue che a questo punto risulterebbe essere una concausa e non più un impedimento all'instaurarsi di un processo infiammatorio vascolare.

PLA2G1B codifica per una fosfolipasi pancreatica che come è ovvio è qui espressa in una popolazione monocitaria, questa classe di enzimi sono impegnati nel catabolismo dei fosfolipidi trasformandoli in acidi grassi rilasciando lisofosfolipidi. Uno degli acidi grassi prodotti attraverso questa via è proprio l'acido arachidonico che ritorna come nel caso di MGLL. Dall'acido arachidonico attraverso la via delle ciclossigenasi (COX 1 e 2) si ottiene una famiglia di molecole che va

sotto il nome di eicosanoidi che comprendono prostaglandine e leucotrieni, principali protagonisti dei processi infiammatori.

HASD17B14 sembra essere coinvolto nelle vie metaboliche che contribuiscono al controllo delle prostaglandine e quindi un aumento dell'espressione di questo enzima potrebbe facilmente correlare con un aumento della biodisponibilità di prostaglandine a livello ematico in conseguenza di uno stato infiammatorio.

Anche ACADS si inserisce nel metabolismo degli acidi grassi giustificando la sua elevata espressione con un elevato carico metabolico lipidico.

LRP5 Funge da co-recettore con la famiglia di proteine Frizzled (G protein-coupled receptor attive nel pathway di Wnt).

L'aumento di volume (contenuto in grassi) degli adipociti porta all'instaurarsi di uno stato infiammatorio nelle stesse cellule a causa dell'intervento dei macrofagi. Questo porta ad una riduzione della secrezione di adiponectina ed all'aumento di citochine e chemochine tra cui IL-6, IL-8 ed MCP-1 che è stata riconosciuta responsabile del reclutamento dei macrofagi all'interno del tessuto adiposo.

L'aumentato rilascio di citochine blocca il differenziamento dei preadipociti e ad un conseguente ridotto accumulo lipidico ed induzione di adiponectina che però promuove un accumulo ectopico di lipidi aggravando lo stato infiammatorio.

Sia IL-6 che TNF sono collegati a questo fenomeno di blocco del differenziamento dei preadipociti, questo è a sua volta associato con un incremento della risposta mediata da Wnt che mantiene le cellule in uno stato indifferenziato e pro-infiammatorio.

Lo stato pro-infiammatorio instauratosi induce un'insulino-resistenza locale, compreso una diminuzione dell'effetto inibitorio sul rilascio di FFA che quindi aumentano andando a loro volta ad accentuare lo stato infiammatorio e ricollegandosi a FFAR2 come recettore di queste molecole.

Una diminuzione dei livelli di LRP5 è in apparenza strana in quanto mediatore primario nelle vie Wnt mediate. La sua espressione potrebbe però essere diminuita come meccanismo protettivo nel tentativo di "smuovere" gli adipociti dallo stato indifferenziato in cui si trovano promuovendone il differenziamento ad adipociti e la corretta internalizzazione degli acidi grassi riducendo la concentrazione degli FFA che, come detto, hanno a loro volta, una funzione pro-infiammatoria.

Passando al "comparto" immunitario troviamo come detto TICAM1 noto anche come TRIF che, in base alle nozioni relative ai

sui pathways, possiamo definire come corresponsabile nell'aumentata produzione di citochine pro-infiammatorie ed interferone.

Dai dati attualmente disponibile non sembra evidente un collegamento tra aterosclerosi e IL1RAPL1, possiamo però ipotizzare un suo coinvolgimento qualora considerassimo il collegamento con il recettore dell'interleuchina 1 in quanto la IL-1 è la prima citochina pro-infiammatoria individuata ed è coinvolta nelle reazioni immunitarie alle infezioni virali.

Infine TRAP1 interagisce con due proteine EXT1 ed EXT2 codificanti per Exostosin-1 e 2. EXT1 e 2 sono due enzimi glicosiltransferasici implicati nella biosintesi dell'eparansolfato (HS). A sua volta HS interagisce con svariate proteine promuovendo alcuni importanti processi come angiogenesi e coagulazione, sembra inoltre fungere da recettore per alcune proteine virali anche se molte delle sue funzioni sono ancora oggetto di studio.

Dunque TRAP1 attraverso EXT e HS si ricollega alla regolazione dei processi coagulativi ed angiogenetici che accompagnano le patologie aterosclerotiche.

La nostra speranza per il futuro è quella di procedere nella individuazione e, ove possibile, nella comprensione dei ruoli svolti dai diversi geni la cui alterazione trascrizionale concorre alla definizione delle patologie arteriosclerotiche, per poter individuare delle correlazioni utili a rendere più efficienti, economiche e tempestive le tecniche diagnostiche disponibili per i soggetti a rischio e non.

In questo caso tempestività è sinonimo di drastici aumenti nelle percentuali di sopravvivenza ed economicità correla con la possibilità di eseguire esami meno costosi e più informativi per un numero crescente di persone.

BIBLIOGRAFIA

INTRODUZIONE

1. Mitchell RN. Allograft arteriopathy pathogenesis update. *Cardiovasc Pathol.* 2004; 13: 33-40
2. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature.* 2000; 407: 233-241
3. Cyrus, T, Witztum JL, Rader DJ, Tangirala R, Fazio S, Linton MF, Funk CD. Disruption of 12/15-lipoxygenase diminishes atherosclerosis in apoE-deficient mice. *J.Clin. Invest.* 1999; **103**: 1597–1604
4. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature.* 2002; 420: 868-874
5. Negoro N, Kanayama Y, Haraguchi M, Umetani N, Nishimura M, Konishi Y, Iwai J, Okamura M, Inoue T, Takeda T. Blood pressure regulates platelet-derived growth factor A-chain gene expression in vascular smooth muscle cells *in vivo*. An autocrine mechanism promoting hypertensive vascular hypertrophy. *J. Clin. Invest.* 1995; **95**: 1140–1150
6. Yokoya, K, Takatsu H, Suzuki T, Hosokawa H, Ojio S, Matsubara T, Tanaka T, Watanabe S, Morita N, Nishigaki K, Takemura G, Noda T, Minatoguchi S, Fujiwara H. Process of progression of coronary artery lesions from mild or moderate stenosis to moderate or severe stenosis: a study based on four serial coronary arteriograms per year. *Circulation* 1999; **100**: 903–909
7. Andrew C. Li and Christopher K. Glass The macrophage foam cell as a target for therapeutic intervention. *Nature Med.* 2002; 8 (11): 1235-1242
8. Lowe GD. Different location of atherosclerosis, different risk factors, different therapy? *Pathophysiol Haemost Thromb* 2004; 33: 262-267
9. Faxon DP, Fuster VF, Libby P, Beckman JA, Hiatt WR, Thompson RW, Topper JN, Annex BH, Runback JH, Fabunmi RP, Robertson RM, Loscalzo J. Atherosclerotic vascular disease conference. Writing group III: pathophysiology. *Circulation.* 2004; 109: 2617-2625
10. Waters RE, Terjung RL, Peters GK, Annex BH. Preclinical models of human peripheral arterial occlusive disease: implications for investigation of therapeutic agents. *J Appl Physiol.* 2004; 97: 773-780
11. Kadoglu NP, Liapis CD. Matrix metalloproteinases: contribution to pathogenesis, diagnosis, surveillance and treatment of abdominal aortic aneurysms. *Curr Medical Res Opin.* 2004; 20: 419-432
12. Curci JA, Thompson RW. Adaptive cellular immunity in aortic aneurysms: cause, consequence or context? *J Clin Invest.* 2004; 114: 168-171
13. Alexander JJ. The pathobiology of aortic aneurysms. *J Surg Res.* 2004; 117; 163-175

14. Lemson MS, Tordoir JHM, Daemen MJ, Kitslaar. Intimal hyperplasia in vascular grafts. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2000; 19: 336-350
15. Newby AC, Zaltsman AB. Molecular mechanisms in intimal hyperplasia. *J Pathol.* 2000; 190: 300-309
16. Allaire E, Clowes AW. Endothelial cell injury in cardiovascular surgery: the intimal hyperplastic response. *Ann Thorac Surg.* 1997; 63: 582-591
17. Davis C, Fischer J, Ley K, Sarembock J. The role of inflammation in vascular injury and repair. *J Thromb Haemost.* 2003; 1: 1699
18. Lee MS, David EM, Makkar RR, Wilentz JR. Molecular and cellular basis of restenosis after percutaneous coronary intervention: the intertwining roles of platelets, leukocytes, and coagulation-fibrinolysis system. *J Pathol.* 2004; 203: 861-870
19. Welt FG, Rogers C. Inflammation and restenosis in the stent era. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002; 22: 1769-1776
20. Welt FGP, Edelman ER, Simon DI and Rogers C. Neutrophil, not macrophage, infiltration precedes neointimal thickening in balloon-injured arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000; 20: 2553-2558
21. Ferns GA, Avades TY. The mechanisms of coronary restenosis: insights from experimental models. *J Exp Pathol.* 2000; 81: 63-88
22. Dzau V, Braun-Dullaeus RC, Sedding DG. Vascular proliferation and atherosclerosis: new perspective and therapeutic strategies. *Nature Med.* 2002; 8: 1249-1256
23. Langille BL. Arterial remodeling: relation to hemodynamics. *Can J Physiol Pharmacol.* 1996; 74: 834-841
24. Pasterkamp G, Schoneveld AH, Hijnen DJ, de Kleijn DP, Teepen H, van der Wal AC, Borst C. Atherosclerotic arterial remodeling and the localization of macrophages and matrix metalloproteinases 1, 2 and 9 in the human coronary artery. *Atherosclerosis.* 2000; 150: 245-253
25. Gallis ZS and Khatri JJ. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad and the ugly. *Circ Res.* 2002; 90: 251-262
26. Bosmans JM, Vrints CJ, Kockx MM, Bult H, Cromheeke KMC, Herman AG. Continuous Perivascular L-Arginine delivery increased total vessel area and reduce neointimal thickening after experimental balloon dilatation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999; 19: 767-776
27. Visse R and Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinase: structure, function and biochemistry. *Circ Res.* 2003; 92: 827-839

28. Kuzuya M, Iguchi A. Role of matrix metalloproteinases in vascular remodeling. *J Atheroscler Thromb*. 2003; 10: 275-282
29. McCawley, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: they are not just for matrix anymore! *Curr Opin Cell Biol*. 2001; 13: 534-540
30. George SJ, Dwivedi. MMPs, cadherins, and cell proliferation. *Trends Cardiovasc Med*. 2004; 14: 100-105
31. Dollery CM, McEwan JR, Henney AM. Matrix metalloproteinases and cardiovascular disease. *Circ Res*. 1995; 77: 863-868
32. Feldamn L, Aguirre L, Ziol M, Briduo J, Nevo N, Michel J, Steg P. Interleukin-10 inhibits intimal hyperplasia after angioplasty or stent implantation in hypercholesterolemic rabbits. *Circulation*. 2000; 101(8), 908
33. Mtairag E, Chollet-Martin S, Oudghiri M, Laquay N, Jacob M, Michel J, Feldman L. Effects of interleukin-10 on monocyte/endothelial cell adhesion and MMP-9/TIMP-1 secretion. *Cardiovascular Research*. 2001;49: 882-890
34. Clowes AW, Clowes MM, Reidy MA. Kinetics of cellular proliferation after arterial injury. III. Endothelial and smooth muscle growth in chronically denuded vessels. *Lab Invest*. 1986; 54: 295–303
35. Vasquez G, Occhionorelli S, Santini M, Mascoli F. Iperplasia intinale dopo danno vascolare – un problema irrisolto. *Minerva Cardioangiol*. 1995; 43:111-116
36. Cunningham KS, Gotlieb AI. The role of sear stress in the pathogenesis of atherosclerosis. *Laboratory Investigation*. 2005; 85: 9-23
37. Ojha M, Cobbold RS, Johnston KW. Hemodynamics of side to-end-proximal arterial anastomosis model. *J Vasc Surg*. 1993; 17: 646-655
38. Berk B. Vascular smooth muscle growth: autocrine growth meccanisms. *Physiol Rev*. 2001; 81: 999-1030
39. Sho E, Najio H, Sho M, Kobayashi M, Komatsu M, Kawamura K, Chengpei X, Zarins C, Masuda H. Aterial enlargement, tortuosity and intimal thickening in response to sequential exposure to high and low shear stress. *J Vasc Surg*. 2004; 39: 601-612
40. Coward LJ, Featherstone RL, Brown MM. Percutaneous transluminal angioplasty and stenting for carotid artery stenosis. *Database of Systematic Reviews*. 2004, Issue 1.1-18
41. Gandhi S, Candipan R. A refined angioplasty and stenting technique may offer an alternative to carotid endarterectomy. *J Cardiovasc Nursing*. 2003; 18: 343-346
42. Henry M, Amor M, Klonaris C, Henry I, Masson I, Chati Z, Leborgne E, Hugel M. Angioplasty and stenting of the extracranial carotid arteries. *Tex Hearth Inst J*. 2000; 27: 150-158

43. Ricotta J, O'Brian-Irr M. Conservative management of residual and recurrent lesion after carotid endarterectomy: long-term results. *J Vasc Surg.* 1997; 26: 963-972
44. Wilensky RL. Angiotensin-receptor blockers: revival of the systemic prevention of restenosis? *Cariovasc Drug Therapy.* 2003; 17: 63-73
45. Islam MA, Blankenship JC, Iliadis EA. Effectiveness of transluminal extraction atherectomy for debulking saphenous vein graft in-stent restenosis. *Am J Cardiol.* 2001; 87: 785-788
46. Aupart M, Neville P, Tahir A, Axelroud S, May MA, Sacher A. Indications of coronary artery bypass graft in 2003. *J Cardiovasc Surg.* 2003; 44: 313-318
47. Werba JP, Tremoli E, Massironi P, Camera M, Cannata A, Alamanni F, Biglioli P, Palorali A. statin in coronary bypass surgery: rationale and clinical use. *Ann Thorac Surg.* 2003; 76: 2123-2140
48. Gomberg-Maitland M, Fuster V, Fayad ZA, Badimon JJ, Corti R. Statins and plaque stability. *J Cardiovasc Risk.* 2003; 10: 161-167
49. Mason RP, Walter MF, Jacob RF. Effects of HMG-CoA reductase inhibitors on endothelial function. Role of microdomains and oxidative stress. *Circulation.* 2004; 109 (suppl II): II34-II41
50. Blum A, Simsolo C, Hasin Y. 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a (HMG-CoA) reductase inhibitors (statins), atherosclerosis and coronary syndromes. *Atherosclerosis.* 2004; 175: 1-5
51. Grobbee DE, Bots ML. Statin treatment and progression of atherosclerotic plaque burden. *Drugs* 2003; 63: 893-911
52. Schonbeck U, Libby P. Inflammation, immunity and HMG-CoA reductase inhibitors. Statins as anti-inflammatory agents? *Circulation* 2004; 109 (suppl II): II18-II26
53. Chapman MJ. Fibrates in 2003: therapeutic action in atherogenic dyslipidaemia and future perspectives. *Atherosclerosis* 2003; 171: 1-13
54. Cooper ME. The role of the rennin-angiotensin-aldosterone system in diabetes and in vascular complications. *Am J Hypertens.* 2004; 17: 16S-20S
55. Phillip R, Grech ED. Interventional pharmacotherapy. *BMJ.* 2003; 327: 43-46
56. McNicol A, Israel SJ. Platelets and anti-platelet therapy. *J Pharmacol Sci.* 2003; 93: 381-396
57. Tendera M, Wojakowski W. Role of antiplatelet drugs in the prevention of cardiovascular events. *Thromb Research.* 2003; 110: 355-359
58. Nedeljkovic ZS, Gokce N, Loscalzo J. Mechanisms of oxidative stress and vascular dysfunction. *Postgrad Med J.* 2003; 79: 195-200

59. Jackson JD, Muhlestein JB, Bunch J, Bair TL; Horne BD, Madsen TE, Lappè JM, Anderson JL. Prospective study of 4840 patients undergoing percutaneous coronary revascularization. *Am Heart J.* 2003; 145: 875-881
60. Dens J, Desmet W, Piessens J. An update meta-analysis of calcium-channel blockers in the prevention of restenosis after coronary angioplasty. *Am Heart J.* 2003; 145: 404-408
61. Versaci F, Gaspardone A. Prevention of restenosis after stenting: the emerging role of inflammation. *Coronary Artery Disease.* 2004; 15: 307-311
62. Melo LG, Gneccchi M, Pachori AS, Kong D, Wang K, Liu X, Pratt RE, Dzau VJ. Endothelium-target gene and cell based therapies for cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004; 24: 1761-1774
63. Scharif F, Daly K, Crowley J, O'Brian T. Current status of catheter- and stent-based gene therapy. *Cardiovasc Research.* 2004; 64: 208-216
64. Binder BR, Breuss JM. Regulation of vascular remodelling and cardiovascular protection: NFkB and vascular remodeling. *International Congress Serie* 2004; 1262: 296-299
65. Kitamoto S, Egashira K, Takeshita A. Stress and vascular responses: anti-inflammatory therapeutic strategy against atherosclerosis and restenosis after coronary intervention. *J Pharmacol Sci.* 2003; 91: 192-196
66. Nallamshetty S, Aoki K, San H, Yang ZY, Nabel GJ, Nabel EG. Coexpression of guanylate kinase with thymidine kinase enhances prodrug cell killing in vitro and suppresses vascular smooth muscle cell proliferation in vivo. *Mol Ther.* 2001; 3: 779
67. Hedman M, Hartikainen J, Syvanne M, Stjernvall J, Hedman A, Kivela A, Vanninen E, Mussalo H, Kauppila E, Simula S, Narvanen O, Rantala A, Peuhkurinen K, Nienimen MS, Laakso M, Yla-Herttuala S. Safety and feasibility of catheter based local intracoronary vascular endothelial growth factor gene transfer in the prevention of postangioplasty and in stent restenosis and in the treatment of chronic myocardial ischemia. Phase II results of the Kuopio Angiogenesis Trial (KAT). *Circulation.* 2003; 107: 2677-2683.
68. Kipshidze N, Dangas G, Tsapenko M, Moses J, Leon MB, Kuryk M, Serruys P. Role of endothelium modulating neointimal formation. Vascular protective approaches to attenuate restenosis after percutaneous coronary interventions. *J Am Coll Cardiol.* 2004; 44: 733-739
69. Turunen MP, Punhakka HL, Koponen JK, Hiltunen MO, Rutanen J, Leppanen O, Turunen AM, Narvanen A, Newby AC, Baker AH,

- Yla-Herttuala S. Peptide-retarget adenovirus encoding a tissue inhibitor of metalloproteinase-1 decreases restenosis after intravascular gene transfer. *Mol Ther.* 2002,; 6: 306-312
70. Morishita R. Recent progress in gene therapy for cardiovascular disease. *Circ J.* 2002; 66: 1077-1086
71. Rizas KD. Immune cells and molecular mediators in the pathogenesis of the abdominal aortic aneurysm. *Cardiol Rev.* 2009 Sep-Oct;17(5):201-10
- RISULTATI**
- MGLL**
72. Zimmermann R. Fate of fat: the role of adipose triglyceride lipase in lipolysis. *Biochim Biophys Acta.* 2009 Jun;1791(6):494-500. Epub 2008 Oct 29.
73. Zechner R. Adipose triglyceride lipase and the lipolytic catabolism of cellular fat stores. *J Lipid Res.* 2009 Jan;50(1):3-21. Epub 2008 Oct 23. Review.
74. Saario SM. Monoglyceride lipase as an enzyme hydrolyzing 2-arachidonoylglycerol. *Chem Biodivers.* 2007 Aug;4(8):1903-13.
75. Dinh TP. A role for monoglyceride lipase in 2-arachidonoylglycerol inactivation. *Chem Phys Lipids.* 2002 Dec 31;121(1-2):149-58.
76. Smith WL. Prostaglandin and thromboxane biosynthesis.
77. *Pharmacol Ther.* 1991;49(3):153-79.
- FFAR2**
78. Ichimura A. Free fatty acid receptors act as nutrient sensors to regulate energy homeostasis. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2009 Sep;89(3-4):82-8. Epub 2009 May 19.
79. Stoddart LA. Free fatty acid receptors FFA1, -2, and -3: pharmacology and pathophysiological functions. *Pharmacol Rev.* 2008 Dec;60(4):405-17. Epub 2008 Dec 1.
80. Ge H. Activation of G protein-coupled receptor 43 in adipocytes leads to inhibition of lipolysis and suppression of plasma free fatty acids. *Endocrinology.* 2008 Sep;149(9):4519-26. Epub 2008 May 22.
81. Shah A. Adipose inflammation, insulin resistance, and cardiovascular disease. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 2008 Nov-Dec;32(6):638-44.
82. Hirasawa A. Free fatty acid receptors and drug discovery. *Biol Pharm Bull.* 2008 Oct;31(10):1847-51.
83. Schleicher E. Oxidative stress, AGE, and atherosclerosis. *Kidney Int Suppl.* 2007 Aug;(106):S17-26.
- ADIPOR1**
84. *Eur J Endocrinol.* 2003 Mar;148(3):293-300.

- The role of the novel adipocyte-derived hormone adiponectin in human disease.
Díez JJ, Iglesias P.
85. Physiological and pathophysiological roles of adiponectin and adiponectin receptors in the integrated regulation of metabolic and cardiovascular diseases. Yamauchi T, Kadowaki T. *Int J Obes (Lond)*. 2008 Dec;32 Suppl 7:S13-8.
 86. Adiponectin and its role in cardiovascular diseases. Bełtowski J, Jamroz-Wiśniewska A, Widomska S. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets*. 2008 Mar;8(1):7-46.
 87. Adiponectin and atherosclerotic disease. Shimada K, Miyazaki T, Daida H. *Clin Chim Acta*. 2004 Jun;344(1-2):1-12.
- PLA2G1B**
88. The phospholipase A(2) inhibitor methyl indoxam suppresses diet-induced obesity and glucose intolerance in mice.
Hui DY, Cope MJ, Labonté ED, Chang HT, Shao J, Goka E, Abousalham A, Charmot D, Buysse J.
Br J Pharmacol. 2009 Aug;157(7):1263-9. Epub 2009 Jun 25.
 89. Group IB secretory phospholipase A2 stimulates CXC chemokine ligand 8 production via ERK and NF-kappa B in human neutrophils.
Jo EJ, Lee HY, Lee YN, Kim JI, Kang HK, Park DW, Baek SH, Kwak JY, Bae YS. *J Immunol*. 2004 Nov 15;173(10):6433-9.
 90. Secreted phospholipases A2 induce the expression of chemokines in microvascular endothelium. Beck GCh, Yard BA, Schulte J, Haak M, van Ackern K, van der Woude FJ, Kaszkin M. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003 Jan 17;300(3):731-7.
- HSD17B14**
91. Structure and function of human 17beta-hydroxysteroid dehydrogenases. Lukacik P, Kavanagh KL, Oppermann U. *Mol Cell Endocrinol*. 2006 Mar 27;248(1-2):61-71. Epub 2006 Jan 18.
- ACADS**
92. Acyl-CoA dehydrogenases: Dynamic history of protein family evolution. Swigonová Z, Mohsen AW, Vockley J. *J Mol Evol*. 2009 Aug;69(2):176-93. Epub 2009 Jul 29.
 93. Tein I, Elpeleg O, Ben-Zeev B, et al (February 2008). "Short-chain acyl-CoA dehydrogenase gene mutation (c.319C>T) presents with clinical heterogeneity and is candidate founder mutation in individuals of Ashkenazi Jewish origin". *Mol. Genet. Metab*. 93 (2): 179–89.
- LRP5**
94. Bone. 2007 Jan;40(1):57-67. Epub 2006 Sep 7.
Influence of an LRP5 cytoplasmic SNP on Wnt signaling and osteoblastic differentiation.
Guo J, Cooper LF.

95. Clin Endocrinol (Oxf). 2009 May;70(5):725-31. Epub 2008 Aug
LRP5 in premature adrenarche and in metabolic characteristics of
prepubertal children.
Lappalainen S, Saarinen A, Utriainen P, Voutilainen R.
96. PLoS One. 2008;3(12):e4046. Epub 2008 Dec 24.
Direct inhibition of GSK3beta by the phosphorylated cytoplasmic
domain of LRP6 in Wnt/beta-catenin signaling.
Piao S, Lee SH, Kim H, Yum S, Stamos JL, Xu Y, Lee SJ, Lee J.
97. Calcif Tissue Int. 2009 Mar;84(3):171-9. Epub 2009 Jan 16.
LRP5 Polymorphisms and response to risedronate treatment in
osteoporotic men. Kruk M, Ralston SH, Albagha OM.
98. Basic and clinical aspects of osteoporosis in inflammatory bowel
disease. Rodríguez-Bores L, Barahona-Garrido J, Yamamoto-
Furusho JK. World J Gastroenterol. 2007 Dec 14;13(46):6156-65.
- TICAM1**
99. J Leukoc Biol. 2009 Oct;86(4):863-75. Epub 2009 Aug 5.
Endotoxin tolerance dysregulates MyD88- and Toll/IL-1R domain-
containing adapter inducing IFN-beta-dependent pathways and
increases expression of negative regulators of TLR signaling.
Piao W, Song C, Chen H, Diaz MA, Wahl LM, Fitzgerald KA.
100. J Biol Chem. 2003 Dec 12;278(50):49751-62. Epub 2003 Sep 30.
TIR-containing adapter molecule (TICAM)-2, a bridging adapter
recruiting to toll-like receptor 4 TICAM-1 that induces interferon-
beta. Oshiumi H, Sasai M, Shida K, Fujita T, Matsumoto M, Seya T.
101. Biochem J. 2004 May 15;380(Pt 1):83-93.
Transcriptional regulation of the human TRIF (TIR domain-
containing adaptor protein inducing interferon beta) gene.
Hardy MP, McGettrick AF, O'Neill LA.
- IL1RAPL1**
102. Am J Med Genet A. 2008 Dec 15;146A(24):3167-72.
Novel mutation of IL1RAPL1 gene in a nonspecific X-linked mental
retardation (MRX) family.
Nawara M, Klapceki J, Borg K, Jurek M, Moreno S.
103. J Biol Chem. 2009 Oct 22.
Secretory phospholipase A2, group IIA is a novel serum amyloid a
target gene; Activation of smooth muscle cell expression by an
interleukin-1 receptor-independent mechanism.
Sullivan CP, Seidl S, Rich CB, Raymondjean M, Schreiber BM.
104. Circulation. 2004 Sep 21;110(12):1678-85. Epub 2004 Sep 7.
Interleukin-1 receptor signaling mediates atherosclerosis associated
with bacterial exposure and/or a high-fat diet in a murine
apolipoprotein E heterozygote model: pharmacotherapeutic
implications.

TRAP1

105. J Neurochem. 2009 Jul;110(2):496-508. Epub 2009 Apr 20.
Tumor necrosis factor receptor-associated protein 1 regulates cell adhesion and synaptic morphology via modulation of N-cadherin expression.
106. Kubota K, Inoue K, Hashimoto R, Kumamoto N, Kosuga A. PLoS Biol. 2007 Jul;5(7):e172. Epub 2007 Jun 19.
PINK1 protects against oxidative stress by phosphorylating mitochondrial chaperone TRAP1.
Pridgeon JW, Olzmann JA, Chin LS, Li L.
107. Cancer Lett. 2009 Jun 28;279(1):39-46. Epub 2009 Feb 12.
TRAP1, a novel mitochondrial chaperone responsible for multi-drug resistance and protection from apoptosis in human colorectal carcinoma cells.

DISCUSSIONE

108. Systemic sclerosis-endothelial cell antiangiogenic pentraxin 3 and matrix metalloprotease 12 control human breast cancer tumor vascularization and development in mice.
Margheri F, Serrati S, Lapucci A, Anastasia C, Giusti B, Pucci M, Torre E, Bianchini F, Calorini L, Albini A, Ventura A, Fibbi G. Neoplasia. 2009 Oct;11(10):1106-15.
109. Thrombotic events in high risk patients are predicted by evaluating different pathways of platelet function.
Gori AM, Marcucci R, Paniccia R, Giusti B, Fedi S, Antonucci E, Buonamici P, Antonucci D, Gensini GF, Abbate R. Thromb Haemost. 2008 Dec;100(6):1136-45.
110. Genetic analysis of 56 polymorphisms in 17 genes involved in methionine metabolism in patients with abdominal aortic aneurysm.
Giusti B, Saracini C, Bolli P, Magi A, Abbate R. J Med Genet. 2008 Nov;45(11):721-30. Epub 2008 Jul 17.
111. Atherosclerosis imaging: prognostically useful or merely more of what we know? Kaul P, Douglas PS. Circ Cardiovasc Imaging. 2009 Mar;2(2):150-60.
112. Inhibition of soluble epoxide hydrolase attenuated atherosclerosis, abdominal aortic aneurysm formation, and dyslipidemia.
Zhang LN, Vincelette J, Cheng Y, Mehra U, Chen D, YX. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2009 Sep;29(9):1265-70.
113. HDL antielastase activity prevents smooth muscle cell anoikis, a potential new antiatherogenic property.
Ortiz-Muñoz G, Houard X, Martín-Ventura JL, Ishida BY, Loyau S, Rossignol P, Moreno JA, Kane JP, Chalkley RJ, Burlingame AL, Michel JB, Meilhac O. FASEB J. 2009 Sep;23(9):3129-39. Epub 2009 May 5.

114. The benefit of statins in non-cardiac vascular surgery patients.
Stalenhoef AF.
J Vasc Surg. 2009 Jan;49(1):260-5.
115. TGF-beta and atherosclerosis in man.
Grainger DJ.
Cardiovasc Res. 2007 May 1;74(2):213-22. Epub 2007 Feb 23.

SUMMARY

Atherosclerosis (also known as Arteriosclerotic Vascular Disease or ASVD) is the condition in which an artery wall thickens as the result of a build-up of fatty materials such as cholesterol. It is a syndrome affecting arterial blood vessels, a chronic inflammatory response in the walls of arteries, in large part due to the accumulation of macrophage white blood cells and promoted by Low-density lipoproteins (plasma proteins that carry cholesterol and triglycerides) without adequate removal of fats and cholesterol from the macrophages by functional high density lipoproteins (HDL). It is commonly referred to as a hardening or furring of the arteries. It is caused by the formation of multiple plaques within the arteries.

Other arteriosclerotic disease is aortic aneurysm usually affecting the abdominal tract of the vessel.

The prevalence of abdominal aortic aneurysm (AAA) varies ranging from 4.1% to 11.5% in European men.

This disorder is characterized by localized structural deterioration of the aortic wall, leading to progressive dilatation and eventual aortic rupture. Rupture of AAA is responsible for 1.5% of the total mortality in males over 55 years of age.

Both disease seem to share common causes in alteration in lipid metabolism and immune response against host and oxidised lipids, leading to a condition of chronic inflammation affecting all the vascular system, especially the big diameter arteries.

There are several factors such as smoking, hypertension, hypercholesterolemia and male sex, which are well known risk factors for the development of AAA and carotid stenosis. However, better understanding of molecular mechanisms is an important step toward clarification of the pathophysiology, identification of genetic and molecular biomarkers and development of new therapeutic strategies for AAA and atherosclerosis in general.

Gene expression profiling studies by microarray technologies are particularly appropriate to investigate and create working hypotheses to understand the pathophysiology of complex genetic tracts such as arteriosclerotic diseases. Previous microarray studies focused on AAA utilized RNA derived from aortic tissue samples. The use of tissue samples has several disadvantages, including the difficulty of obtaining control samples and bias introduced by use of normal specimens from non-age-matched cadavers, organ-transplant donors

or patients with different diseases. Peripheral blood is a complex fluid with a high cellular turnover rate that provides physiological connectivity between tissues. Environmental or disease perturbations in the body may leave molecular signatures detectable by analyzing blood-derived RNA. Most importantly, since blood samples can be obtained readily and with little discomfort to patients, biomarkers derived from blood RNA provide an easier integration to clinical and imaging data for the diagnosis and prognosis of AAA and carotid stenosis.

In this study we investigate the gene expression profile of venous whole peripheral blood obtained from AAA patients by using microarray technology to provide insight into systemic pathophysiological processes involved in this disease.

Using the data obtained from the microarray analysis from which we detected 91 genes differentially expressed from patients and positive controls, we selected 10 genes belonging to pathways involved in lipid metabolism and immune response to deep our analysis and eventually confirm the microarray data in order to set up new reliable parameters for arteriosclerosis diseases diagnosis and prognosis.

The genes we chosen are

Lipid Metabolism:

8. Monoglyceride lipase - MGLL - U67963 - 11343
9. Free fatty acid receptor 2 - FFAR2 - AF024690 – 2867
10. Adiponectin receptor 1 - ADIPOR1 - AK001484 – 51094
11. Phospholipase A2, group IB (pancreas) - PLA2G1B - M21054 – 5319
12. Hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 14 - HSD17B14 - NM_016246 3738
13. Acyl-Coenzyme A dehydrogenase, C-2 to C-3 short chain - ACADS Z80345 – 682
14. Low density lipoprotein receptor-related protein 5 - LRP5 - AF077820 - 4041

Immune system:

4. Toll-like receptor adaptor molecule 1 - TICAM1 - AF070530 - 7746
5. Interleukin 1 receptor accessory protein-like 1 - IL1RAPL1 - AJ243874 11141
6. Tumor necrosis factor type 1 receptor-associated protein - TRAP1 NM_016292 – 10131

We designed 10 couples of primers to analyze the expression levels of the genes onto 3 groups of subjects:

1. Control: N=40
2. AAA patients: N=40

3. Patients affected from carotid artery stenosis: N=40

We first analyze the expression levels of the control gene GAPDH of each subject and then we check the expression levels of the all ten genes comparing the resulting C_T values with the ones gotten from the housekeeping gene. The result is the so-called ΔC_T and we got these values for all the 120 subjects for everyone of the 10 genes in duplicates for a total of 1200 ΔC_T values.

Then we compare the average ΔC_T values of the 80 patients (40 AAA + 40 carotid stenosis) with the control values to get the $\Delta\Delta C_T$ values from which calculate the fold number ($2^{-\Delta\Delta C_T} = \text{FOLD}$) that provides a numeric but qualitative value of the expression level of the target gene that allow to compare the values with others present in literature.

Our analysis are only semiquantitative for the moment but we first needed to check the reliability of the experimental approach.

For the future studies we are going to use Taqman® probes to rise the specificity and sensitivity of the analysis, introducing a quantitative method using titration commercial kit that allow to quantify the exact numbers of copies of an m-RNA transcript calculating the exact amount of m-RNA by substituting the C_T values in a linear equation.

We confirmed the microarray data and extended the results to the carotid stenosis patients.

We were able to confirm the genes upregulation and hypothesise that PBMCs could be a suitable base for the detection of novel risk and prognostic indicators for the arteriosclerotic diseases.

In fact our aim is to identify new easy-to-detect markers to predict the risk of developing an artery stenosis or most important, an aneurismatic lesion that is symptomless until the very late phases and whose success in treating is proportional to well-timed diagnosis.

In the end seems that the right direction to look into are the metabolism of lipids and phospholipids, that are involved in eicosanoids production and degradation (via fatty acid metabolism) and cell signalling in the immune system.

COMMENTI e RINGRAZIAMENTI

Vorrei in primis porgere i miei più sentiti ringraziamenti alla Prof.ssa Marialuisa Lavitrano che mi ha permesso di realizzare questa tesi presso il suo laboratorio e che mi ha supportato in questi tre anni nonostante le mille disavventure.

Ringrazio il Prof. G.M. Biasi per avermi dato la possibilità di collaborare con i medici della chirurgia vascolare e di “ficcare il naso” in sala operatoria dove ho potuto imparare molto di ciò che ho scritto in queste pagine.

Ringrazio il Prof. Vanoni responsabile di questo dottorato per la pazienza dimostrata nel sopportare i frequenti ritardi nelle scadenze.

Ringrazio la Dott.ssa Mauri ed i responsabili dell'organizzazione per aver dimostrato professionalità ma soprattutto un'estrema gentilezza nell'accondiscendere a richieste non sempre eque.

Molti mancano in questo elenco ma riceveranno i miei ringraziamenti in altre forme.

*Grazie a tutti quelli che mi hanno sopportato e mi sopportano:
SM, MB, AV, RG, MGC, AC, BS, DM, LM, LF, AS, MV, FLR, EM, DS, FP,
EG, RN, VM e LRN.*