

II PARTE

HDL e aterosclerosi

E' ormai assodato, che il rischio prematuro di sviluppare aterosclerosi è inversamente correlato alla concentrazione plasmatica di colesterolo HDL (HDL-C) (Boden WE., 2000; Gary F., 2005). Una delle maggiori azioni che conferisce alle particelle HDL tale proprietà, consiste nel loro ruolo chiave nel trasporto del colesterolo in eccesso, dai tessuti periferici al fegato o ai tessuti steroidogenici, dove è convertito rispettivamente in sali biliari o in ormoni steroidei (figura 11). Tale processo è denominato da Glomset, nel 1967, "trasporto inverso del colesterolo" (RCT) (Owen JS and Mulcahy JV, 2002). Il metabolismo delle HDL è un processo complesso ed è influenzato da numerosi fattori. La comprensione degli eventi molecolari implicati nella formazione e nel rimodellamento intravascolare delle particelle HDL, così come l'identificazione dei fattori chiave che controllano il flusso di colesterolo tramite il pool delle HDL, rappresenta un punto cardine nello sviluppo di strategie terapeutiche innovative, volte ad aumentare l'RCT mediato dalle HDL. Le HDL possiedono tuttavia molte altre proprietà che possono contribuire alla loro azione anti-aterogena, in particolare è importante il contributo che queste lipoproteine manifestano nel processo di riparo endoteliale.

HDL nel trasporto inverso del colesterolo (*RCT*)

Il colesterolo è un componente essenziale delle membrane eucariotiche ed è un precursore nella sintesi degli acidi biliari e degli ormoni steroidei. Esso riduce la fluidità della membrana contrastando l'azione degli acidi grassi insaturi presenti nei fosfolipidi. Il colesterolo è abbondante nella membrana plasmatica ed in quella dell'apparato del Golgi (Lange Y, 1991), specialmente nelle "lipid rafts", ossia aree della membrana plasmatica ricche di proteine che partecipano a vie di trasduzione del segnale (Simons K and Ehehalt

R, 2002). La regolazione dei livelli di colesterolo è un processo complicato, che coinvolge l'uptake del colesterolo, la biosintesi, il trasporto, il metabolismo e la secrezione (R.Ohashi, 2005).

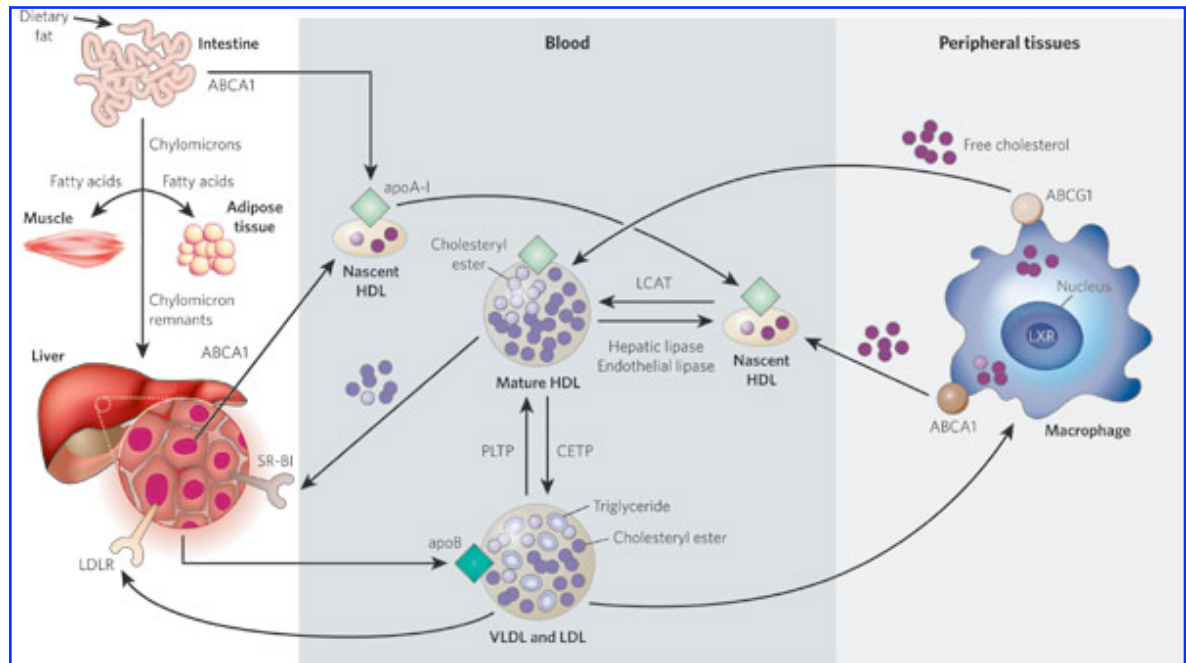


Figura 1. Il trasporto inverso del colesterolo (RCT)

Questo complesso network omeostatico opera sia a livello cellulare che plasmatico. La sintesi endogena di colesterolo avviene soprattutto a livello epatico, in misura minore nell'intestino, e poiché, come gli altri lipidi il colesterolo è di natura idrofobica, nel plasma viene trasportato come componente di grossi complessi macromolecolari chiamate lipoproteine (Stryer L, ; Gary F. 2005).

Quasi tutte le cellule animali sintetizzano colesterolo. Come per gli acidi grassi, esso è sintetizzato a partire dall'acetil-coenzima A (acetil-CoA), ma a differenza dei primi, non può essere ossidato completamente a CO₂. In aggiunta a quello sintetizzato de novo al loro interno, le cellule acquisiscono colesterolo anche dalle lipoproteine circolanti. Quando il colesterolo cellulare è in eccesso, tanto da superare la possibilità di associazione con i fosfolipidi nelle membrane o l'esterificazione e lo stoccaggio in goccioline lipidiche, diviene

citotossico (Tabas I., 2002), con formazione di cristalli di colesterolo, di ossisteroli tossici e la disorganizzazione dei domini di membrana cruciali per il funzionamento di particolari enzimi e molecole segnale.

I livelli di colesterolo vengono controllati dalla cellula tramite alcuni recettori nucleari/fattori di trascrizione, come l'eterodimero "liver X receptor/retinoid X receptor" (LXR/RXR) (Kalaany NY and Mangelsdorf DJ, 2006). LXR, esistente in due principali isoforme LXR α e/o LXR β , può attivare la trascrizione di vari trasportatori di colesterolo della classe ABC ("ATP-binding cassette transporters"), di geni coinvolti nella sintesi e nella circolazione enteroepatica degli acidi biliari e di geni coinvolti nel metabolismo dei trigliceridi. LXR è attivato, a sua volta, da metaboliti idrossilati del colesterolo, da intermedi della via biosintetica del colesterolo e, debolmente, dal colesterolo stesso (Janowski BA et al., 1999; Yang C et al., 2006; Wong J et al., 2006). Probabilmente, per la cellula, gli steroli idrossilati fungono da segnale di pericolo, capace di indicare l'aumento della quota di colesterolo non esterificato tossico; in tali condizioni, viene stimolata l'attivazione delle vie LXR-dipendenti (Attie AD, 2007). L'attivazione del recettore LXR è stata proposta quale potenziale strategia terapeutica per incrementare i livelli di HDL e contrastare l'aterosclerosi (Joseph SB and Tontonoz P, 2003). Purtroppo, tale strategia provoca, in vivo, un aumento dei trigliceridi plasmatici a causa dell'induzione del fattore SREBP-1c, che controlla l'espressione di geni coinvolti riconosciuto capace di mediare anche l'efflusso di colesterolo libero ad accettori ricchi in fosfolipidi quali le HDL (Ji Y, et al., 1997).

Le HDL nascenti, precursori delle HDL, sono secrete dal fegato e dall'intestino in forma di piccole particelle contenenti l'apoptroteina A I, (apoA-I), e pochi fosfolipidi, con una mobilità elettroforetica del tipo pre- β (Asztalos BF, 2005). Le pre- β 1-HDL rappresentano solo una piccola componente del plasma e generalmente contengono 2 molecole di Apo-AI per particella, e circa il 10% della massa è costituita da lipidi (colesterolo libero e

fosfolipidi) (Kunitake ST, 1985). Più precisamente nel RCT sono coinvolte le pre β ₁-HDL, considerati i principali accettori iniziali di colesterolo nel processo di efflusso di colesterolo, mediato dall'azione della proteina di trasporto ABCA1 (ATP-binding cassette transporter) (Fielding CJ, et al., 1995). La formazione delle particelle di forma discoidale pre β ₁-HDL può avvenire inoltre, a partire da ApoA-1 libere, che acquisiscono fosfolipidi e colesterolo da cellule epatiche e non. Simili particelle si originano anche durante il rimodellamento delle HDL mature, e in seguito a lipolisi, catalizzata dalla lipasi lipoproteica (LPL), dei chilomicroni e delle VLDL (lipoproteine ricche di trigliceridi) (Hennessy LK, 1993; Brewer B. 2004; Assmann G., 2004).

L'efflusso di colesterolo è definito come il trasferimento di molecole di colesterolo libero (FC) dalla cellula ad un accettore extracellulare (Johnson WJ, Rothblat GH, et al., 1991). Se ABCA1 media l'efflusso unidirezionale di colesterolo alle particelle pre- β ₁-HDL, come abbiamo visto precedentemente, un altro trasportatore della classe dei trasportatori ABC, ABCG1, media l'efflusso e particelle HDL mature. All'efflusso contribuiscono inoltre a diffusione acquosa, che può essere mediata da SR-BI, (Yancey PG, et al., 2003).

MATURAZIONE E RIMODELLAMENTO INTRAVASCOLARE DELLE PARTICELLE HDL MEDIANTE ESTERIFICAZIONE, SCAMBIO LIPIDICO E MODIFICAZIONI LIPOLITICHE.

La biosintesi e l'iniziale lipidazione delle HDL nascenti procede con la progressiva maturazione e rimodellamento intravascolare, che coinvolge numerosi fattori di trasferimento di lipidi ed enzimi lipolitici (figura 11).

Una volta che il colesterolo libero viene associato alle HDL nascenti le pre β ₁-HDL diventano particelle più grandi chiamate pre β ₂-HDL (Cipollone F., 2004). Queste sono il substrato dell'enzima lecitina-colesterolo acil transferasi (LCAT), enzima chiave attivato dall'apoA-1, che esterifica il colesterolo veicolandolo nel core di queste lipoproteine,

trasformandole in particelle sferiche HDL3 (o α 3-HDL). LCAT catalizza il trasferimento di due gruppi acilici dalla lecitina al colesterolo libero, generando colesterolo estere (CE) e lisolecitina. La riduzione del contenuto in colesterolo libero nella superficie delle HDL, genera un gradiente, che favorisce l'ulteriore trasferimento di colesterolo libero dalla cellule alle HDL (Jonas A., 2000).

Le HDL3 ancora dense e relativamente povere in lipidi, si arricchiscono così progressivamente di colesterolo, fosfolipidi e altre apolipoproteine dalle cellule periferiche o dai chilomicroni derivanti dalla dieta. Le HDL3, possono inoltre fondere per dar luogo a particelle di più grande dimensione, ad opera della proteina di trasferimento dei fosfolipidi (PLTP), in grado anche di aggiungere altri fosfolipidi e la cui espressione è associata ad un aumento della suscettibilità all'aterosclerosi (Van Haperen R., 2000). Questo porta alla formazione delle HDL2 (o α 2-HDL), più grandi, meno dense e ricche in lipidi (Gary F. 2005; Cipollone F., 2004; Ohaschi R., 2004) (figura 12).

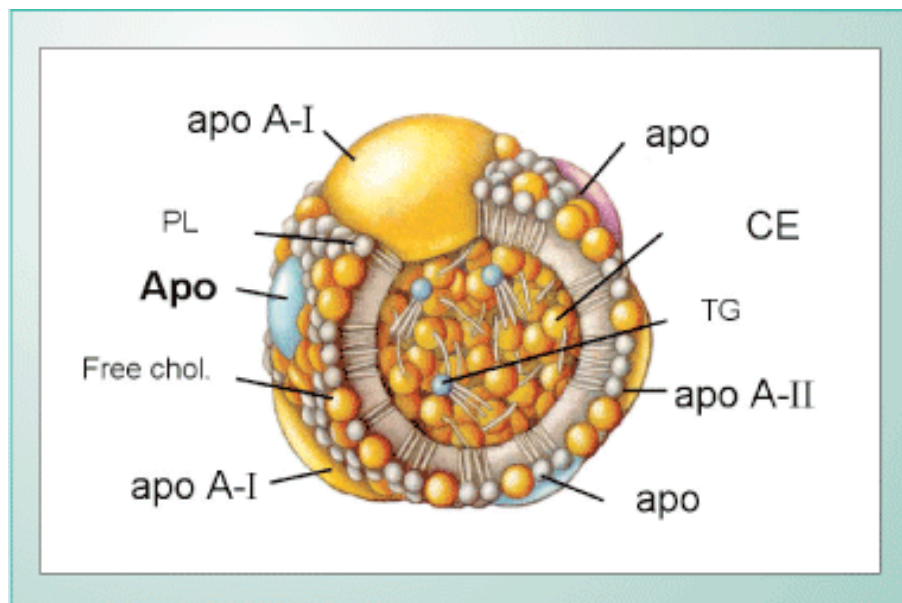


Figura 2. Modello della struttura delle HDL. Apo=apolipoproteina; PL=fosfolipidi; chol=colesterolo; CE=colesterolo estere; TG=trigliceridi

Durante il processo di degradazione delle HDL, il colesterolo estere viene rimosso dalle HDL2, convertendole in HDL 3 povere in lipidi principalmente mediante un processo noto come "up-take selettivo dei lipidi", mediato dal recettore scavenger epatico B1 (SR-BI), responsabile della rimozione del colesterolo estere dalle HDL, facilitandone l'escrezione con la bile (ultimo step del RCT) (Cipollone F. 2004; Linsel-Nitschke P. et al, 2005; Curtiss L. K., 2006). Alternativamente, attraverso l'attività della CEPT (cholesteryl ester transfer protein) presente nel plasma legata alle lipoproteine e sintetizzata principalmente dal fegato avviene la redistribuzione e l'equilibramento dei lipidi idrofobici, "impacchettati" all'interno del core delle lipoproteine (CE e TG) tra le HDL e le lipoproteine contenenti apoB (LDL, IDL, VLDL, chilomicroni, e remnants). Il risultato dell'azione della CEPT sulle HDL2 è una deplezione di CE e un arricchimento in trigliceridi, che determina una netta riduzione delle dimensioni delle particelle. Queste diventano substrato della lipasi epatica (HL), un enzima lipolitico sintetizzato dagli epatociti che ha entrambe le attività TG lipasi e fosfolipasica (Santamarina-Fojo S., 2004). La lipoproteina lipasi (LPL) invece, secreta da diversi tessuti, in particolare nel tessuto adiposo e nel muscolo (R.Ohashi, 2005), è presente sulla superficie luminale delle cellule endoteliali, dove è legata all'omodimero dell'eparan solfato; ha principalmente un'attività lipasica nei confronti dei trigliceridi, e una minor attività fosfolipasica. Nel processo di idrolisi delle TRL (proteine ricche di trigliceridi), i lipidi di superficie (colesterolo libero e fosfolipidi) e le apolipoproteine sono trasferite dalle TRL alle particelle HDL contribuendo significativamente alla concentrazione di colesterolo HDL e delle apoA-1 ad esse associate (Santamarina-Fojo S., 2004).

Un decremento dell'attività CEPT può incrementare HDL-C e ridurre VLDL-C e LDL-C e studi clinici hanno dimostrato una bassa prevalenza di patologie coronariche in pazienti con una deficienza di CEPT (R.Ohashi, 2005).

SR-BI

SR-BI mostra una forte omologia di sequenza con CD36 e con altre proteine della stessa famiglia (Krieger M., 1999; Williams DL, et al., 1999). E' una glicoproteina di 509 aminoacidi e 82kDa ed ha una struttura a ferro di cavallo, con un ampio loop extracellulare ancorato alla membrana plasmatica attraverso i domini transmembrana ammino- e carbossi-terminali, ed una corta estensione intracellulare (Acton S et al., 1994) (figura 13).

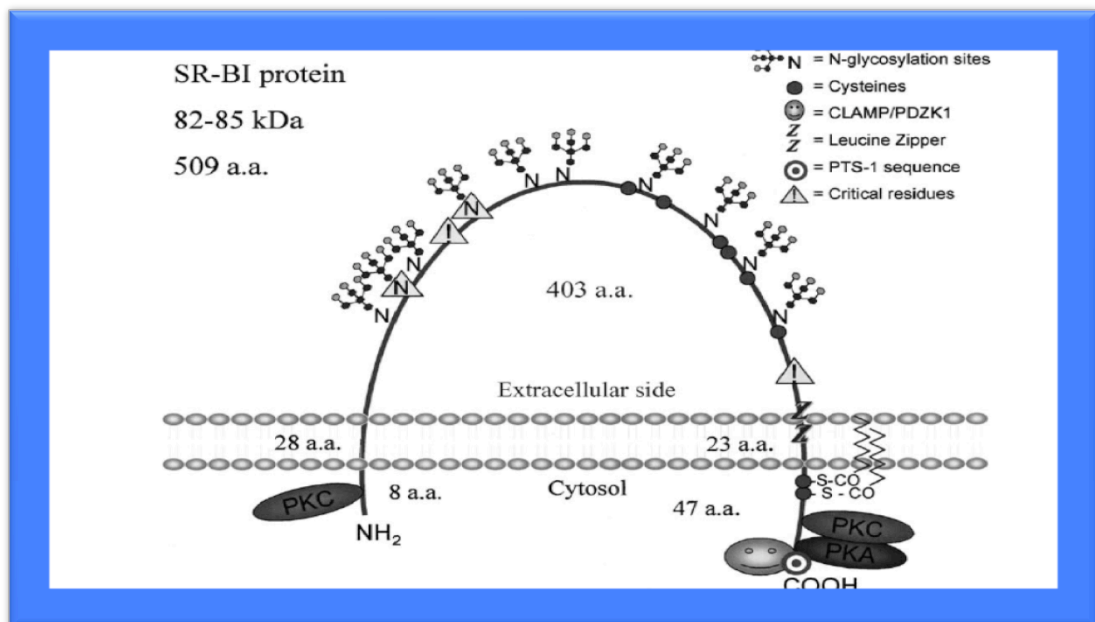


Figura 3 Struttura della proteina SR-BI

SR-BI è una proteina di membrana espressa principalmente nel fegato, nella corteccia surrenale, nelle gonadi, ma anche nelle cellule endoteliali, nelle cellule muscolari lisce, e nei monociti, a livello di invaginazioni della membrana plasmatica prive di clatrina, dette caveolae (Owen JS. et al., 2002). L'espressione di SR-BI è regolata fisiologicamente tramite vari meccanismi. Un incremento dell'espressione di SR-BI avviene nella differenziazione dei monociti e nei macrofagi presenti a livello delle lesioni aterosclerotiche

(Chinetti G, et al., 2000). L'espressione di SR-BI è indotta anche da agonisti per i recettori della famiglia dei peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs), PPAR α e PPAR γ , dato riscontrato sia in cellule in coltura che in animali trattati (Chinetti G, et al., 2000). Da uno splicing-alternativo dell'mRNA per SR-BI si ottiene una proteina, detta SR-BII o SR-BI.2, che ha un dominio citoplasmatico carbossi-terminale completamente diverso. SR-BII media sia l'uptake selettivo del colesterolo derivante dalle HDL che l'efflusso di colesterolo HDL-dipendente, ma con una efficacia nettamente inferiore, suggerendo l'importanza del dominio citoplasmatico carbossi-terminale per la corretta funzionalità di SR-BI (Webb NR, et al., 1998).

SR-BI media selettivamente l'interazione con le HDL nelle cellule dei tessuti sopra descritti e l'efflusso cellulare di colesterolo verso accettori quali le HDL mature (Ji Y, et al., 1997; Gu X, et al., 2000). Il flusso mediato da SR-BI risulta essere bidirezionale e, come per il meccanismo della diffusione acquosa, il trasferimento di colesterolo libero (FC) attraverso SR-BI dipende dalla direzione del gradiente di concentrazione (Yancey PG, et al., 2003). Recenti studi hanno evidenziato che bloccando il legame delle HDL a SR-BI con anticorpi specifici si osserva una notevole inibizione dell'efflusso di colesterolo, suggerendo che il legame delle HDL sia necessario per l'efflusso SR-BI-mediato (Gu X, et al., 2000). Un requisito essenziale per l'attività di SR-BI è la presenza di fosfolipidi nell'accettore: infatti, non si osserva alcun efflusso verso apolipoproteine prive di lipidi.

A supporto di tale affermazione vi sono dati sperimentali che indicano che l'arricchimento delle HDL o del siero con fosfolipidi incrementa l'efflusso SR-BI-mediato, mentre la deplezione di fosfolipidi delle HDL tramite trattamento con fosfolipasi A2 (PLA2) diminuisce l'entità di tale efflusso (Yancey PG, et al., 2000; Jian B, et al., 1997). L'efflusso SR-BI-mediato è influenzato anche dalla natura dei fosfolipidi. I dettagli del meccanismo attraverso cui SR-BI facilita il flusso bidirezionale di FC restano ancora da chiarire (Yancey PG, et al., 2003).

Nei roditori, il recettore SR-BI sembra quindi il maggior responsabile del metabolismo delle HDL. Infatti, studi nei topi mostrano come l'overespressione epatica di SR-BI, riduca in modo rilevante i livelli plasmatici di HDL-C e incrementi la secrezione biliare di colesterolo (Kozarsk K.F. et al., 2000; Ueda Y. et al. 1999; Ji Y., Jian B., et al. 1997). Diversamente, la parziale o la completa mancanza di questo recettore nei topi knock-out, determina un aumento di circa 2 volte del colesterolo plasmatico, con la tendenza alla formazione di HDL ricche in colesterolo (Rigotti A., et al. 1997; Osgood D., et al. 2003). Nell'uomo, ad oggi non sono state identificate mutazioni di SR-BI che influiscano sulla sua azione, e che stabiliscano quindi una chiara rilevanza di questo recettore nel modulare i livelli plasmatici di colesterolo HDL, e nell'RCT. In ogni caso l'omologo umano di SR-BI, Cla-1, mostra una distribuzione tessutale e un uptake di HDL-CE simile a quello murino (Rhainds D. et al. 2004). Nonostante ciò, studi epidemiologici hanno identificato dei polimorfismi nel gene Cla-1, che sono associati non solo ai livelli plasmatici di HDL-C o colesterolo LDL (LDL-C), ma anche alle dimensioni delle particelle lipoproteiche e alle patologie coronariche. Questo supporta quindi l'idea, che SR-BI possa essere intimamente coinvolto nel metabolismo delle HDL nell'uomo (Osgood D., et al. 2003).

RUOLO DELLE HDL E DI SR-BI NEL PROMUOVERE LA RIPARAZIONE ENDOTELIALE

Nonostante il diverso rischio di sviluppare aterosclerosi sia correlato a differenti livelli plasmatici delle HDL e dell'apoA-I, esso non è relazionato a differenze nell' RCT. Infatti studi su animali mostrano che i livelli di HDL circolanti, o di ApoA-I non sono dettate dall'RCT (Groen AK et al. 2001; Jolley CD et al., 1998; Osono Y et al., 1996).

Le HDL possiedono tuttavia molte altre proprietà che possono contribuire alla loro azione anti-aterogena. Ad esempio sono dotate di attività antiossidante, antiinfiammatoria e attività antitrombotica, tramite un'azione diretta sull'endotelio vascolare (Mineo et al. 2006). Ciò nonostante l'entità dei processi attraverso cui le HDL regolano direttamente il fenotipo di nuovi target cellulari come ad esempio le cellule endoteliali, rimangono ancora poco chiare (Mineo C. and Shaul PW., 2007).

Le cellule endoteliali in aggiunta alla loro capacità antiinfiammatoria e alle proprietà antitrombotiche, hanno una forte abilità di crescita, migrare e partecipare al processo di angiogenesi, che sottende la neovascolarizzazione e il mantenimento dello strato intinale (Kawasaki et al. 2003). L'interruzione dell'intima, causato sia da una pesante denudazione relativa ad un intervento vascolare, sia alla formazione di un gap tra le cellule endoteliali, causato ad esempio dallo shear stress, pone il vaso arterioso ad un grande rischio vascolare (Cunningham and Gotlieb, 2005; Ross et al., 1993; Ishibashi et al. 1993).

Sostanziali evidenze nel topo, suggeriscono un ruolo ateroprotettivo di SR-BI. Infatti, la completa delezione di SR-BI è associata a un significativo incremento dell'aterosclerosi in topi nutriti con dieta ricca in grassi e colesterolo (Van Eck M., et al. 2003), così come ad un accelerato sviluppo della placca in modelli animali suscettibili a sviluppare l'arteriosclerosi (apoE-KO) (Trigatti B., et al. 1999). Diversamente nel topo l'over-espressione epatica di SR-BI porta a una riduzione dell'aterosclerosi confermando il ruolo di questo recettore nello step finale dell' RCT, nel promuovere l'efflusso di colesterolo

verso il fegato. In ogni caso diversi meccanismi possono contribuire a questo effetto. Non è semplice comprendere in modo chiaro il contributo tessuto-specifico di SR-BI nella protezione nei confronti dell'aterosclerosi, a causa delle diverse proprietà attribuite a questo recettore e ai molteplici ligandi ai quali SR-BI si lega; questi includono non solo le HDL e le OxLDL ma anche fosfolipidi, cellule apoptotiche e la proteina amiloide A della fase acuta, tutte rilevanti nell'aterogenesi. Oltre alla sua capacità di facilitare il selettivo uptake di CE, altri meccanismi tessuto-specifici che contribuiscono alle proprietà antiaterogene di SR-BI possono includere: (a) l'attivazione di eNOS, e quindi la produzione di ossido nitrico, antiaterogeno, nell'endotelio vascolare (Yuhanna, I.S., et al. 2001, Li, X.A., et al. 2002); (b) il contributo nel primo step dell'RCT, mediando l'efflusso di colesterolo libero (FC) dai tessuti periferici, incluso i macrofagi (Covey, S.D. et al. 2003; Zhang, W., et al. 2003; Van Eck, M. et al., 2004); (c) induzione di apoptosi nelle cellule endoteliali danneggiate (Li, X.A. Guo, 2005); (d) il riconoscimento e la fagocitosi delle cellule apoptotiche da parte dei macrofagi incrementando l'azione antiossidante nelle cellule dei vasi arteriosi (Goti D., et al. 2001).

Nel nostro laboratorio a Parigi, sono stati in precedenza creati topi SR-BI knockout condizionali, ossia modelli animali nei quali l'espressione di SR-BI può essere alterata in specifici tipi cellulari e tessuti, attraverso la tecnologia Cre-LoxP. Esperimenti che hanno impiegato questi modelli animali, in particolare topi con specifica delezione epatica di SR-BI, hanno mostrato che in aggiunta al ruolo ateroprotettivo nel fegato, SR-BI mostra proprietà antiaterogene e antinfiammatorie nei tessuti periferici (Huby T. et al., 2006). Nelle cellule endoteliali ad esempio, SR-BI facilita l'effetto promodulatorio delle HDL sull'ossido nitrico sintasi endoteliale (eNos), aumentando la disponibilità di NO, potente molecola segnale (Yuhanna IS., et al., 2001). L'incremento della produzione di NO indotta dalle HDL, può essere centrale nella comprensione delle proprietà ateroprotettive delle HDL, infatti, la ridotta disponibilità di NO ha un ruolo chiave nella patogenesi di patologie

vascolari e aterosclerosi, indotte da ipercolesterolemia.

SR-BI, inoltre funge da recettore per il virus dell'epatite C ed è necessario per l'infezione virale. Di rilevante importanza è l'ipotesi che sia in grado di mediare il legame e l'uptake del LPS, il componente principale dei batteri gram negativi; tale affermazione è supportata dall'osservazione che i topi mancanti del gene per SR-BI sono più suscettibili alla morte indotta da LPS. Alcuni gruppi di ricerca attribuiscono quest'azione all'effetto protettivo di SR-BI nell'inibire la tossicità indotta da NO (Li, X.A. et al., 2006). Diversamente il gruppo di Lei Cai e colleghi suggerisce che SR-BI protegga dallo stress endotossico, promuovendo la produzione di glucocorticoidi e la clearance epatica dell'LPS (Cai L et al., 2008).

Ruolo delle HDL nella regolazione dell'apoptosi, proliferazione e migrazione delle cellule endoteliali.

Apoptosi

Diverse evidenze mostrano che l'apoptosi delle cellule endoteliali contribuisca alla patogenesi dell'aterosclerosi. Inoltre l'alterazione della funzione endoteliale, che culmina con un evento coronarico acuto, potrebbe essere mediata, da membrane pro-trombogene, definite "microparticelle", rilasciate dalle cellule endoteliali apoptotiche (Mallat Z et al., 2000; Martinez MC. et al., 2005). Riguardo il ruolo delle HDL nella regolazione dell'apoptosi sono suggeriti diversi meccanismi. Ad esempio si ritiene che le HDL siano in grado di prevenire la morte delle cellule endoteliali evitando l'accumulo intracellulare di Ca^{2+} , indotta dalle OxLDL (figura 14).

Le HDL sono inoltre in grado di inibire l'apoptosi causata dal $TNF-\alpha$, attraverso la regolazione della caspasi 3, componente fondamentale del processo apoptotico (Sugano M et al. 2000). Recenti studi suggeriscono invece un potenziale ruolo di SR-BI nella regolazione dell'apoptosi. In particolare alcuni ricercatori suggeriscono che in condizioni normali prevalga l'azione antiapoptotica dell'NO, mentre in presenza di bassi livelli di HDL,

SR-BI possa promuovere la morte cellulare (Li XA et al., 2005).

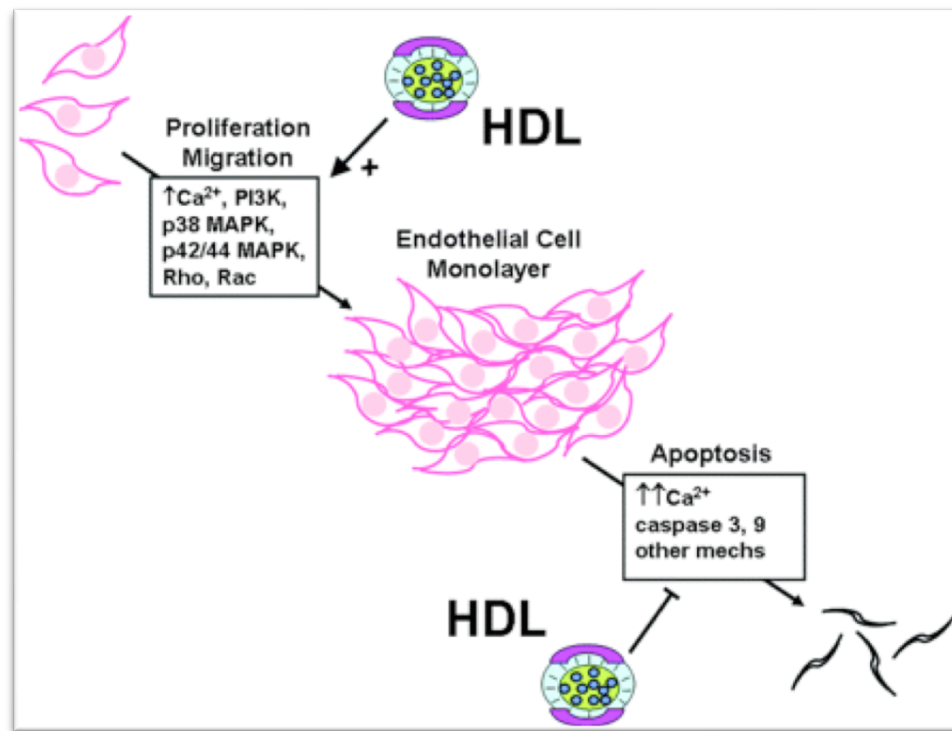


Figura 14 Ruolo delle HDL nel promuovere l'integrità del monostrato endoteliale

Proliferazione e Migrazione

I processi di proliferazione e migrazione delle cellule endoteliali stanno alla base sia della neovascolarizzazione sia di un'efficace risposta al danno vascolare. Dal 1980 esistono evidenze che le HDL promuovano la proliferazione cellulare (Tauber JP et al., 1981) tramite un meccanismo dipendente dal Ca^{2+} (Tamagaki T et al., 1996) (figura 14). Recenti studi hanno suggerito che il segnale iniziato dall'interazione SR-BI-HDL promuova il riparo endoteliale, favorendo la migrazione cellulare. Questo effetto sembra sia mediato con un meccanismo indipendente dall'NO che coinvolge l'attivazione della proteina GTPasi RAC; un nuovo meccanismo d'azione legato al ruolo delle HDL sulla salute e sulle patologie vascolari (Seetharam D. et al., 2006).

Scopo della Ricerca

(II Parte)

E' ormai assodato l'importante ruolo dell'endotelio nel processo che porta ad aterosclerosi e alla formazione della placca aterosclerotica. Esistono consistenti evidenze sperimentali che le HDL e il loro principale recettore, SR-BI, conferiscono una certa protezione cardiovascolare. SR-BI è il recettore fisiologico delle HDL che facilita il trasporto di colesterolo e gioca quindi nei topi, un ruolo chiave nella regolazione dei livelli plasmatici di HDL. Inoltre recenti studi, suggeriscono che l'interazione HDL/SR-BI promuova il riparo endoteliale.

Nella ricerca sperimentale scaturisce l'esigenza di isolare le cellule endoteliali, e poter determinare l'espressione dei geni; questo per valutare in vivo la risposta di tali cellule in seguito al trattamento con diversi stimoli pro o anti infiammatori o in seguito al trattamento con farmaci. Lo scopo della ricerca, alla quale ho preso parte presso Hôpital de la Pitié, Paris, è stato quello di mettere a punto un protocollo per isolare le cellule endoteliali dall'aorta di topo e valutarne in seguito l'espressione genica. Per la validazione abbiamo applicato il nostro metodo a topi iniettati con LPS. In seguito è stato condotto un esperimento preliminare su un nuovo modello animale; esso è stato creato per investigare lo specifico contributo di SR-BI, espresso nelle cellule endoteliali, nel processo aterosclerotico e nell'infiammazione vascolare indotta da stimoli infiammatori e pro-aterogeni, quali le endotossine e l'ipercolesterolemia.

Infatti il gruppo di ricerca del professor Huby T., ha recentemente mostrato in un nuovo modello animale KO SR-BI condizionale, che in aggiunta al suo ruolo ateroprotettivo nel fegato, SR-BI mostra proprietà antiaterogene e antiinfiammatorie nei tessuti periferici (Huby T., 2006). Altri studi inoltre, hanno mostrato che SR-BI facilita l'effetto pro-modulatorio delle HDL nelle cellule endoteliali ma che allo stesso modo, l'interazione tra SR-BI-HDL contribuisce al riparo endoteliale, promuovendo la migrazione cellulare (Seetharam et al., 2006). Un nuovo meccanismo d'azione che può essere coinvolto nell'impatto delle HDL nella salute vascolare.

Materiali e Metodi

(II Parte)

Generazione dei modelli animali utilizzati

I topi utilizzati sono stati ottenuti in un ceppo suscettibile a sviluppare aterosclerosi C57BL/6 già presenti nel nostro laboratorio. I topi condizionali SR-BI^{flox/flox} sono stati creati dal dottor Thierry Huby come riportato (Huby T., 2006). In particolare questi topi hanno la caratteristica di avere una parte del gene di SR-BI localizzata tra 2 sequenze di 34 bp chiamate LoxP, che consistono di due sequenze palindromiche di 13bp fiancheggianti un core di 8bp.

I topi SR-BI^{KO-ENDO} con la delezione specifica di SR-BI nelle cellule endoteliali, sono stati ottenuti incrociando i topi SR-BI^{flox/flox} con il modello di topo transgenico TIE2-CRE creato dal dottor Masashi Yanagisawa e colleghi (Kisanuki YY, 2001) (figura 15). Quest'ultimo ha la caratteristica di esprimere il gene della ricombinasi Cre sotto il controllo del promotore/enhancer del recettore della tirosina chinasi Tek, che ha mostrato conferire un'espressione uniforme di SR-BI nelle cellule endoteliali durante l'embriogenesi e l'età adulta. L'enzima Cre Ricombinasi dal batteriofago P1, excide una sequenza di DNA tra due siti LoxP, (nel nostro caso il gene per SR-BI), con un'efficienza veramente elevata sia in cellule di mammifero in cultura che in topo (figura 15). Tramite la genotipizzazione abbiamo selezionato i topi SR-BI^{KO ENDO}, che mancano dell'espressione del gene per SR-BI (SR-BI knock-out condizionale) solo nelle cellule endoteliali, che è invece espresso in tutte le altre cellule.

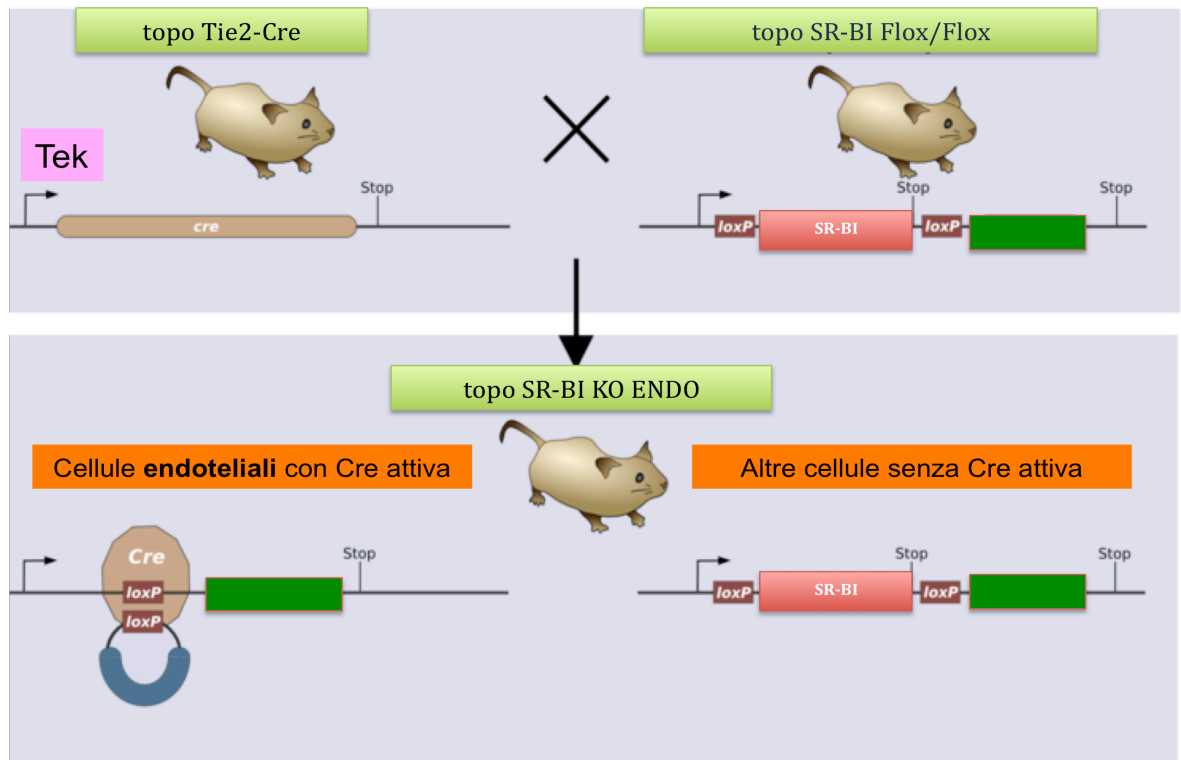


Figura 15 Generazione e dei topi SR-BI^{KO-ENDO}

Isolamento di cellule endoteliali da aorta di topo.

Materiale

Ferri chirurgici

collagenasi Type II (1680 units/mg) (Invitrogen)

collagenase D (Roche 2 mg/ml)

cell strainer 70 um (BD Biosciences)

PBS 1X

Buffer (PBS 1X, 0.5% BSA, 2mM EDTA)

Fc blocking solution (Miltenyi Biotec)

Biotin anti-mouse CD31 (PECAM1) (eBioscience)

biotin anti-mouse CD105 (Endoglin) (eBioscience)

streptavidin microbeads (Miltenyi Biotec)

Anti-Mouse CD 45 microbeads (Miltenyi Biotec).

Protocollo

Nella messa a punto del protocollo per l'isolamento delle cellule endoteliali da aorta di topo sono state testate diverse strategie. In particolare, abbiamo impiegato per la digestione dell'aorta totale differenti tipi e combinazioni di collagenasi a diversi tempi d'incubazione. Abbiamo inoltre applicato il metodo utilizzato per l'isolamento delle cellule endoteliali da cordone ombelicale, ma date le ridotte dimensioni dell'aorta di topo questa metodica ha portato a scarsi risultati in termini di numero di cellule isolate.

Il protocollo che ha portato a un miglior successo in termini di purezza delle cellule isolate, è il seguente:

Per ogni esperimento sono stati impiegati 4 topi ed è stato fatto un pool di 4 aorte:

- Ciascun topo è anestetizzato con O₂/isofluorano e eutanizzato mediante dislocazione cervicale, seguita da esposizione della cavità toracica,
- Incidere l'aorta addominale a livello della biforcazione iliaca e perfondere il cuore attraverso il ventricolo sinistro con un flusso costante di PBS 1X fino a quando il fegato rimane privo di globuli rossi.
- Iniettare nell'aorta tramite il ventricolo destro del cuore 0.5ml di Collagenasi Type II preriscaldata a 37°C.
- Rimuovere rapidamente l'aorta con l'aiuto di un microscopio binoculare e incubare con Collagenasi D per 40 minuti.
- Filtrare il lisato cellulare con filtro cell strainer e in seguito lavare con PBS (20 ml/ 4 aorte).

Le cellule endoteliali sono state isolate dalla sospensione cellulare ottenuta in seguito a digestione enzimatica di 4 aorte, sfruttando i marcatori di superficie cellulare, per mezzo di appositi kit basati sulla tecnologia Magnetic Cell Sorting (MACS, MILTENYI BIOTEC), seguendo le istruzioni riportate; fatta eccezione per le fasi di centrifugazione, eseguite a 400 g per 5 'in una centrifuga da tavolo refrigerata a 7 °C.

La metodica si basa sull'utilizzo di particelle paramagnetiche coniugate con anticorpi monoclonali specifici per marcare le popolazioni cellulari di interesse. Queste biglie magnetiche hanno una dimensione di circa 50 nm (microbeads), sono biodegradabili e non interferiscono sulla vitalità cellulare grazie alla loro composizione di ossido di ferro e polisaccaride. Dopo un tempo di incubazione con le biglie attivate, la sospensione cellulare viene fatta passare attraverso una colonna porosa posta all'interno di un magnete: in questo modo le cellule non marcate attraversano rapidamente la colonna, mentre quelle marcate sono trattenute all'interno della stessa dalla forza del campo magnetico. Esse vengono eluite rimuovendo la colonna dal magnete.

La marcatura può essere diretta quando l'anticorpo, specifico per un marker di superficie cellulare, è direttamente coniugato alla particella magnetica; oppure indiretta quando le cellule vengono marcate con un anticorpo primario biotinilato poi riconosciuto da un anticorpo secondario anti-biotina coniugato alla biglia o da, come nel nostro caso, biglie coniugate a streptavidina (figura 16).

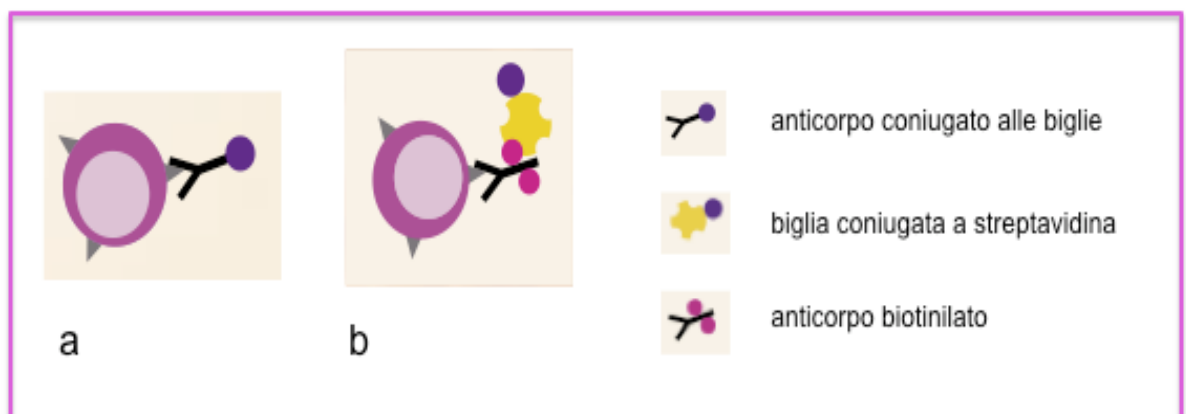


Figura 16 Marcatura delle cellule diretta (a) e indiretta (b).

Le cellule di interesse possono essere isolate tramite diverse strategie:

1. STRATEGIA DI SELEZIONE POSITIVA

Le cellule di interesse vengono marcate magneticamente e isolate direttamente come frazione cellulare positiva (figura 17). Questa strategia è particolarmente indicata per ottenere una popolazione poco rappresentata con elevata purezza. Entrambe le frazioni, quella marcata e non, possono essere recuperate e utilizzate.

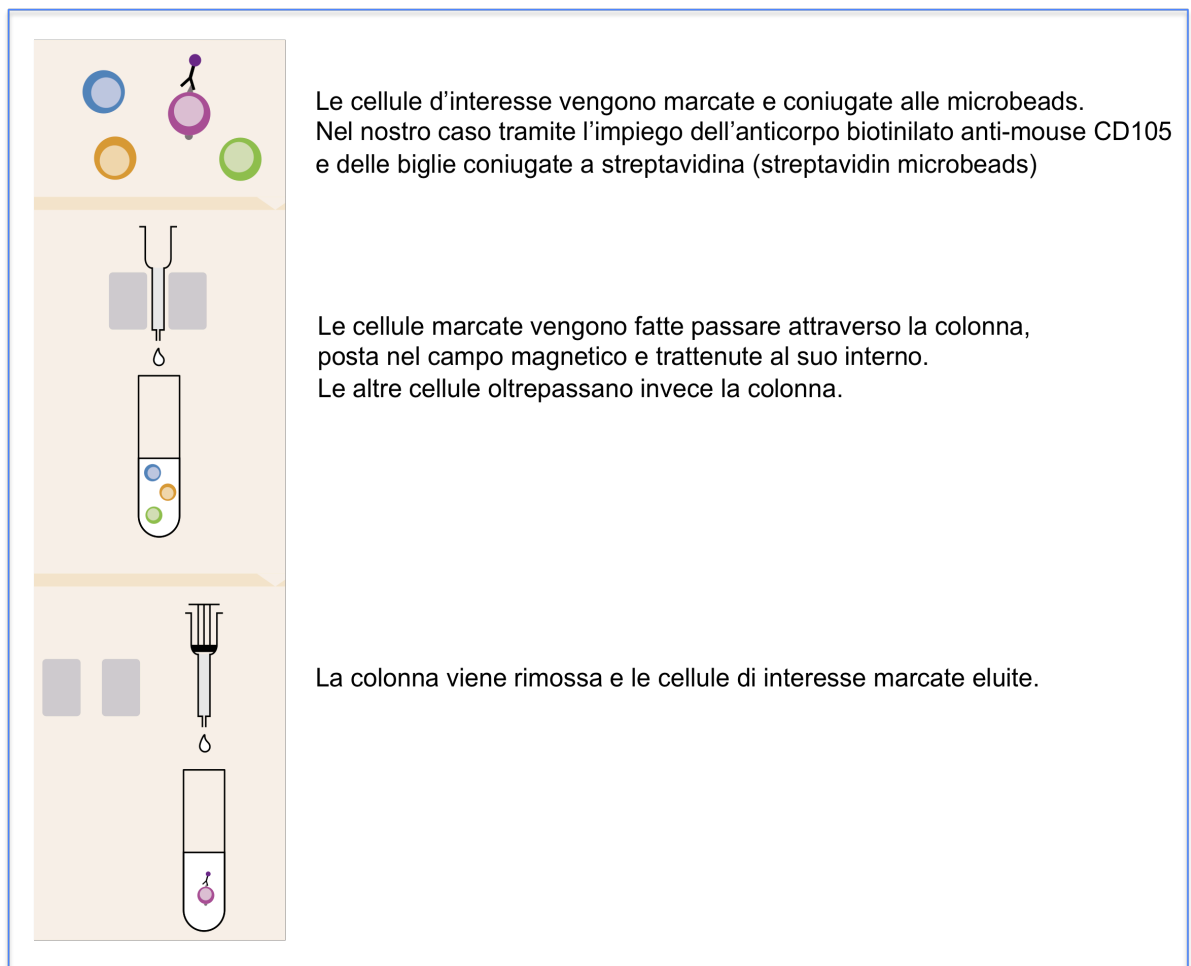


Figura 17 Strategia di selezione positiva.

Nel nostro caso la marcatura della sospensione cellulare ottenuta mediante digestione enzimatica dell'aorta, è stata la seguente :

- Risospendere le cellule in 100 μ l di FC blocking solution in buffer, per 15 minuti,
- aggiungere l'anticorpo biotinilato anti-mouse CD105 e incubare per 15 minuti a 4°C
- dopo aver lavato le cellule con buffer incubare con le biglie associate a streptavidina (streptavidin microbeads)
- separare le cellule mediante il Separatore MACS

2. STRATEGIA DI DEPLEZIONE (o selezione negativa).

Con questo metodo vengono marcate magneticamente le cellule non di interesse, così facendo la popolazione cellulare voluta fluisce liberamente attraverso la colonna (figura 18). Una metodica di questo tipo viene utilizzata nei casi in cui è necessaria:

- la rimozione delle cellule non di interesse;
- se non è disponibile un anticorpo specifico per le cellule di interesse;
- per il seguente isolamento di una sottopopolazione cellulare attraverso selezione positiva.

Nel nostro caso abbiamo utilizzato le biglie associate all'anticorpo Anti-Mouse CD 45 (Anti-Mouse CD 45 microbeads) per cercare di eliminare dal nostro campione la considerevole quantità di cellule CD45+, non endoteliali.

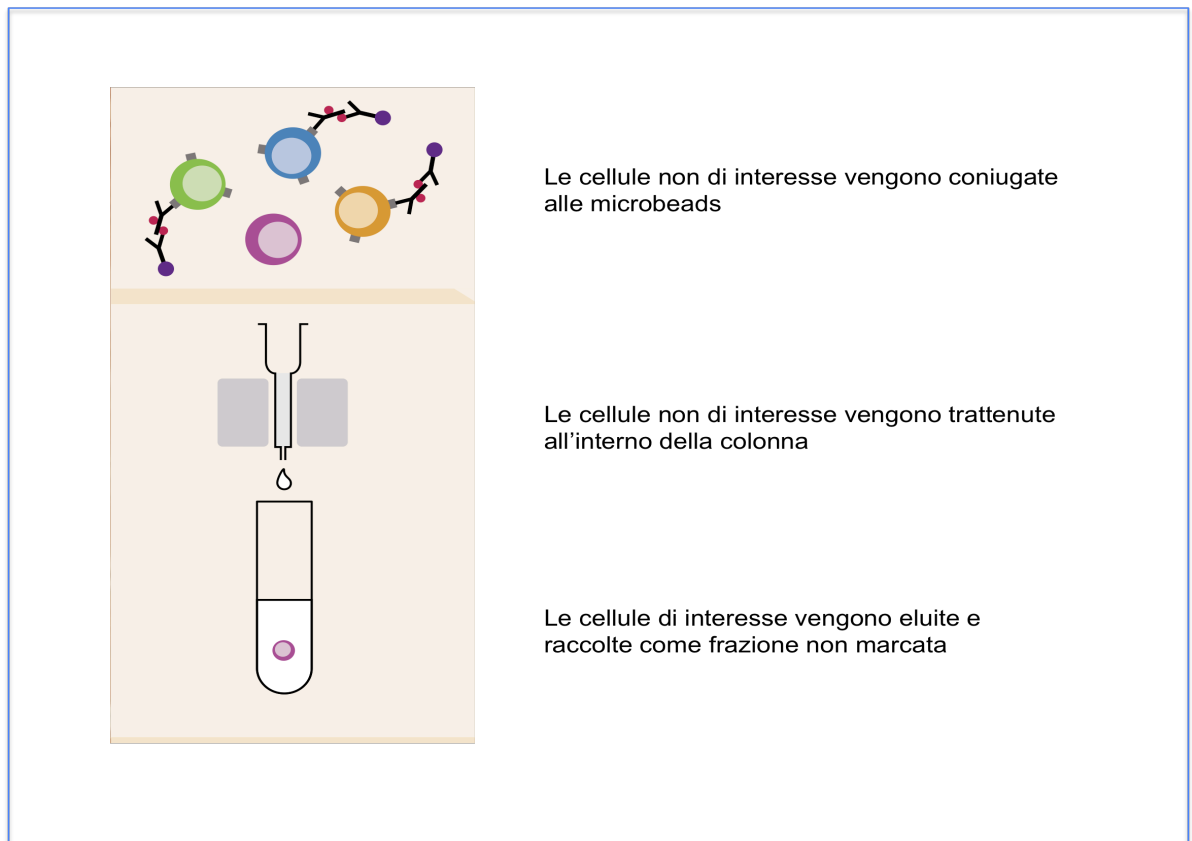


Figura 18 Strategia di selezione negativa.

Citofluorimetria a flusso

La citofluorimetria di flusso è una tecnologia che permette di misurare simultaneamente diverse caratteristiche fisiche di singole particelle, generalmente cellule, quando queste attraversano, in un mezzo fluido, un raggio laser incidente.

Le proprietà misurate sono la dimensione relativa, la complessità interna e la fluorescenza relativa dovuta alla marcatura delle cellule con molecole fluorescenti.

Queste caratteristiche sono determinate usando un sistema ottico-elettronico accoppiato che registra come le cellule deviano il raggio laser incidente ed emettono fluorescenza. La deviazione della luce e la fluorescenza vengono quindi convertite in impulsi elettronici che vengono poi processati dal computer.

Ciascuna cellula che passa attraverso la luce incidente viene registrata come un evento. Ciascun evento presenta quindi caratteristiche e parametri basati sulla deviazione della luce e sulla fluorescenza. La deviazione del raggio luminoso detto scatter dipende dalla dimensione della cellula e dalla complessità interna. I fattori che condizionano lo scatter sono la membrana cellulare, il nucleo e il materiale granulomatoso presente nel citoplasma.

Ci sono due tipi di scatter:

- **Forward Scattered light (FSC)** che è proporzionale alle dimensioni della cellula.
- **Side Scattered light (SSC)** che è invece proporzionale alla granulosità o alla complessità interna della cellula.

Le cellule possono inoltre essere marcate artificialmente per mezzo di fluorocromi. Quando questi assorbono energia luminosa questo eccesso di energia viene rilasciato come emissione di fluorescenza. I fluorocromi più utilizzati sono:

- fluoresceina isotiocianato (FITC) che ha il picco massimo di assorbimento a 490 nm
- ficoeritrina (PE) che ha il picco massimo di assorbimento a 480 nm
- alloficocianina (APC) assorbe a 650 nm ed emette a 660 nm

Utilizzando anticorpi coniugati a composti fluorescenti è possibile identificare le singole cellule analizzate con il citofluorimetro in base ai marcatori antigenici di superficie riconosciuti dall'anticorpo. In una popolazione cellulare mista, quindi, i differenti fluorocromi possono essere usati contemporaneamente per identificare diverse popolazioni e sottopopolazioni cellulari.

Caratterizzazione delle cellule endoteliali

La caratterizzazione delle cellule isolate è effettuata tramite citofluorimetria a flusso impiegando marcatori di cellule endoteliali, quali anti-mouse PE-Cy7 CD31 (PECAM-1),

Biotin anti-mouse CD105 (Endoglin) (SABiosciences) e Streptavidin PE/CY5.5 (Beckman Couter). Per valutare la contaminazione del nostro campione da leucociti abbiamo utilizzato anche l'anticorpo marcato FITC Rat Anti-Mouse CD45 (SABiosciences). Per la marcatura le cellule sono state incubate per 15 minuti con gli anticorpi, successivamente lavate con buffer e lette al citofluorimetro (FC 500 flow cytometer Beckman Coulter) utilizzando il software CXP per l'analisi dei dati.

Purificazione e quantificazione RNA.

L'RNA è stato purificato mediante l'utilizzo del kit Rneasy Micro Kit (Qiagen) seguendo le istruzioni riportate. La quantificazione è avvenuta mediante lettura al NanoDrop (ND 1000 Thermo Fisher Scientific).

Valutazione dell'espressione di SR-BI.

Per valutare l'espressione di SR-BI nelle cellule endoteliali isolate dai topi WT, SR-BI^{flox/flox} e SR-BI^{KO ENDO}, i rispettivi cDNA, sono stati incubati in presenza dei primer di SR-BI e del mix di reazione LightCycler ® DNA Master SYBR Green (Roche). La real-time PCR è stata condotta utilizzando lo strumento LightCycler LC480 PCR System (Roche). L'espressione relativa di SR-BI, è stata calcolata normalizzando i dati con l'espressione del gene di riferimento Hprt1 (Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase 1). I risultati degli riportati come media $\pm$ SD. La significatività statistica è stata determinata dal test di Student utilizzando Graph Pad Prism (GraphPad Software).

Curva di sopravvivenza.

8 topi SR-BI^{KO ENDO} e 8 topi controllo SRBI^{flox/flox} sono stati innietati per via intraperitoneale, con LPS 30 μ g/g di peso. Nei 3 giorni seguenti i topi sono stati monitorati e sono state registrate le morti.

Valutazione dell'espressione genica delle cellule endoteliali isolate da aorta di topo (PCR Array).

Per la valutazione dell'espressione genica delle cellule endoteliali isolate da un pool di 4 aorte di topo, abbiamo utilizzato il kit Mouse Endothelial Cell Biology RT² Profiler™ (SABiosciences). Esso consiste in un PCR Array, che permette di valutare simultaneamente l'espressione di 84 geni connessi alla biologia cellulare endoteliale, includendo geni coinvolti nel mantenimento del tono vascolare, nell'angiogenesi, nell'attivazione delle cellule endoteliali e nel danno endoteliale. Consiste in una piastra da 96 pozzetti in cui sono depistati i primer di 84 geni più i primer dei geni di riferimento (tabella 4). L'RNA è stato retrotrascritto a cDNA utilizzando il kit RT2 PCR Array First Strand Kit (SABiosciences), e in seguito aggiunto ad un mix di reazione, già pronto per l'uso, contenente il SYBR GREEN. Una volta depositato il mix nella piastra, abbiamo proseguito con la real-time PCR, utilizzando lo strumento LightCycler LC480 PCR System (Roche) (figura 19). L'analisi dei dati è stata condotta utilizzando un software di analisi dedicato, fornito dalla stessa ditta distributrice del kit (SABiosciences). In particolare i dati sono stati normalizzati utilizzando i geni di riferimento, anch'essi presenti all'interno della piastra fornita con il kit. Una volta calcolata l'espressione relativa di ogni singolo gene, abbiamo confrontato il profilo di espressione dei modelli murini impiegati. I risultati sono riportati come numero di volte che un gene è più o meno espresso in un topo rispetto a

quello con il quale è stato confrontato (fold regulation).

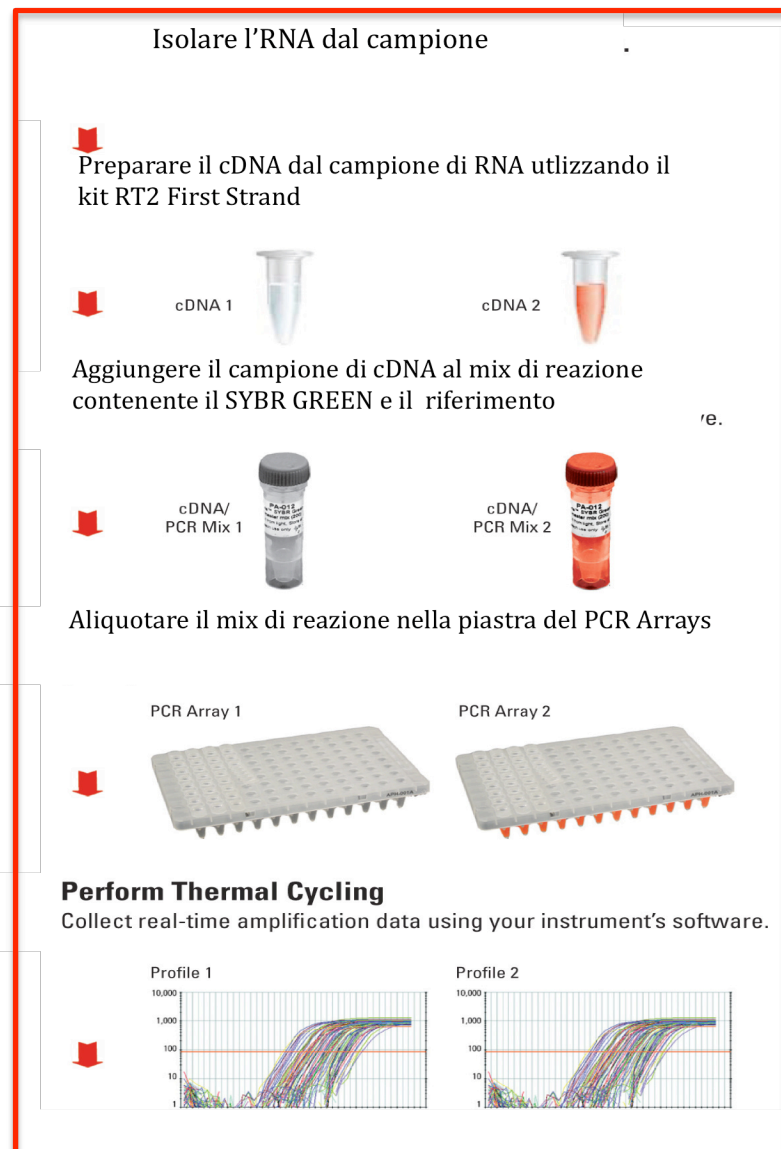


Figura 19. PCR Arrays Kit

I geni analizzati possono essere suddivise nelle seguenti funzioni cellulari:

Tono vascolare

Angiotensin System: Agt, Agtr1a, Blr1.

NO System: Nos2, Nos3.

Prostacyclin System: Ptgis.

Endothelin System: Ednra.

Oxidoreductase Activity: Nos2, Nos3, Sod1.

Regulation of Blood Pressure: Agtr1a, Edn1, Edn2, Ednra, Npr1.

Regulation of Vasoconstriction: Edn1, Edn2.

Angiogenesi

Negative Regulation of Angiogenesis: Cxcl4, Plg, Thbs1.

Positive Regulation of Angiogenesis: Rhob.

Other Genes Involved in Angiogenesis: Angpt1, Col18a1, Fgf1, Flt1, Itgav, Kdr, Pgf, Serpine1, Tek, Vegfa.

Attivazione delle cellule endoteliali

Adhesion Molecules: Cdh5, Col18a1, Cx3cl1, Fn1, Icam1, Itga5, Itgav, Itgb1, Itgb3, Ocln, Pecam1, Rhob, Sele, Sell, Selp, Selplg, Tek, Thbs1, Vcam1.

Extracellular Matrix (ECM) Molecules: Ace, Adam17, Agt, Angpt1, Casp1, Ccl2, Ccl5, Cdh5, Col18a1, Cpb2, Csf2, Cx3cl1, Cxcl1, Cxcl2, Cxcl4, Edn1, Edn2, Fas (Tnfsf6), Flt1, Fn1, Ifnb1, Il11, Il1b, Il3, Il6, Il7, Itga5, Itgb1, Kdr, Mmp1a, Mmp2, Mmp9, Nppb, Npr1, Ocln, Pdgfra, Pecam1, Pgf, Plat, Plau, Plg, Ptgis, Sele, Sell, Selp, Selplg, Serpine1, Tek, Tfpi, Tgfb1, Thbd, Thbs1, Timp1, Tnfsf10, Vcam1, Vegfa, Vwf.

Cytokine Activity: Ccl2, Ccl5, Csf2, Cx3cl1, Cxcl1, Cxcl2, Cxcl4, Fas (Tnfsf6), Ifnb1, Il11, Il1b, Il3, Il6, Il7, Tnf, Tnfsf10.

Thrombin Activity: Anxa5, Ecgf1, Plat, Plau, Plg, Serpine1.

Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Receptor Activity: Angpt1, Flt1, Kdr, Pdgfra.

Other Genes Involved in Cell Growth: Bax, Blr1, Casp3, Col18a1, Csf2, Cxcl1, Cxcl4, Ednra, Fgf1, Il11, Il1b, Il3, Il6, Il7, Itgav, Itgb1, Itgb3, Kit, Nos2, Pecam1, Pgf, Rhob, Tek, Tgfb1, Vegfa.

Danno endoteliale:

Response to Stress: Bax, Bcl2l1, Casp1, Casp3, Ccl2, Ccl5, Csf2, Cx3cl1, Cxcl1, Cxcl2, Cxcl4, Fn1, Fas (Tnfrsf6), Fas (Tnfsf6), Ifnb1, Il1b, Il3, Il6, Il7, Kit, Nos2, Pecam1, Selp, Sod1, Tgfb1, Tnf, Tnfsf10.

Anti-Apoptosis: Bcl2, Bcl2l1, Birc1a, Birc2, Vegfa.

Caspase Activation: Bax, Casp1, Casp3, Casp6, Cflar.

Induction of Apoptosis: Bax, Casp1, Casp3, Fas (Tnfrsf6), Plg.

Other Apoptosis Genes: Bcl2l1, Col18a1, Cradd, Il6, Rhob, Ripk1, Tnfaip3, Tnfsf10, Tnfsf6.

Tabella 1 Elenco dei geni analizzati. Elenco, con i nomi per esteso, dei geni analizzati. I geni di riferimento utilizzati per la normalizzazione sono evidenziati in giallo.

SIMBOLO	NOME
Ace	Angiotensin I converting enzyme (peptidyl-dipeptidase A) 1
Adam17	A disintegrin and metallopeptidase domain 17
Agt	Angiotensinogen (serpin peptidase inhibitor, clade A, member 8)
Agtr1a	Angiotensin II receptor, type 1a
Angpt1	Angiopoietin 1

Anxa5	Annexin A5
Bax	Bcl2-associated X protein
Bcl2	B-cell leukemia/lymphoma 2
Bcl2l1	Bcl2-like 1
Naip1	NLR family, apoptosis inhibitory protein 1
Birc2	Baculoviral IAP repeat-containing 2
Cxcr5	Chemokine (C-X-C motif) receptor 5
Casp1	Caspase 1
Casp3	Caspase 3
Casp6	Caspase 6
Ccl2	Chemokine (C-C motif) ligand 2
Ccl5	Chemokine (C-C motif) ligand 5
Cdh5	Cadherin 5
Cflar	CASP8 and FADD-like apoptosis regulator
Col18a1	Collagen, type XVIII, alpha 1
Cpb2	Carboxypeptidase B2 (plasma)
Cradd	CASP2 and RIPK1 domain containing adaptor with death domain
Csf2	Colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage)
Cx3cl1	Chemokine (C-X3-C motif) ligand 1
Cxcl1	Chemokine (C-X-C motif) ligand 1
Cxcl2	Chemokine (C-X-C motif) ligand 2
Pf4	Platelet factor 4
Tymp	Thymidine phosphorylase
Edn1	Endothelin 1
Edn2	Endothelin 2
Ednra	Endothelin receptor type A
Fas	Fas (TNF receptor superfamily member 6)
Fasl	Fas ligand (TNF superfamily, member 6)
Fgf1	Fibroblast growth factor 1
Flt1	FMS-like tyrosine kinase 1
Fn1	Fibronectin 1
Icam1	Intercellular adhesion molecule 1
Ifnb1	Interferon beta 1, fibroblast
Il11	Interleukin 11
Il1b	Interleukin 1 beta
Il3	Interleukin 3
Il6	Interleukin 6
Il7	Interleukin 7
Itga5	Integrin alpha 5 (fibronectin receptor alpha)
Itgav	Integrin alpha V
Itgb1	Integrin beta 1 (fibronectin receptor beta)
Itgb3	Integrin beta 3
Kdr	Kinase insert domain protein receptor
Kit	Kit oncogene
Mmp1a	Matrix metalloproteinase 1a (interstitial collagenase)
Mmp2	Matrix metalloproteinase 2
Mmp9	Matrix metalloproteinase 9
Nos2	Nitric oxide synthase 2, inducible
Nos3	Nitric oxide synthase 3, endothelial cell
Nppb	Natriuretic peptide precursor type B
Npr1	Natriuretic peptide receptor 1
Ocln	Occludin
Pdgfra	Platelet derived growth factor receptor, alpha polypeptide
Pecam1	Platelet/endothelial cell adhesion molecule 1
Pgf	Placental growth factor

Plat	Plasminogen activator, tissue
Plau	Plasminogen activator, urokinase
Plg	Plasminogen
Ptgis	Prostaglandin I2 (prostacyclin) synthase
Rhob	Ras homolog gene family, member B
Ripk1	Receptor (TNFRSF)-interacting serine-threonine kinase 1
Sele	Selectin, endothelial cell
Sell	Selectin, lymphocyte
Selp	Selectin, platelet
Selplg	Selectin, platelet (p-selectin) ligand
Serpine1	Serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade E, member 1
Sod1	Superoxide dismutase 1, soluble
Tek	Endothelial-specific receptor tyrosine kinase
Tfpi	Tissue factor pathway inhibitor
Tgfb1	Transforming growth factor, beta 1
Thbd	Thrombomodulin
Thbs1	Thrombospondin 1
Timp1	Tissue inhibitor of metalloproteinase 1
Tnf	Tumor necrosis factor
Tnfaip3	Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3
Tnfsf10	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10
Vcam1	Vascular cell adhesion molecule 1
Vegfa	Vascular endothelial growth factor A
Vwf	Von Willebrand factor homolog
Gusb	Glucuronidase, beta
Hprt1	Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase 1
Hsp90ab1	Heat shock protein 90 alpha (cytosolic), class B member 1
Gapdh	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
Actb	Actin, beta

Disegni sperimentali.

E' stata valutata l'espressione di geni coinvolti nell'infiammazione endoteliale, nelle cellule endoteliali isolate da topi impiegati in due disegni sperimentali, quali:

- 8 topi WT, sono stati iniettati con LPS 5µg/g di peso mentre 16 topi WT sono stati iniettati con PBS e dopo 12 ore sacrificati.
- 8 topi WT , 8 topi SR-BI^{flox/flox} e 8 topi SR-BI^{KO ENDO} sono stati iniettati con LPS 5µg/g di peso, e dopo 12 ore sacrificati.

*Risultati e
Discussione
(II Parte)*

E' ormai assodato l'importante ruolo dell'endotelio nel complesso processo che porta ad aterosclerosi e alla formazione della placca. Nasce a tale proposito l'esigenza di poter isolare le cellule endoteliali, e valutarne l'espressione genica, allo scopo di studiare il ruolo dei diversi attori che mediano la disfunzione endoteliale; tale strategia può essere impiegata per valutare in vivo la risposta dell'endotelio, in seguito al trattamento con diversi stimoli pro o anti infiammatori o in seguito al trattamento con farmaci.

Messa a punto del protocollo per l'isolamento delle cellule endoteliali da aorta di topo.

Il primo obiettivo del nostro studio, è stato quello di definire un protocollo per isolare le cellule endoteliali primarie dall'aorta di topo. Le comuni tecniche di isolamento di cellule endoteliali da aorte di bue o maiale, o da vasi umani, prevedono l'utilizzo della dissociazione enzimatica (Feder et al. 1983; Folkman et al. 1979) o la rimozione fisica tramite il raschiamento della tonaca intima. Al contrario l'isolamento di cellule endoteliali da aorta di animali più piccoli come il topo, è molto difficoltosa. Queste cellule, sono infatti molto resistenti al trattamento enzimatico, e, a causa delle piccole dimensioni del vaso, la rimozione meccanica risulta piuttosto difficile. Inoltre la maggior parte dei protocolli pubblicati per l'isolamento delle cellule endoteliali prevede la messa in coltura delle cellule al termine della purificazione (Lim YC et al., 2003; Marelli-Berg FM et al., 2000). Questo tipo di approccio non poteva essere da noi adottato, poiché il nostro scopo era valutare *in vivo*, l'effetto di diversi stimoli pro-infiammatori, o del trattamento con farmaci. Avevamo quindi la necessità di purificare l'RNA immediatamente dopo l'isolamento; questo per procedere quindi con la valutazione dell'espressione genica. Avevamo pertanto l'esigenza, di avere un numero di cellule tali, da purificare una quantità sufficiente di RNA, per eseguire tutte le analisi.

Nella messa a punto del protocollo per l'isolamento delle cellule endoteliali da aorta di topo sono state testate diverse strategie. In particolare, abbiamo impiegato per la digestione dell'aorta, differenti tipi e combinazioni di collagenasi, a diversi tempi d'incubazione. Abbiamo inoltre provato il metodo utilizzato per l'isolamento delle cellule endoteliali umane isolate da cordone ombelicale, ma date le ridotte dimensioni dell'aorta di topo, questa metodica ha portato a scarsi risultati in termini di numero di cellule isolate. Il protocollo da noi individuato come ottimale, consiste in una prima digestione dell'aorta con Collagenasi di tipo I, iniettata attraverso il ventricolo destro, seguita da una digestione totale dell'aorta in Collagenasi D. Questo metodo ci permette di mettere a contatto l'enzima collagenasi con lo strato di cellule endoteliali dell'intima, massimizzando l'azione dell'enzima. Ciò evita per di più, di utilizzare mezzi meccanici per aprire l'aorta, rischiando di ledere il tessuto, e permette una digestione più efficiente in un tempo abbastanza ridotto, riducendo in questo modo la mortalità cellulare. Nel nostro metodo, per ottenere un numero di cellule sufficiente per valutare in seguito l'espressione genica, è stato necessario digerire enzimaticamente un pool di 4 aorte.

Caratterizzazione delle cellule endoteliali.

Al termine di ogni test, per valutare la qualità del nostro metodo in termini di purezza delle cellule endoteliali isolate, abbiamo caratterizzato al citofluorimetro, la sospensione cellulare ottenuta; questo sfruttando i marcatori espressi sulla membrana delle cellule. In particolare abbiamo utilizzato gli anticorpi anti CD31 (PECAM1) e anti CD 105 (Endoglin), entrambi markers di cellule endoteliali, utilizzati nella maggior parte dei protocolli per l'isolamento e caratterizzazione di tali cellule (Browning AC et al., 2005; Lim YC et al., 2003; Marelli-Berg FM et al., 2000), e l'anticorpo CD 45 per valutare la presenza nel nostro campione della contaminazione da parte dei leucociti.

Caratterizzando al citofluorimetro le cellule ottenute da una digestione totale dell'aorta,

osservando la figura 20, circa il 10 % delle cellule sono CD31+ mentre un 42% sono cellule CD45+. Per avere una popolazione maggiormente pura, abbiamo impiegato, sulla sospensione cellulare ottenuta in seguito a digestione enzimatica, la selezione positiva delle cellule endoteliali sfruttando la tecnologia del Magnetic Cell Sorting.

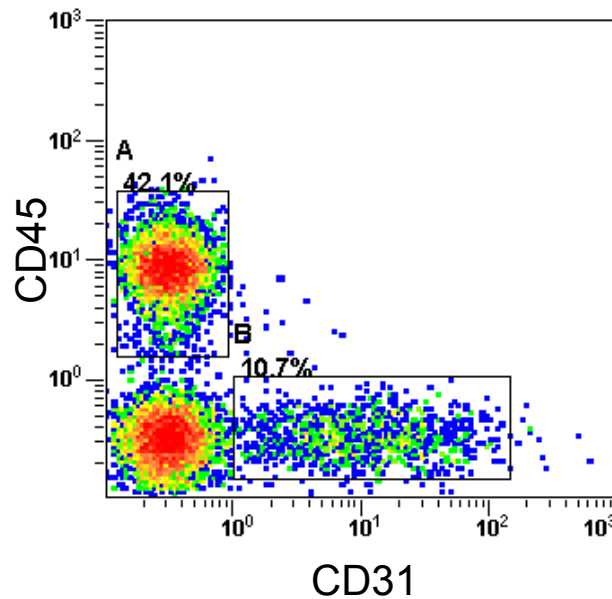


Figura 20. Caratterizzazione delle cellule isolate dall'aorta di topo mediante Magnetic Cell Sorting

In breve questa tecnica permette di isolare definite popolazioni cellulari tramite l'impiego di biglie magnetiche associate a marcatori di membrana, specifici per determinate popolazioni cellulari. Nel nostro caso abbiamo utilizzato le biglie associate all'anticorpo CD31. In seguito alla selezione le cellule sono state caratterizzate al FACS; la figura 21 mostra come grazie a questa metodologia, abbiamo arricchito il nostro campione in cellule endoteliali (53%); nonostante ciò, era presente ancora una forte contaminazione di altri tipi cellulari, in modo particolare delle cellule CD45+ (figura 21).

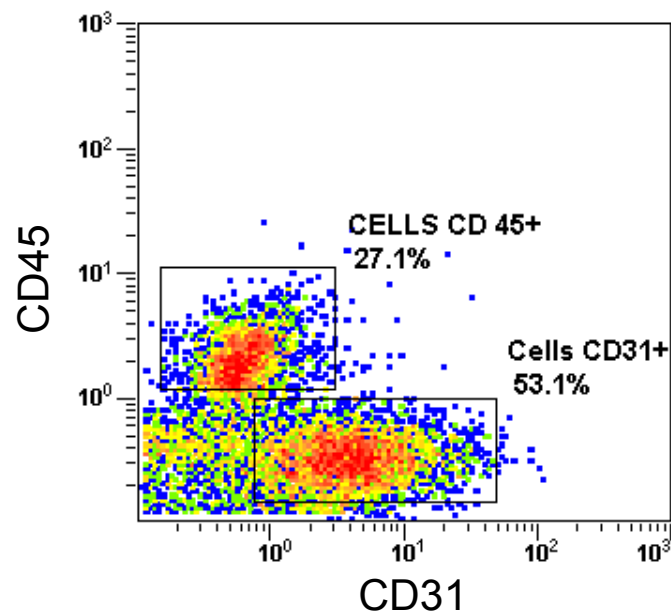


Figura 21 Caratterizzazione delle cellule endoteliali isolate dall'aorta di topo, mediante selezione positiva delle cellule CD31 +, tramite Magnetic Cell Sorting

Allo scopo di ridurre ulteriormente la presenza dei leucociti (CD45+) abbiamo adottato 2 strategie.

La prima è stata quella di applicare una selezione negativa sfruttando sempre la tecnologia del Magnetic Cell Sorting. In questo modo inizialmente abbiamo cercato di eliminare dal nostro campione tutte le cellule CD45+, in un secondo momento invece abbiamo selezionato, come in precedenza le cellule CD31+.

Nella seconda metodologia, abbiamo variato il marcatore di cellule endoteliali, scegliendo il CD105 (endoglina) altro marker di cellule endoteliali, al posto del CD31, per la selezione positiva con le biglie.

Il primo metodo è stato immediatamente abbandonato poiché la moltitudine dei passaggi sperimentali richiesti, ha determinato una drastica perdita di campione di cellule endoteliali.

Con le biglie associate al marcatore CD105, siamo invece riusciti ad ottenere un campione cellulare con una purezza di circa l'80% in cellule endoteliali (figura 22).

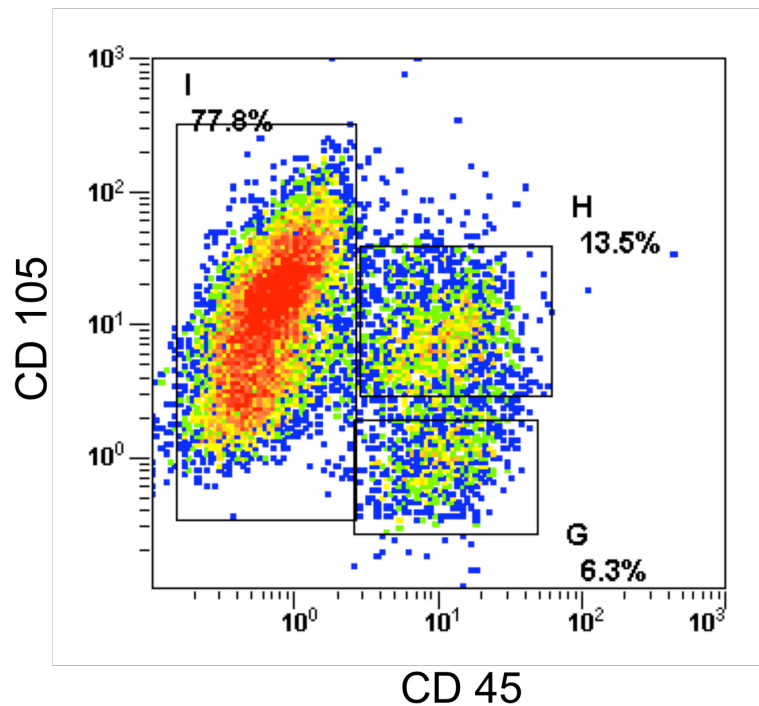


Figura 22. Caratterizzazione delle cellule endoteliali isolate dall'aorta di topo, mediante selezione positiva delle cellule CD105 +, tramite Magnetic Cell Sorting.

Validazione del metodo.

Per avere un'ulteriore prova che le cellule isolate fossero endoteliali, abbiamo applicato la metodica di isolamento individuata, ad un nuovo modello murino creato nel nostro laboratorio, il topo SR-BI^{KO-ENDO}. Esso è caratterizzato dalla delezione specifica di SR-BI nelle cellule endoteliali. Questo modello è stato ottenuto mediante tecnologia Cre-LoxP, incrociando i topi SR-BIflox/flox con il modello di topo transgenico TIE2-CRE creato dal dottor Masashi Yanagisawa e colleghi (Kisanuki YY, 2001). Quest'ultimo ha la caratteristica di esprimere il gene dell'enzima ricombinasi Cre, sotto il controllo del promotore/enhancer del recettore della tirosina chinasi Tek, che ha mostrato conferire un'espressione uniforme di SR-BI nelle cellule endoteliali durante l'embriogenesi e l'età adulta. La ricombinasi Cre espressa nel topo TIE2-CRE, ha la capacità di excidere il frammento del gene di SR-BI, localizzato nel topo SR-BIflox/flox creato in precedenza nel

nostro laboratorio, tra 2 sequenze denominate appunto LoxP.

Una volta isolate le cellule endoteliali dai i topi WT, SR-BI^{KO-ENDO} e SR-BI^{flox/flox} abbiamo valutato, mediante real time PCR l'espressione di SR-BI. La figura 23 mostra una diminuzione importante di SR-BI nelle cellule isolate dai topi SR-BI^{flox/flox}, e una quasi assenza di espressione nei topi SR-BI^{KO-ENDO}; questo ci fornisce un'ulteriore conferma che il metodo da noi messo a punto è in grado di isolare le cellule endoteliali. La riduzione di SR-BI nelle cellule endoteliali isolate dai topi SR-BI^{flox/flox} era già stata osservata in precedenza nel nostro laboratorio, tuttavia, non è ancora stata individuata l'origine, probabilmente è dovuta al fatto che il sito LoxP inserito nella regione della porzione 5'-UTR del gene di SR-BI introduce una tipica struttura hairpin nel RNA trascritto (Huby T., 2006).

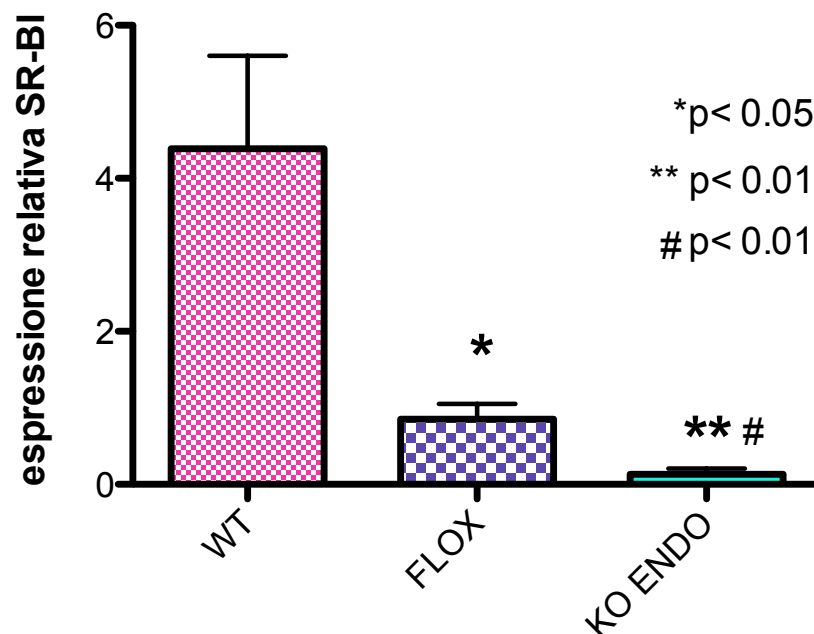


Figura 23. Valutazione dell'espressione relativa di SR-BI nelle cellule endoteliali isolate dai tre modelli animali utilizzati. La RT-PCR è stata condotta come descritto nella sezione Materiali e metodi, a partire dal cDNA isolato dai topi WT, SR-BI^{flox/flox} e SR-BI^{KO-ENDO}. I dati sono espressi come valori medi ± SD (n=5). * p = 0,0114 WT vs FLOX, ** p = 0.0061 WT vs KO ENDO, # p = 0.0081 FLOX vs KO ENDO.

Mortalità indotta da LPS.

Le cellule endoteliali isolate dai topi con una delezione specifica di SR-BI rappresentano un buon modello per studiare il ruolo di SR-BI nella risposta endoteliale, in seguito a stimoli pro infiammatori. In particolare alcuni studi suggeriscono che SR-BI sia in grado di mediare il legame e l'uptake del LPS, componente principale dei batteri gram negativi; tale affermazione è supportata dall'osservazione che i topi knock-out per SR-BI, a differenza dei topi controllo, muoiono più precocemente in seguito a iniezione con lipopolisaccaride LPS. Alcuni gruppi di ricerca attribuiscono quest'azione all'effetto protettivo di SR-BI nell'inibire la tossicità indotta da NO (Li X.A. et al., 2006). Diversamente il gruppo di Lei Cai e colleghi suggerisce che SR-BI protegga dallo stress endotossico, promuovendo la produzione di glucocorticoidi e la clearance epatica dell'LPS (Cai L et al., 2008).

Inizialmente abbiamo voluto vedere se il nuovo modello murino SR-BI^{KO ENDO}, fosse suscettibile allo stress endotossico; per valutare quindi se SR-BI espresso nelle cellule endoteliali, conferisse una certa protezione nei confronti della morte indotta da LPS, osservata nei topi SR-BI Knock-out. A questo proposito i topi SR-BI^{KO ENDO} e i topi controllo SR-BI^{KO ENDO}, sono stati iniettati per via intraperitoneale con 30 μ g/g di peso di LPS. Nei tre giorni successivi sono state monitorate le condizioni dei topi e annotato le morti.

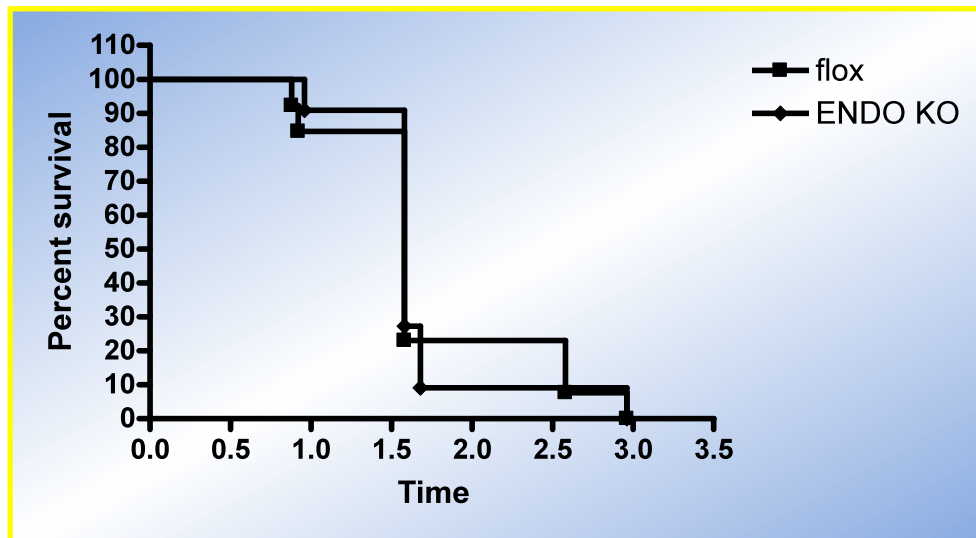


Figura 24. Curva di sopravvivenza. Curva di sopravvivenza calcolata registrando le morti in seguito a iniezione intraperitoneale di LPS 30 $\mu\text{g/g}$ di peso, a 8 topi $\text{SR-BI}^{\text{KO ENDO}}$ e a 8 topi controllo $\text{SRBI}^{\text{flox/flox}}$.

La curva di sopravvivenza, mostrata in figura 24 non evidenzia nessuna differenza tra i due modelli di animali in merito alla risposta allo shock endotossico. Questo risultato indica che SR-BI espresso in modo specifico nelle cellule endoteliali, non è direttamente e unicamente coinvolto nei meccanismi che proteggono dalla morte indotta da LPS. Tuttavia questo non esclude che SR-BI possa cooperare alla modulazione della risposta infiammatoria, innescata dall'endotossina batterica, contribuendo alla protezione nei confronti dello shock endotossico, già precedentemente descritta (Cai L et al., 2008).

Date queste premesse nasce la necessità di valutare in modo specifico la risposta infiammatoria allo shock endotossico delle cellule endoteliali, in presenza o meno di SR-BI.

Profilo di espressione genica delle cellule endoteliali isolate da aorta di topo.

Inizialmente abbiamo valutato l'espressione genica delle cellule endoteliali isolate da topi WT stimolati o meno con LPS 5 ug/g di peso corporeo; questo per verificare che il protocollo dai noi definito fosse idoneo per apprezzare variazioni sul profilo dell'espressione genica indotte da LPS. A tale scopo abbiamo impiegato uno specifico kit di PCR array, che permette di analizzare l'espressione di più geni contemporaneamente, scegliendo un pannello di geni coinvolti nella biologia delle cellule endoteliali (tabella 1 A). Successivamente, in uno studio preliminare abbiamo applicato lo stesso protocollo sperimentale ai topi SR-BI^{KO ENDO} e da topi SR-BI^{flox/flox} per valutare il contributo di SR-BI nella risposta infiammatoria indotta da LPS..

Una volta calcolata l'espressione relativa di ogni singolo gene, abbiamo confrontato il profilo di espressione dei modelli murini impiegati. I dati nella tabella 1 sono riportati come numero di volte che un gene è più o meno espresso in un topo rispetto a quello con il quale è stato confrontato.

In condizioni di sepsi l'iperattivazione della risposta immunitaria porta ad una eccessiva produzione di molteplici citochine pro infiammatorie, e al danno cellulare. A tale proposito è riportato che nell'endotelio, l'esposizione a LPS, incrementa l'espressione dell'enzima NO sintetasi inducibile (NOS), (Morikawa A, et al., 2000) così come all'espressione di molecole di adesione quali VCAM1, e ICAM1 (Ulbrich H, et al., 2003). Inoltre è sempre più accreditata l'idea che l'LPS induca l'espressione di altri mediatori dell'infiammazione quali l'IL-1 β , il TNF- α e l'IFN- γ (Dauphinee SM and A Karsan. 2006).

Nonostante sia necessario confermare ogni dato con una specifica qPCR, l'osservazione nei topi WT iniettati con LPS, diversamente dai topi non trattati, vengano indotti anche i geni sopracitati, coinvolti nell'infiammazione, mostra che il nostro protocollo è in grado di apprezzare e rivelare la risposta infiammatoria endoteliale in seguito a stress endotossico

(tabella 1 colonna A).

Sebbene lo studio preliminare non abbia mostrato differenze tra i modelli murini SR-BI^{KO} ENDO e da topi SR-BI^{flox/flox}, (tabella 5 colonna B), la coerenza del profilo di espressione sottolinea la riproducibilità del nostro metodo. Tuttavia la sensibilità del nostro protocollo potrebbe essere non sufficiente ad apprezzare le sottili differenze nella risposta infiammatoria, determinate dalla presenza o meno di SR-BI nelle cellule endoteliali. Sono quindi necessari altri esperimenti per ottimizzare il metodo; per esempio in termini di dose e tempo di somministrazione dell'LPS; la concentrazione da noi utilizzata infatti, potrebbe essere stata troppo elevata da indurre una risposta infiammatoria esagerata che ha impedito di apprezzare le differenze tra i due modelli di topo.

In ogni caso il protocollo da noi messo a punto per l'isolamento delle cellule endoteliali, può rappresentare un buon modello per studiare *in vivo* la risposta endoteliale in seguito all'esposizione degli animali a stimoli farmacologici e non farmacologici, pro o antiinfiammatori.

Tabella 2 (pagine seguenti) Profilo di espressione genica delle cellule endoteliali isolate da aorta di topo. Nella colonna A abbiamo confrontato l'espressione genica relativa, delle cellule endoteliali isolate da topo WT iniettato con LPS 5 ug/g di peso con quella delle cellule endoteliali dei topo WT non trattati. Nella colonna B invece abbiamo confrontato l'espressione relativa, in seguito a stimolazione con LPS 5 ug/g di peso, delle cellule endoteliali dei topi SR-BI^{KO ENDO} e topi SR-BI^{flox/flox} con quello delle cellule endoteliali dei topi WT ; infine abbiamo confrontato l'espressione genica relativa, in seguito a stimolazione con LPS 5 ug/g di peso, delle cellule endoteliali isolate dai topi SR-BI^{KO ENDO} con quella delle cellule endoteliali dei topi SR-BI^{flox/flox}. I risultati sono riportati come numero di volte (fold regulation), che un gene è più o meno espresso in un topo rispetto a quello con il quale è stato confrontato. In colore rosso abbiamo evidenziato un fold regulation >4(+++) in rosa un fold regulation >2 (+), in verde chiaro un fold regulation <2 (-) e in verde più scuro un fold regulation < 4 (---).

Tabella 5

GENE	A	WT LPS vs WT PBS	B	LPS		
				Flox vs WT	Tie vs WT	Tie vs Flox
Ace				+	+	
Adam17						
Agt		+		---	---	
Agtr1a					-	
Angpt1		+		-	-	
Anxa5						
Bax						
Bcl2						
Bcl2l1		++				
Naip1		+		---	---	+
Birc2		++			-	-
Cxcr5				-	-	
Casp1						
Casp3						
Casp6						
Ccl2		++		-	-	
Ccl5		++				
Cdh5		+			-	
Cflar						
Col18a1				+	+	
Cpb2		+		---	---	+
Cradd		+		---	---	
Csf2		++		---	-	
Cx3cl1						
Cxcl1		++			-	
Cxcl2		++		---	---	
Pt4				-		
Tymp		+		---	---	+
Edn1						
Edn2		+		---	---	+
Ednra		+				
Fas		+				
Fasl		+		---	---	
Fgf1				-	-	
Flt1						-
Fn1						
Icam1		++				
Ifnb1		+		---	---	+
Il11		+		---	---	
Il1b		+		-	-	
Il3		+		---	---	+
Il6		+				
Il7				-	-	

Continuo tabella 5

GENE	A	WT vs WT PBS	B	LPS		
				Flox vs WT	Tie vs WT	Tie vs Flox
Itga5		+		+	+	
Itgav						
Itgb1						
Itgb3		+		+	+	
Kdr						
Kit		+				
Mmp1a		+		---	---	+
Mmp2						
Mmp9						
Nos2		+			+	+
Nos3				+		
Nppb		++		---	--	+
Npr1		-		+	+	
Ocln		+				
Pdgfra						
Pecam1		-		+		
Pgf		+++		-	--	
Plat		+				
Plau						
Plg		+		---	---	+
Ptgis						
Rhob						
Ripk1					-	
Sele		++				
Sell						
Selp		+++		-	--	
Selpig						
Serpine1		++		+	+	
Sod1						
Tek		-				
Tfpi				-		+
Tgfb1					+	
Thbd				+	+	
Thbs1						
Timp1		+		---	---	+
Tnf		++		-	-	
Tnfaip3		++				
Tnfsf10		+			-	
Vcam1						
Vegfa		+		-	-	
Vwf		-		++	++	

BIBLIOGRAFIA

- Acton S., et al., Expression cloning of SR-BI, a CD36-related class B scavenger receptor. *J Biol Chem* 1994; 269: 21003-21009.
- Acton S., et al. Association of polymorphisms at the SR-BI gene locus with plasma lipid levels and body mass index in a white population. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1999; 19:1734–1743.
- Allen JD, Cobb FR, Kraus WE, Gow AJ. Total nitric oxide following testing reflects endothelial function and discriminates health status. *Free Radic Biol Med* 2006; 41: 740–747.
- Anderson TJ, Uehata A, Gerhard MD, et al. Close relation of endothelial function in the human coronary and peripheral circulations. *J Am Coll Cardiol* 1995; 26: 1235-1241.
- Anderson TJ. Prognostic significance of brachial flow-mediated vasodilation. *Circulation* 2007; 115: 2373–2375.
- Antuna-Puente B, Feve B, Fellahi S, et al. Adipokines: the missing link between insulinresistance and obesity. *DiabetesMetab* 2008; Feb;34(1):2-11 .
- Arai T., Wang N., Bezouevski M., Welch C., and Tall A.R. Decreased atherosclerosis in heterozygous low density lipoprotein receptor-deficient mice expressing the scavenger receptor BI transgene. *J. Biol. Chem.* 1999; 274:2366–2371.
- Asztalos BF, de la Llera-Moya M, Dallal GE, Horvath KV, Schaefer EJ, Rothblat GH. "Differential effects of HDL subpopulation on cellular ABCA-1 e SR-B1- mediate cholesterol efflux. *Journal of lipid Research*; 2005; 46 .
- Attie AD. ABCA1: at the nexus of cholesterol, HDL and atherosclerosis. *TRENDS in Biochemical Sciences*, 2007; Vol.32 No.4 .
- Babaev, V.R., Bobryshev, Y.V., Sukhova, G.K., Kasantseva, I.A., "Monocyte/macrophage accumulation and smooth muscle cell phenotypes in early atherosclerotic lesions of human aorta". *Atherosclerosis*; 2000;100 (2):237–248.
- Baguet JP, Legallacier B, Auquier P, et al. Up dated meta-analytical approach to the efficacy of antihypertensive drugs in reducing blood pressure. *Clin Drug Investig* 2007; 27(11): 735-53.
- Basu S.K., et al. Degradation of cationized low density lipoprotein and regulation of cholesterol metabolism in homozygous familial hypercholesterolemia fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1976; 73(9): p. 3178-82.
- Behrendt D, Ganz P. Endothelial function: from vascular biology to clinical applications. *Am J Cardiol* 2002; 90: 40L-48L.
- Bernini F., et al. Effect of lacidipine on cholesterol esterification: in vivo and in vitro studies. *Br J Pharmacol*, 1997; 122(6): p. 1209-15.
- Blanco M, Rodríguez-Yáñez M, Sobrino T, Leira R, Castillo J: Platelets, inflammation, and atherothrombotic neurovascular disease: the role of endothelial dysfunction. *Cerebrovasc Dis* 2005; 20(suppl 2):32–39.
- Blankenberg S., Barbaux, S., Tiret, L. Adhesion molecules and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2003. 170 (2), 191–203.

- Bobryshev YV, Lord RS.. Ultrastructural recognition of cells with dendritic cell morphology in human aortic intima. Contacting interactions of vascular dendritic cells in athero-resistant and athero- prone areas of the normal aorta. Arch. Histol. Cytol. 1995 58:307–22.
- Boden WE. High-density lipoprotein cholesterol as an independent risk factor in cardiovascular disease: assessing the data from Framingham to the Veterans Affairs High-Density Lipoprotein Intervention Trial. Am J Cardiol. 2000;86:19L–22L.
- Borhani NO, Mercuri M, Borhani PA, et al. Final outcome results of the Multicenter Isradipine Diuretic Atherosclerosis study (MIDAS): a randomized controlled trial. JAMA 1996 Sep 11;276(10): 785-91
- Brewer Bryan, Jr, Alan T Remaley, Edward B. Neufeld, Federica Basso, Charles Joyce, "Regulation of plasma High density Lipoprotein Levels by The ABCA1 Transporter and the Emaerin Role of High Density Lipoprotein in the treatment of cardiovascular Disease" Vasc. Biol. 2004;24:1755-1760.
- Browning AC, Gray T, Amoaku WM. Isolation, culture, and characterisation of human macular inner choroidal microvascular endothelial cells. Br J Ophthalmol. 2005 Oct;89(10):1343-7.
- Brown MJ, Palmer CR, Castaigne A, et al. Morbidity and mortality in patients randomised to double-blind treatment with a long-acting calcium channel blocker or diuretic in the International Nifedipine GITS study: Intervention as a Goal in Hypertension Treatment (INSIGHT). Lancet 2000 Jul 29;356(9227): 366-72.
- Cai L, Ji A, de Beer FC, Tannock LR, van der Westhuyzen DR. SR-BI protects against endotoxemia in mice through its roles in glucocorticoid production and hepatic clearance. J Clin Invest. 2008 Jan;118(1):364-75.
- Canault M, Peiretti F, Poggi M, Mueller C, Kopp F, et al. Progression of atherosclerosis in ApoE-deficient mice that express distinct molecular forms of TNF- α . J. Pathol. 2008 214:574–83 .
- Canavesi M., et al. In vitro inhibitory effect of lercanidipine on cholesterol accumulation and matrix metalloproteinases secretion by macrophages. J Cardiovasc Pharmacol, 2004. 44(4): p. 416-22.
- Castillo J, Rama R, Dávalos A: Nitric oxide related brain damage in acute ischemic stroke. Stroke 2000; 31: 852–857.
- Chen X, Touyz RM, Park JB, Schiffrin EL. Antioxidant effects of vitamins C and E are associated with altered activation of vascular NADPH oxidase and superoxide dismutase in stroke-prone SHR. Hypertension 2001; 38: 606-611.30.
- Chen, M., Masaki, T. and Sawamura, T. LOX-1, the receptor for oxidized low-density lipoprotein identified from endothelial cells: implications in endothelial dysfunction and atherosclerosis. Pharmacol. Ther. 2002.95, 89–100 62.
- Chinetti G., et al. CLA-1/SR-BI is expressed in atherosclerotic lesion macrophages and regulated by activators of peroxisome proliferator-activated receptors. Circulation. 2000 101:2411–2417.
- Cignarella A., et al. Potential pro-inflammatory action of resveratrol in vascular smooth muscle cells from normal and diabetic rats. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2006; 16(5): p. 322-9.
- Cipollone F., Mezzetti A. "Patogenesi dell'aterosclerosi"; Manuale delle dislipidemie e dell'arteriosclerosi; 2004,17-28.

- Cominacini, L. et al., Oxidized low-density lipoprotein increases the production of intracellular reactive oxygen species in endothelial cells: inhibitory effect of lacidipine. *J Hypertens*, 1998. 16(12 Pt 2): p. 1913-9.
- Corretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ, et al. Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: a report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force. *J Am Coll Cardiol* . 2002; 39: 257-265.
- Cotran R.S. "Robbins –Le basi patologiche delle malattie".2000; Piccin, Padova; volume 1,pp.577-597.
- Covey S.D., Krieger M., Wang W., Penman M., and Trigatti B.L.. Scavenger receptor class B type mediated protection against atherosclerosis in LDL receptor-negative mice involves its expression in bone marrow-derived cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2003; 23:1589–1594.
- Cuff, C. A. et al. The adhesion receptor CD44 promotes atherosclerosis by mediating inflammatory cell recruitment and vascular cell activation. *J. Clin. Invest.* 2001. 108, 1031–1040
- Dahlof B, Sever PS, Poulter NR, et al. Prevention of cardiovascular events with an antihypertensive regimen of amlodipine adding perindopril as required versus atenolol adding bendroflumethiazide as required, in the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial-Blood Pressure Lowering Arm (ASCOT-BPLA): a multicentre randomised controlled trial. *Lancet* 2005.
- Dauphinee SM and A Karsan. LPS signaling in endothelial cells Laboratory Investigation 2006 86, 9 – 22.
- DeSisti L, Scuteri A, DeSensi F, et al. Vascular protective effects of manidipine in patients with hypertension and type 2 diabetes mellitus. *Circulation* 2005; 112Suppl. II: 357-8.
- Dohi Y, Criscione L, Pfeiffer K, Luscher TF. Angiotensin blockade or calcium antagonists improve endothelial dysfunction in hypertension: studies in perfused mesenteric resistance arteries. *J Cardiovasc Pharmacol* 1994; 24: 372-9.
- Dunn S, Vohra RS, Murphy JE, Homer-Vanniasinkam S, Walker JH, Ponnambalam S. The lectin-like oxidized low-density-lipoprotein receptor: a pro-inflammatory factor in vascular disease. *Biochem J.* 2008 Jan 15;409(2):349-55.
- Elhage R, Jawien J, Rudling M, Ljunggren HG, Takeda K, et al. Reduced atherosclerosis in interleukin-18 deficient apolipoprotein E-knockout mice. *Cardiovasc. Res.* 2003; 59:234–40.
- Endermann D, Pu Q, De Ciucesi C, Savoia C, Virdis A, Neves MF, Touyz RM, Schiffrin EL. Persistent remodeling of resistance arteries in type 2 diabetic patients on anti-hypertensive treatment. *Hypertension* 2004; 43: 399-404.
- Fielding CJ, Fielding PE. Molecular physiology of reverse cholesterol transport". *J Lipid Res.* 1995;36:211-228.
- Francisco M-MJ. Manidipine (but not amlodipine), increases insulin sensitivity and rises plasma adiponectin concentrations in hypertensive nondiabetic patients with metabolic syndrome and impaired fasting glucose [abstract]. 41st EASD Annual Meeting; 2005 Sep 10-15; Athens.
- Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288: 373-376. RA.
- Galkina E, Ley K. Vascular adhesion molecules in atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2007. 27:2292–301.

- Galkina E, Ley K. . Leukocyte influx in atherosclerosis. *Curr. Drug Targets* 2007. 8:1239–48
- Galkina E, Ley K. Immune and Inflammatory Mechanisms of Atherosclerosis .*Ann. Rev. Immunol.*2009.27:165-97.
- Gary F. Lewis, Daniel J. Rader. New Insight Into Regulation of HDL Metabolism and Reverse Cholesterol Transport. *Circ Res.*; 2005, 96:1221-1232.
- Gerrity RG, Naito HK, Richardson M, Schwartz CJ.. Dietary induced atherogenesis in swine. Morphology of the intima in pre lesion stages. *Am. J. Pathol.* 1979. 95:775–92.
- Goran K., Hansson, MD., Ph.D. Inflammation, Atherosclerosis, and Coronary artery Disease; *England Journal of Medicine.* 2005.
- Goti D., et al. Scavenger receptor class B, type I is expressed in porcine brain capillary endothelial cells and contributes to selective uptake of HDL associated vitamin E. *J. Neurochem.* 76:498–508. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20:1068–1073.
- Griendling KK, Fitzgerald GA. Oxidative stress and cardiovascular injury. Part I: Basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS. *Circulation* 2003; 42: 1149-1160.
- Groen AK, Bloks VW, Bandsma RH, et al. Hepatobiliary cholesterol transport is not impaired in Abca1-null mice lacking HDL. *J Clin Invest* 2001; 108:843–850.
- Grote K, Luchtefeld M, Schieffer B. JANUS under stress--role of JAK/STAT signalling pathway in vascular diseases. *Vascul Pharmacol* 2005; 43: 357–363.
- Gupta S, Pablo AM, Jiang X, Wang N, Tall AR, Schindler C. IFN- γ potentiates atherosclerosis in ApoE knock-out mice. *J. Clin. Investig.* 1997; 99:2752–61.
- Habib JB, Bossaller C, Wells S, et al. Preservation of endothelium-dependent vascular relaxation in cholesterol-fed rabbit by treatment with the calcium blocker PN 200110. *CircRes* 1986; 58: 305.
- Hansson GK, Libby P. 2006. The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nat. Rev. Immunol.* 6:508–19, Galkina E, Ley K. 2007. Leukocyte influx in atherosclerosis. *Curr. Drug Targets* 8:1239–48 .
- Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 352: 1685–1695, 2005.
- Hansson L, Zanchetti A, Carruthers SG, et al. Effects of intensive blood-pressure lowering and low-dose aspirin in patients with hypertension: principal results of the Hypertension Optimal Treatment(HOT) randomised trial. HOTStudyGroup. *Lancet* 1998; Jun13;351(9118): 1755-62
- Hansson L, Hedner T, Lund-Johansen P, et al. Randomised trial of effects of calcium antagonists compared with diuretics and beta-blockers on cardiovascular morbidity and mortality in hypertension: the Nordic Diltiazem (NORDIL) study. *Lancet* 2000; Jul29; 356(9227): 359-65.
- Havel, R.J. and E. Rapaport. Management of primary hyperlipidemia. *N Engl J Med*, 1995. 332(22): p. 1491-8.
- Haynes WG, Webb DJ. Endothelin as a regulator of cardiovascular function in health and disease. *J Hypertens* 1998; 16: 1081-1098.

- Heitzer T, Schlinzig T, Krohn K, Meinertz T, Munzel T. Endothelial dysfunction, oxidative stress, and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *Circulation* 2001; 104: 2673-2678.
- Hennessy LK, Kunitake ST, Kane JP. Apolipoprotein A-I-containing lipoproteins, with or without apolipoprotein A-II, as progenitors of pre-beta high-density lipoprotein particles. *Biochemistry*; 1993; 32: 5759–5765.
- Higashi Y, Sasaki S, Nakagawa K, Matsuura H, Oshima T, Chayama K. Endothelial function and oxidative stress in renovascular hypertension. *N Engl J Med* 2002; 346:1954-1962.
- Holmes DR jr, Lerman A. Long-term follow-up of patients with mild coronary artery disease and endothelial dysfunction. *Circulation* 2000; 101: 948- 954.
- Hong, S.H., et al. Association between HaeIII polymorphism of scavenger receptor class B type I gene and plasma HDL-cholesterol concentration. *Ann. Clin. Biochem.* 2002. 39:478–481.
- Huby T, Doucet C, Dachet C, Ouzilleau B, Ueda Y, Afzal V, Rubin E, Chapman MJ, Lesnik P. Knockdown expression and hepatic deficiency reveal an atheroprotective role for SR-BI in liver and peripheral tissues. *J Clin Invest.* 2006; 116:2767-2776.
- Ishibashi S, Brown MS, Goldstein JL, Gerard RD, Hammer RE, and Herz J. Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. *J Clin Invest* . 1993; 92: 883–893.
- Ishibashi S, Herz J, Maeda N, Goldstein JL, and Brown MS. The two-receptor model of lipoprotein clearance: tests of the hypothesis in “knockout” mice lacking the low density lipoprotein receptor, apolipoprotein E, or both proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994. 91: 4431–4435.
- James Scott Pathophysiology and biochemistry of cardiovascular disease. *Current Opinion in Genetics & Development* 2004; 14:271–279.
- Janowski BA. et al. Structural requirements of ligands for the oxysterol liver X receptors LXRA and LXRb. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1999; 96, 266–271.
- Ji Y., Jian B., et al., Scavenger receptor B1 promotes high density lipoprotein-mediated cellular cholesterol efflux. *J Biol Chem* 1997; 272: 20982-5.
- Ji Y., et al. Hepatic scavenger receptor BI promotes rapid clearance of high density lipoprotein free cholesterol and its transport into bile. *J. Biol. Chem.* 274:33398–33402. Kozarsky, K.F., et al. 1997. Overexpression of the HDL receptor SR-BI alters plasma HDL and bile cholesterol levels. *Nature.* 1999. 387:414–417.
- Jolley CD, Woollett LA, Turley SD, Dietschy JM. Centripetal cholesterol flux to the liver is dictated by events in the peripheral organs and not by the plasma high density lipoprotein or apolipoprotein A-I concentration. *J Lipid Res* . 1998; 39:2143–2149.
- Jonas A. Lecithin cholesterol acyltransferase.” *Biochim Biophys Acta.* 2000;1529:245–256.
- Joseph, S.B. and Tontonoz, P. LXRs: new therapeutic targets in atherosclerosis? *Curr. Opin. Pharmacol.* 2003; 3:192–197.
- Kalaany, N.Y. and Mangelsdorf, D.J. LXRS and FXR: the yin and yang of cholesterol and fat metabolism. *Annu. Rev. Physiol.* 2006; 68, 159–191.
- Kawasaki K, Smith RS, Jr , Hsieh CM, et al. Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase Akt pathway mediates nitric oxide-induced endothelial cell migration and angiogenesis. *Mol Cell Biol* 2003;23:5726–5737.

- Kisanuki YY, Hammer RE, Miyazaki J, Williams SC, Richardson JA, Yanagisawa M. Tie2-Cre transgenic mice: a new model for endothelial cell-lineage analysis in vivo. *Dev Biol.* 2001; 230:230-242.
- Kofler S, Nickel T, Weis M. Role of cytokines in cardiovascular diseases: a focus on endothelial responses to inflammation. *Clin Sci (Lond)* 2005; 108(3): 205–13.
- Koga M, Kai H, Yasukawa H, Yamamoto T, Kawai Y, et al. Inhibition of progression and stabilization of plaques by postnatal interferon- γ function blocking in ApoE-knockout mice. *Circ. Res.* 2007; 101:348–56.
- Kozarsky, K.F., Donahee, M.H., Glick, J.M., Krieger, M., and Rader, D.J. 2000. Gene transfer and hepatic overexpression of the HDL receptor SR-BI reduces atherosclerosis in the cholesterol-fed LDL receptor-deficient mouse. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20:721–727.
- Kozarsky, K.F., et al. 1997. Overexpression of the HDL receptor SR-BI alters plasma HDL and bile cholesterol levels. *Nature.* 387:414–417.
- Krieger M., Herz J., Structures and functions of multiligand lipoprotein receptors: Macrophage scavenger receptors and LDL receptor-related protein (LRP). *Annual Review of Biochemistry* 1994; 63: 601-607
- Krieger M., *Curr Opin Lipidol* 1997; 8: 275
- Kruth H.S., Jones N.L., Huang W., Zhao, B., Ishii, I., Chang, J., Combs, C.A., Malide, D., Zhang, W.Y. "Macropinocytosis is the endocytic pathway that mediates macrophage foam cell formation with native low density lipoprotein." *Journal of Biological Chemistry* 2005; 280 (3), 2352–2360.
- Kuchibhotla S, Vanegas D, Kennedy DJ, Guy E, Nimako G, et al. Absence of CD36 protects against atherosclerosis in ApoE knock-out mice with no additional protection provided by absence of scavenger receptor A I/II. *Cardiovasc. Res.* 2008; 78:185–96.
- Kunitake ST, La Sala KJ, Kane JP. Apolipoprotein A-I-containing lipoproteins with pre-beta electrophoretic mobility. *J Lipid Res.* 1985; 26:549 –555.
- Landmesser U, Spiekermann S, Dikalov S, Tatge H, Wilke R, Kohler C, Harrison DG, Hornig B, Drexler H. Vascular oxidative stress and endothelial dysfunction in patients with chronic heart failure: role of xanthine-oxidase and extracellular superoxide dismutase. *Circulation* 2002; 106: 3073-3078.
- Lange, Y. Disposition of intracellular cholesterol in human fibroblasts. *J. Lipid Res.* 1991 32, 329–339.
- Lee TS, Yen HC, Pan CC, Chau LY.. The role of interleukin 12 in the development of atherosclerosis in ApoE-deficient mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1999; 19:734–42.
- Li JS, Sharifi AM, Schiffrin EL. Effect of AT1 angiotensin-receptor blockade on structure and function of small arterin SHR. *J Cardiovasc Pharmacol* 1997; 30: 75-83.
- Li XA, Guo L, Dressman JL, Asmis R, Smart EJ. A novel ligand-independent apoptotic pathway induced by scavenger receptor class B, type I and suppressed by endothelial nitric-oxide synthase and high density lipoprotein. *J Biol Chem.* 2005; 280: 19087–19096.
- Li X.A., et al. High density lipoprotein binding to scavenger receptor, class B, type I activates endothelial nitric-oxide synthase in a ceramide dependent manner. *J. Biol. Chem.* 2002; 277:11058–11063.

- Li X.A., Guo, L., Asmis, R., Nikolova-Karakashian, M., and Smart, E.J.. Scavenger receptor BI prevents nitric oxide-induced cytotoxicity and endotoxin-induced death. *Circ. Res.* 2006; 98:e60–e65
- Li X.A., Guo, L., Dressman, J.L., Asmis, R., and Smart, E.J.. A novel ligand-independent apoptotic pathway induced by scavenger receptor class B, type I and suppressed by endothelial nitric-oxide synthase and high density lipoprotein. *J. Biol. Chem.* 2005; 280:19087–19096.
- Libby P, Hansson GK. Involvement of the immune system in human atherogenesis: current knowledge and unanswered questions. *Lab Invest* 1991; 64:5–15.
- Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 2002; 105: 11114.
- Lim YC, Garcia-Cardena G, Allport JR, Zervoglos M, Connolly AJ, Gimbrone MA Jr, Luscinskas FW. Heterogeneity of endothelial cells from different organ sites in T-cell subset recruitment. *Am J Pathol* . 2003; 162:1591-1601.
- Linsel-Nitschke and Alan R.Tall "HDL as target in the treatment of atherosclerotic cardiovascular disease." *Nature* ;2005,4:193-204.
- Mallat Z, Benamer H, Hugel B, Benessiano J, Steg PG, Freyssinet JM, Tedgui A. Elevated levels of shed membrane microparticles with procoagulant potential in the peripheral circulating blood of patients with acute coronary syndromes. *Circulation*. 2000; 101: 841–843.
- Marelli-Berg FM, Peek E, Lidington EA, Stauss HJ, Lechler RI. Isolation of endothelial cells from murine tissue. *J Immunol Methods* . 2000; 244:205-215.
- Marsche G., et al. Identification of the human analog of SR-BI and LOX-1 as receptors for hypochlorite-modified high density lipoprotein on human umbilical venous endothelial cells. *FASEB J.* 2001; 15:1095–1097.
- Martin-Ventura J.L., et al. Treatment with amlodipine and atorvastatin has additive effect on blood and plaque inflammation in hypertensive patients with carotid atherosclerosis. *Kidney Int Suppl*, 2008; (111): p. S71-4.
- Martinez MC, Tesse A, Zobairi F, Andriantsitohaina R. Shed membrane microparticles from circulating and vascular cells in regulating vascular function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005; 288: H1004–H1009.
- Mineo C, Deguchi H, Griffin JH, Shaul PW. Endothelial and antithrombotic actions of HDL. *Circ Res* 98:1352–1364. *Trends Cell Biol* . 2006; 12:112–120.
- Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43: 109-41.
- Monnink SH, van Haelst PL, van Boven AJ, Stroes ES, Tio RA, Plokker TW, Smit AJ, Veeger NJ, Crijns HJ, van Gilst WH. Endothelial dysfunction in patients with coronary artery disease: a comparison of three frequently reported tests. *J Investig Med* ; 2002; 50: 19-24.
- Morikawa A, Koide N, Kato Y, et al. Augmentation of nitric oxide production by gamma interferon in a mouse vascular endothelial cell line and its modulation by tumor necrosis factor alpha and lipopolysaccharide. *Infect Immun* 2000;68:6209–6214.
- Naito Y., et al. Azelnidipine, a new calcium channel blocker, inhibits endothelial inflammatory response by reducing intracellular levels of reactive oxygen species. *Eur J Pharmacol*, 2006; 546(1-3): p. 11-8.

- Nakagawa A., Shiratsuchi, A., Tsuda, K., and Nakanishi, Y. In vivo analysis of phagocytosis of apoptotic cells by testicular Sertoli cells. *Mol.Reprod. Dev.* 2005;71:166–177.
- Nakashima Y, Plump AS, Raines EW, Breslow JL, and Ross R. ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arterioscler Thromb* 1994; 14: 133–140.
- Ohashi R., H.Mu, X.Wang, Q Yao and Chen. Reverse cholesterol transport and cholesterol efflux in atherosclerosis. *QJM.* 2005.
- Ohta H, Wada H, Niwa T, Kirii H, Iwamoto N, et al. Disruption of tumor necrosis factor- α gene diminishes the development of atherosclerosis in ApoE-deficient mice. *Atherosclerosis.* 2005; 180:11–17 .
- Osgood D., et al. Genetic variation at the scavenger receptor class B type I gene locus determines plasma lipoprotein concentrations and particle size and interacts with type 2 diabetes: the Framingham study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2003; 88:2869–2879.
- Osono Y, Woollett LA, Marotti KR, et al. Centripetal cholesterol flux from extrahepatic organs to the liver is independent of the concentration of high density lipoprotein-cholesterol in plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A .* 1996; 93:4114–4119.
- Owen J.S., Mulcahy J.V. Atp-binding cassette A1 protein and HDL homeostasis. *Atherosclerosis Supplements;* 2002; 3:13-22.
- Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endrelaxing factor. *Nature;* 1987; 327: 524 .
- Panza JA, Quyyumi AA, Brush JE jr, Epstein SE. Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. *N Engl JMed* 1990; 323: 22-27.
- Park JB, Charbonneau F, Schiffrin EL. Correlation of endothelial function in large and small arteries in human essential hypertension. *J Hypertens* 2001; 19: 415-420.
- Perticone F, Ceravolo R, Maio R, et al. Calcium antagonist isradipine improves abnormal endothelium-dependent vasodilation in never treated Res 1999; 41: 299-306.
- Pitt B, Byington RP, Furberg CD, et al. Effect of amlodipine on the progression of atherosclerosis and the occurrence of clinical events. *Circulation* 2000; 102:1503-151243.
- Plantinga Y, Ghiadoni L, Magagna A, Giannarelli C, Franzoni F, Taddei S, Salvetti A. Supplementation with vitamins C and E improves arterial stiffness and endothelial function in essential hypertensive patients. *Am J Hypertens.* 2007 Apr;20(4):392-7.
- Plump AS, Smith JD, Hayek T, Aaltosetala K, Walsh A, Verstuyft JG, Rubin EM, and Breslow JL. Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein-E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell* 1992; 71: 343–353.
- Poston R, Haskard D, Couchier J et al. *Am J Patohol* (1992); 140: 665–73.
- Quehenberger, O. Molecular mechanisms regulating *Journal of Lipid Research* 2005;46 (8), 1582–1590.
- Randolph GJ, Jakubzick C, Qu C. Antigen presentation by monocytes and monocyte-derived cells. *Curr. Opin. Immunol.* 2008; 20:52–60.

- Recinos A, 3rd, LeJeune WS, Sun H, et al. Angiotensin II induces IL-6 expression and the Jak-STAT3 pathway in aortic adventitia of LDL receptor-deficient mice. *Atherosclerosis* 2007; 194: 125–133.
- Reddick RL, Zhang SH, and Maeda N. Atherosclerosis in mice lacking apo E. Evaluation of lesional development and progression. *Arterioscler Thromb* 1994; 14: 141–147.
- Rhainds, D., and Brissette, L. The role of scavenger receptor class B type I (SR-BI) in lipid trafficking. Defining the rules for lipid traders. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36:39–77.
- Rigotti, A., et al. A targeted mutation in the murine gene encoding the high density lipoprotein (HDL) receptor scavenger receptor class B type I reveals its key role in HDL metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1997; 94:12610–12615.
- Rizzoni D, Porteri E, Guelfi D, Muiesan M, Valentini U, Cimino A, Girelli A, Rodella L, Bianchi R, Sleiman I, Rosei EA. Structural alterations in subcutaneous small arteries of normotensive and hypertensive patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Circulation* 2002; 103: 1238-1244.
- Ronda, N., et al., Normal human IgG prevents endothelial cell activation induced by TNF α and oxidized low-density lipoprotein atherogenic stimuli. *Clin Exp Immunol*, 2003; 133(2): p. 219-26.
- Roquer J.T., Segura J. Serena J. Castillo Endothelial Dysfunction, Vascular Disease and Stroke: The ARTICO Study. *Cerebrovasc Dis* 2009; 27(suppl1):25–37.
- Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993; 362:801–809.
- Ross R. Atherosclerosis - an inflammatory disease. *N Engl J Med.* 1999; 340:115–126.
- Santamarina-Fojo S., Gonzales-Navarro H., Freeman L., Wagner E., Nong Z. Hepatic lipase, lipoprotein metabolism, and atherogenesis. *Atheroscl Thromb Vasv Biol.* 2004; 24:1750-1754.
- Schiffman EL. A critical review of the role of endothelial factors in the pathogenesis of hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol* 2001; 38 [suppl 2]: S3-S6.
- Schreyer SA, Peschon JJ, LeBoeuf RC. Accelerated atherosclerosis in mice lacking tumor necrosis factor receptor p 55. *J. Biol.* 1996; 271:26174–78.
- Scott James Pathophysiology and biochemistry of cardiovascular disease *Current Opinion in Genetics & Development* 2004; 14:271–279.
- Seetharam D, Mineo C, Gormley AK, Gibson LL, Vongpatanasin W, Chambliss KL, Hahner LD, Cummings ML, Kitchens RL, Marcel YL, Rader DJ, Shaul PW. High-density lipoprotein promotes endothelial cell migration and reendothelialization via scavenger receptor-B type I. *Circ Res.* 2006; 98:63-72.
- Sheikine Y., Hansson G.K. Chemokines and atherosclerosis. *Annals of Internal Medicine* 2004; 36 (2):98–118.
- Shima, E., et al., Calcium channel blockers suppress cytokine-induced activation of human neutrophils. *Am J Hypertens*, 2008; 21(1): p. 78-84.
- Simon A ,Gariépy J,Moyse D,et al.Differential effects of nifedipine and coamilofide on the progression of early carotid wall changes. *Circulation* 2001; Jun19;103(24): 2949-54 .

- Simons K. and Eehalt, R. Cholesterol, lipid rafts, and disease. *J. Clin. Invest.* 110, 597–603.
- Skalen K., Gustafsson, M., Rydberg, E.K., Hulten, L.M., Wiklund, O., Innerarity, T.L., Boren, J. Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis. *Nature*; 2002;417 (6890):750–754.).
- Sprague AH, Raouf A. Khalil. Inflammatory cytokines in vascular dysfunction and vascular disease. *Biochemical Pharmacology* 78 2009; 539–552.
- Staessen JA, Wang JG, Thijs L. Cardiovascular protection and blood pressure education: a metaanalysis. *Lancet* 2001; Oct20; 358(9290): 1305.
- Stryer L. "Biochimica". 1996 Zanichelli, Bologna; pp.808-820 .
- Stults B, Jones RE. Management of hypertension in diabetes. *Diabetes Spectrum* 2006; 19:25–31.
- Sugano M, Tsuchida K, Makino N. High-density lipoproteins protect endothelial cells from tumor necrosis factor- α -induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000; 272: 872–876.
- Swirski, F. K. et al. Ly-6C monocytes dominate hypercholesterolemia-associated monocytosis and give rise to macrophages in atheromata. *J. Clin. Invest.* 2007; 117, 195–205.
- Tabas, I. Consequences of cellular cholesterol accumulation: basic concepts and physiological implications. *J. Clin. Invest.* 2002; 110, 905–911.
- Tacke, F. et al. Monocyte subsets differentially employ CCR2, CCR5, and CX3CR1 to accumulate within atherosclerotic plaques. *J. Clin. Invest.* 2007; 117, 185–194.
- Takahashi, K., Takeya, M., Sakashita, N. "Multifunctional roles of macrophages in the development and progression of atherosclerosis in humans and experimental animals." *Medical Electron Microscopy* 2002; 35 (4),179–203.
- Takeda N, Manabe I, Shindo T, et al. Synthetic retinoid Am80 reduces scavenger receptor expression and atherosclerosis in mice by inhibiting IL-6. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 1177–1183.
- Tamagaki T, Sawada S, Imamura H, Tada Y, Yamasaki S, Toratani A, Sato T, Komatsu S, Akamatsu N, Yamagami M, Kobayashi K, Kato K, Yamamoto K, Shirai K, Yamada K, Higaki T, Nakagawa K, Tsuji H, Nakagawa M. Effects of high-density lipoproteins on intracellular pH and proliferation of human vascular endothelial cells. *Atherosclerosis.* 1996
- Tauber JP, Cheng J, Massoglia S, Gospodarowicz D. High density lipoproteins and the growth of vascular endothelial cells in serum-free medium. *In Vitro.* 1981; 17: 519–530.
- Tedgui A, Mallat Z. Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. *Physiol. Rev.* 2006; 86:515–81.
- Toba, Nakagawa Y, Miki S. et al. Calcium channel blockades exhibit anti-inflammatory and antioxidative effects by augmentation of endothelial nitric oxide synthase and the inhibition of angiotensin converting enzyme in the N(G)-nitro-L-arginine methyl ester-induced hypertensive rat aorta: vasoprotective effects beyond the blood pressure-lowering effects of amlodipine and manidipine. *Hypertens Res.* 2005 Aug;28(8):689-700.
- Toba H., et al., Calcium [corrected] channel blockers reduce angiotensin II-induced superoxide generation and inhibit lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 expression in endothelial cells. *Hypertens Res*, 2006. 29(2): p. 105-16.

- Trigatti B., et al. 1999. Influence of the high density lipoprotein receptor SR-BI on reproductive and cardiovascular pathophysiology. *Proc. Natl. Acad.Sci. U. S. A.* 96:9322–9327.
- Ueda Y., et al. Lower plasma levels and accelerated clearance of high density lipoprotein (HDL) and non-HDL cholesterol in scavenger receptor class B type I transgenic mice. *J. Biol. Chem.* 1999; 274:7165–7171.
- Ueda Y., et al. Relationship between expression levels and atherogenesis in scavenger receptor class B, type I transgenics. *J. Biol. Chem.* 2000; 275:20368–20373.
- Ulbrich H, Eriksson EE, Lindbom L. Leukocyte and endothelial cell adhesion molecules as targets for therapeutic interventions in inflammatory disease. *Trends Pharmacol Sci* 2003;24:640–647.
- Upadhyaya S, Mooteri S, Peckham N, Pai RG. Atherogenic effect of interleukin-2 and antiatherogenic effect of interleukin-2 antibody in apo-E-deficient mice. *Angiology* 2004. 55:289–94 97.
- Van Eck M., Bos, I.S., Hildebrand, R.B., Van Rij, B.T., and Van Berkel, T.J. Dual role for scavenger receptor class B, type I on bone marrow-derived cells in atherosclerotic lesion development. *Am. J. Pathol.* 2004; 165:785–794.
- Van Eck M., et al. Differential effects of scavenger receptor BI deficiency on lipid metabolism in cells of the arterial wall and in the liver. *J. Biol. Chem.* 2003; 278: 23699–23705.
- Van Haperen R, Van Tol A, Venmeulen P, Jauhiainen M, Van Gent T, Van den Berg P, Ehnholm S, Grosveld F, Van der Kamp A, De Crom R. Human plasma phospholipids transfer protein increases the antiatherogenic potential of high density lipoproteins in transgenic mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*; 2000; 20:1082–1088.
- Varban M.L., et al. Targeted mutation reveals a central role for SR-BI in hepatic selective uptake of high density lipoprotein cholesterol. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1998; 95:4619–4624.
- Verma S, Buchanan MR, Anderson TJ: Endothelial function testing as a biomarker of vascular disease. *Circulation* 2003; 108: 2054–2059.
- Verza M, A. Autorino, G. Chiorazzo, D. Pinto, R. Orlando, R. Marfella Therapy with Ca-antagonists in hypertensive patient. *Cardiologia ambulatoriale* 2007; 2-3:42-56.
- Vila E, Salaices M. Cytokines and vascular reactivity in resistance arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 288(3):H1016–21.
- Wang JG, Staessen JA. Conventional therapy and newer drug classes for cardiovascular protection in hypertension. *J Am Soc Nephrol* 2002 Nov; 13Suppl. 3:S208-15".
- Wassmann S, Hilgers S, Laufs U, Bohm M, Nickenig G. Angiotensin II type 1 receptor antagonism improves hypercholesterolemia-associated endothelial dysfunction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 1208-1212.
- Wassmann S, Stumpf M, Strehlow K, et al. Interleukin-6 induces oxidative stress and endothelial dysfunction by overexpression of the angiotensin II type 1 receptor. *Circ Res* 2004; 94: 534–541.
- Weber MA, Julius S, Kjeldsen SE, et al. Blood pressure dependent and independent effects of antihypertensive treatment clinical events in the VALUE trial. *Lancet* 2004;363:2049-2051.

- Wentworth P Jr, Nieva J, Takeuchi C, Galve R, Wentworth AD, Dilley RB, DeLaria GA, Saven A, Babior BM, Janda KD et al.: Evidence for ozone formation in human atherosclerotic arteries. *Science* 2003; 302:1053-1056.
- Widlansky ME, Gokce N, Keaney F, Vita JA. The clinical implications of endothelial dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 2003; 42: 1149-1160.
- Wilkinson IB, Megson IL, MacCallum H, Sogo N, Cockcroft JR, Webb DJ: Oral vitamin C reduces arterial stiffness and platelet aggregation in humans. *J Cardiovasc Pharmacol* 1999;34:690 – 693 2004; 24:1485–1491.
- Williams D. L., Rothblat G. H., et al., Scavenger receptor BI and cholesterol trafficking. *Curr Opin Lipidol* 1999; 10: 329-339.
- Williams K.J., Tabas, I. Lipoprotein retention—and clues for atheroma regression”. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2005; 25 (8):1536–1540.
- Wong J. et al. SREBP-2 positively regulates transcription of the cholesterol efflux gene, ABCA1 by generating oxysterol ligands for LXR. *Biochem. J.* 2006; 400, 485–491 .
- Yang, C. et al. Sterol intermediates from cholesterol biosynthetic pathway as LXR ligands. *J. Biol. Chem.* 2006; 281, 27816–27826.
- Yeboah J, Crouse JR, Hsu FC, Burke GL, Herrington DM. Brachial flow-mediated dilation predicts incident cardiovascular events in older adults: the Cardiovascular Health Study. *Circulation* 2007; 115: 2390– 2397.
- Yeh Y.C., Hwang G.Y., Liu I.P., and Yang, V.C.. Identification and expression of scavenger receptor SR-BI in endothelial cells and smooth muscle cells of rat aorta in vitro and in vivo. *Atherosclerosis*. 2002; 161:95–103.
- Yuhanna IS, Zhu Y, Cox BE, Hahner LD, Osborne-Lawrence S, Lu P, Marcel YL, Anderson RG, Mendelsohn ME, Hobbs HH, Shaul PW. High-density lipoprotein binding to scavenger receptor-BI activates endothelial nitric oxide synthase. *Nat Med*. 2001; 7:853-857.
- Zanchetti A, Rosei EA, DalPalu C et al. The Verapamil in Hypertension and Atherosclerosis Study (VHAS): results of long-term randomized treatment with either verapamil or chlorthalidone on carotid intima-media thickness. *J Hypertens* 1998; Nov; 16(11): 1667-76.
- Zanchetti, A., Closing remarks: current position of calcium channel antagonists in hypertension—the role of manidipine. *Drugs*, 2005; 65 Suppl 2: p. 40-2.
- Zernecke, A., Weber, C., “Inflammatory mediators in atherosclerotic vascular disease.” *Basic Research in Cardiology*; 2005, 100 (2), 93–101. 2002; 99:11896 –11901.
- Zhang H, Reddick RL, Piedrahita JA, and Maeda N. Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein-E. *Science* 1992; 258: 468–471.
- Zhang X, Niessner A, Nakajima T, Ma-Krupa W, Kopecky SL, et al. Interleukin 12 induces T-cell recruitment into the atherosclerotic plaque. *Circ. Res.* 2006; 98:524–31.
- Zhang Y, Da Silva JR, Reilly M, Billheimer JT, Rothblat GH, Rader DJ. Hepatic expression of scavenger receptor class B type I (SR-BI) is a positive regulator of macrophage reverse cholesterol transport in vivo. *J Clin Invest*. 2005; 115:2870-2874.
- Zhang W., et al. Inactivation of macrophage scavenger receptor class B type I promotes atherosclerotic lesion development in apolipoprotein E- deficient mice. 2003; 108:2258–2263.

Zhou X, Paulsson G, Stemme S, Hansson GK. Hypercholesterolemia is associated with a T helper (Th) 1/Th2 switch of the autoimmune response in atherosclerotic apo E-knockout mice. *J. Clin. Invest.* 1998; 101:1717–25.