

L'Aterosclerosi

Le malattie cardiovascolari, quali l'infarto, l'ictus e l'insufficienza cardiaca (HF), rappresentano una delle principali cause di morte nel mondo sviluppato, e sono destinate a diventare uno dei problemi più significativi per la salute. L'aterosclerosi è la causa principale delle malattie cardiovascolari (James Scott et al. 2004).

Prevede la comparsa di danni e disfunzioni delle cellule endoteliali, la deposizione di lipidi, la migrazione cellulare anomala, l'infiammazione cronica e quindi la trombosi. E' una condizione patologica caratterizzata da lesioni aterosclerotiche chiamate ateromi, ossia un asimmetrico ispessimento focale dello strato più profondo dell'arteria, l'intima. Queste placche protrudono nel lume vascolare indebolendo anche la sottostante tonaca media e causando una serie di conseguenze come il restringimento o addirittura la completa ostruzione del lume vasale, sia in modo progressivo, sia in modo improvviso con la formazione di trombi (Cotran, 2000). Lipidi extra e intracellulari formano il cuore della lesione, che è circondato da una capsula di cellule muscolari lisce e matrice ricca di elementi del tessuto connettivo quali collagene, fibre elastiche e proteoglicani. Cellule T, macrofagi, e mast cellule si infiltrano nella lesione e sono particolarmente abbondanti nella regione della spalla dove la placca si accresce (Cotran, 2000) (Figura 1).

Le lesioni aterosclerotiche interessano principalmente le grandi e medie arterie elastiche e muscolari, e a livello cardiaco o cerebrale possono causare eventi ischemici o addirittura l'infarto. Le lesioni possono essere presenti per tutta la durata della vita. La lesione più precoce, la così detta stria lipidica ("fatty streak"), è comune nei bambini e nei neonati e rappresenta una lesione infiammatoria pura, che consiste nell'accumulo di monociti-macrofagi e linfociti T, preceduto da una deposizione extracellulare di lipidi amorfi; molti studiosi ritengono che siano precursori delle placche aterosclerotiche, benché non vi siano prove certe, in quanto alcune strie progrediscono effettivamente in ateromi, mentre altre

dissolvono (Cotran, 2000; Hansson GK et al., 2005).

Le cellule dell'immunità e dell'infiammazione dominano nelle fasi precoci della lesione aterosclerotica. Le loro molecole effettrici accelerano la progressione della lesione, e l'attivazione dell'infiammazione che può condurre alla sindrome coronarica acuta (Cipollone F., 2004).

L'infarto al miocardio si verifica quando il processo di aterogenesi previene il flusso di sangue nell'arteria coronarica. Un tempo si pensava che un progressivo restringimento del lume del vaso fosse la causa principale di infarto. Ora è evidente che l'attivazione della placca, piuttosto che la stenosi vasale precipita in ischemia e infarto (Hansson, 2005).

Patogenesi

Studi autoptici dimostrano che l'aterosclerosi si sviluppa in modo progressivo, anche per molti anni. Nella sperimentazione animale è stata riprodotta in modelli murini, in cui una dieta ricca di colesterolo e la manipolazione genetica provocano lesioni accelerate. Questi animali sono i topi knockout per il gene dell'apolipoproteina E ($ApoE^{-/-}$), e per il gene del recettore delle lipoproteine ad elevata densità, LDL-R (Ishibashi S. et al., 1993; Ishibashi S. et al., 1994; Plump AS, et al., 1992; Zhang H. et al., 1992). Essi presentano varie lesioni arteriose che progrediscono dallo stato di strie lipidiche ricche in foam cells fino allo stadio di placche fibro-proliferative con core lipidico/necrotico, caratteristica tipica delle lesioni nell'uomo (Ishibashi S, et al., JCI 1994; Nakashima Y, et al., 1994; Reddick RL, et al., 1994). Questi studi hanno prodotto un quadro dell'evoluzione dell'aterosclerosi da stria lipidica alla placca complessa e quindi alle patologie cliniche (Scott J., 2004).

Le caratteristiche delle placche aterosclerotiche mostrano come l'aterosclerosi sia una patologia complessa, e che le diverse componenti del sistema vascolare, metabolico e del sistema immunitario siano coinvolte in questo processo (figura 1). La patofisiologia dell'aterosclerosi dipende da diversi fattori ereditari e ambientali. Si presume che fattori

genetici e acquisiti contribuiscano alla progressione del processo.

Poiché le alte concentrazioni di colesterolo, in particolare di lipoproteine a bassa densità (LDL colesterolo), rappresentano uno dei principali fattori di rischio per l'aterosclerosi, per molti anni si è ritenuto che tale patologia consistesse principalmente nell'accumulo passivo di lipidi all'interno della parete vascolare; in realtà, l'aterosclerosi è molto di più di questo. Infatti, le lesioni aterosclerotiche rappresentano una serie di risposte cellulari e molecolari altamente specifiche che, nell'insieme, possono essere descritte come una malattia infiammatoria (Libby P. et al 1991).

Numerose osservazioni nell'uomo e nell'animale hanno portato a formulare l'ipotesi dell'aterosclerosi come risposta al danno endoteliale, ritenendo inizialmente che la denudazione endoteliale rappresentasse il primo stadio dell'aterosclerosi. La versione più recente di questa ipotesi enfatizza invece la disfunzione endoteliale come *primum movens* dell'aterosclerosi. Ognuna delle lesioni caratteristiche dell'aterosclerosi rappresenta uno stadio differente di un processo infiammatorio cronico dell'arteria: se questo non è controllato e procede in modo eccessivo, darà luogo a lesioni avanzate e complicate.

Cause possibili della disfunzione endoteliale che conduce all'aterosclerosi comprendono un aumento delle LDL e le loro modificazioni ossidative; i radicali liberi formati in seguito al fumo di sigaretta, l'ipertensione, il diabete mellito, alterazioni genetiche, l'iperomocistemia, microrganismi infettivi come l'Herpes Virus e la *Chlamydia pneumoniae*, la combinazione di questi fattori.

Il danno endoteliale è seguito dall'infiltrazione dei macrofagi, ossidazione delle LDL, proliferazione cellulare delle cellule muscolari lisce e trombosi (figura 2). I mediatori dell'infiammazione che dirigono, promuovono ed enfatizzano la progressione della malattia possono essere suddivisi in base al tipo cellulare, e in base alla rilevanza temporale che assumono nei vari stadi della patologia. L'orchestrazione dei processi associati alla formazione della placca, è inizialmente promossa dalle cellule endoteliali, dalle cellule

muscolari lisce, piastrine, linfociti, monociti e macrofagi. In modo reciproco e interattivo, queste cellule generano un'ampia gamma di molecole quali citochine, fattori di crescita, eicosanoidi, proteasi e ROS (specie reattive dell'ossigeno), che causano un'inflammatione un'acuta e eventualmente cronica nei vasi.

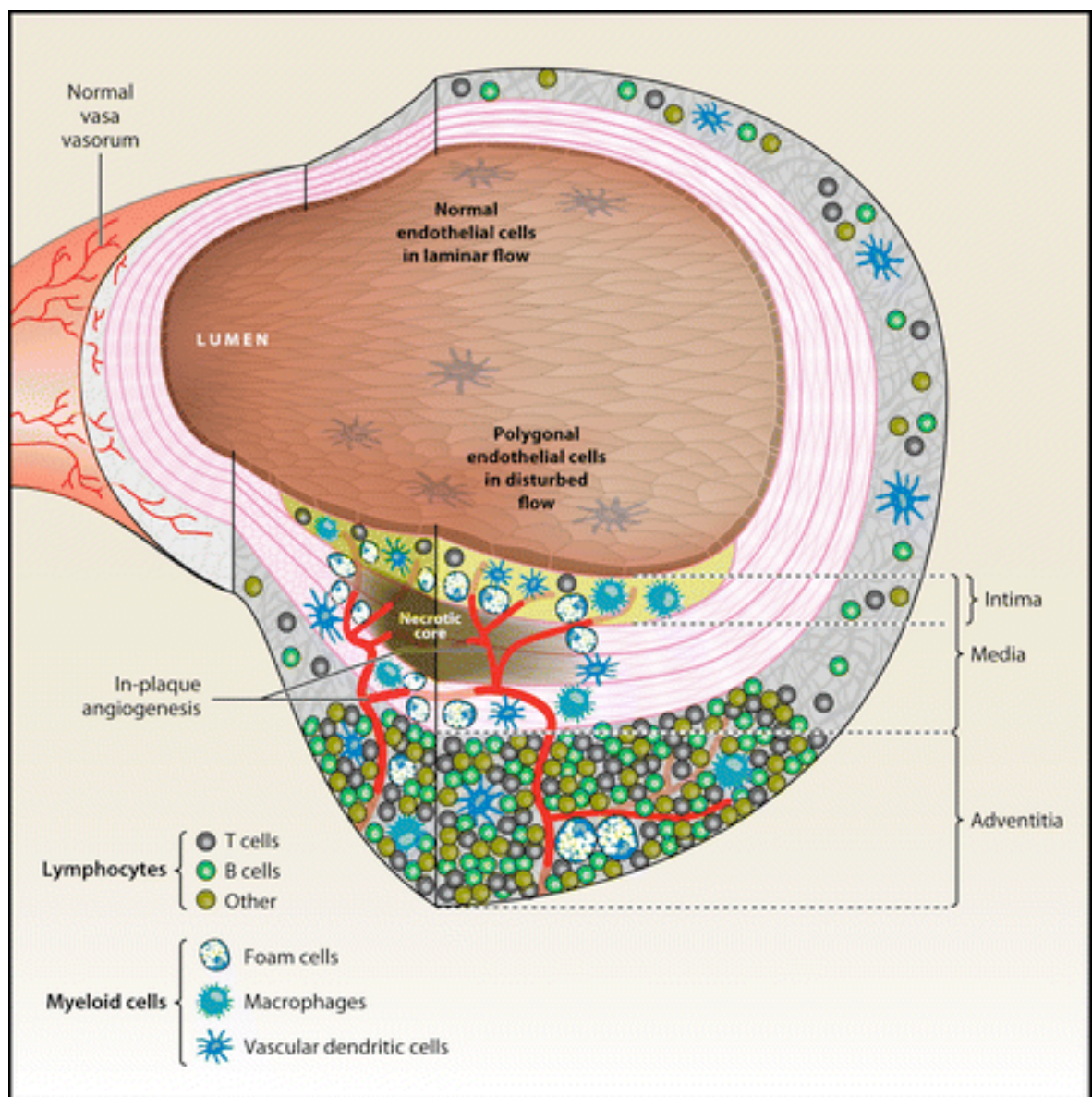


Figura 1. Le diverse popolazioni cellulari coinvolte nell'aterosclerosi.

Processo ossidativo

Le LDL così come altre macromolecole sono trasportate in caveole attraverso le cellule endoteliali nell'intima vascolare. Le LDL sono così trattenute nel sub-endotelio grazie all'interazione con proteoglicani della matrice extracellulare (Skalen K, et al. 2002).

Le LDL una volta intrappolate, sono legate e ossidate dalle specie reattive dell'ossigeno (anione superossido, perossido di idrogeno, perossidi lipidici e perossinitrito), e vengono inattivate da antiossidanti assunti con la dieta, e da enzimi cellulari come ad esempio la glutathione perossidasi. Quest'ultimo rappresenta il principale enzima antiossidante, i cui bassi livelli sono associati ad una minore predisposizione a sviluppare ad aterosclerosi (Wentworth P Jr, et al. 2003). Un elevato stress ossidativo si trova anche nell'ipertensione (mediata dall' aumento della produzione di angiotensina II) e nel fumo di sigaretta (come risultato della ridotta attività della glutathione perossidasi) (Higashi Y., 2002; Wentworth P Jr. et al. 2003). Questo rappresenta un esempio interessante di come convergano i diversi meccanismi che stanno alla base dei principali fattori di rischio per l'aterosclerosi.

Una volta che si è realizzato il danno endoteliale, si osserva la tendenza delle LDL a passare nello strato sottoendoteliale, dei leucociti o delle piastrine ad aderire all'endotelio, mentre le proprietà pro-coagulanti dell'endotelio tendono a prevalere su quelle anticoagulanti. Se la risposta infiammatoria non è in grado di neutralizzare efficacemente o a rimuovere gli agenti dannosi, essa può continuare indefinitamente e stimolare la migrazione e la proliferazione delle cellule muscolari lisce, che diventano elementi largamente presenti nella sede dell'infezione e formano una lesione intermedia (Cipollone F., 2004). Se queste risposte continuano ulteriormente, possono provocare un ispessimento della parete arteriosa che in un processo detto di rimodellamento compensatorio, compensa la stenosi dilatandosi gradualmente in modo da far restare inalterato il lume dei vasi. I macrofagi derivati dai monociti circolanti, ed alcuni sottotipi di linfociti T sono presenti durante tutte le fasi della malattia aterosclerotica. Il progredire del processo infiammatorio dà luogo ad un

aumento del numero di monociti-macrofagi e linfociti T, che migrano dal sangue e si moltiplicano all'interno della lesione (Cipollone F., 2004) (figura 2b).

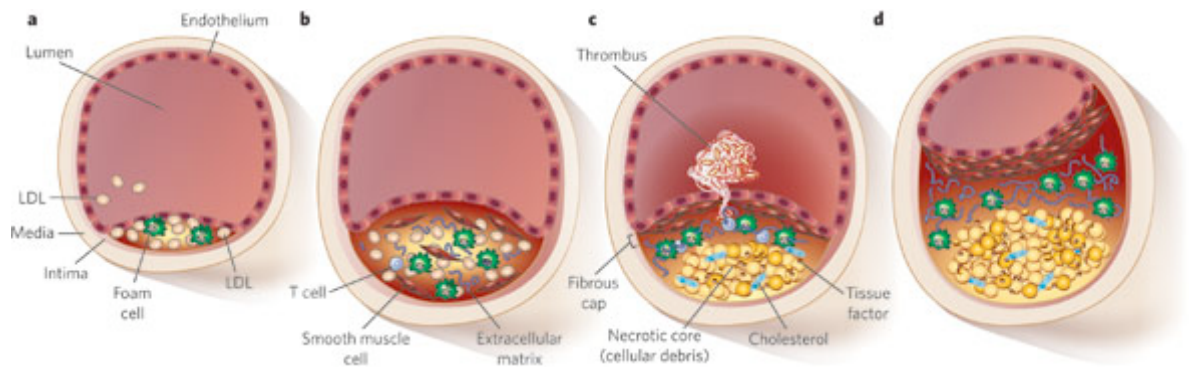


Figura 2 Formazione e progressione della placca aterosclerotica.

Formazione della placca

adesione

Nella fase pre-aterosclerotica, un largo numero di cellule del sangue, in modo predominante monociti e cellule T, aderiscono al lume dell'endotelio a livello delle aree predisposte allo sviluppo di lesioni aterosclerotiche (Babaev, V.R., 1993, Bobryshev & Lord, 1995). Queste rappresentano dei siti specifici delle arterie, come le diramazioni, le biforcazioni e le curvature, che causano caratteristiche alterazioni del flusso sanguigno, come una riduzione dello shear stress (lo sforzo di taglio tangenziale), che il sangue esercita sulle pareti del vaso) e un aumento della turbolenza (Cipollone F., 2004). Il continuo aumento dell'adesione di monociti e cellule T al lume endoteliale è una caratteristica delle prime fasi dello sviluppo della lesione aterosclerotica e progredisce con il loro passaggio nella tonaca intima (Wick et al., 2005) (Figura 2). Studi con il

microscopio elettronico a trasmissione hanno messo evidenza che le cellule dell'endotelio a livello di lesioni aterosclerotiche precoci sono caratterizzate da un incremento del numero di microvescicole nel loro citoplasma, indice di un aumento del trasporto transendoteliale e di attivazione cellulare (Ross. R., 1993; Williams & Tabas, 2005). Un incremento della permeabilità del lume endoteliale potrebbe portare a un incremento dell'accumulo di lipoproteine, in particolare LDL a livello della tonaca intima (Williams, K.J., 2005) (figura 2a).

L'adesione dei monociti all'endotelio e la loro successiva migrazione nel vaso arterioso sono facilitate dalla presenza di molecole di adesione cellulare sulla superficie delle cellule endoteliali (Blankenberg S., 2003; Quehenberger O., 2005). In particolare il rotolamento dei monociti sul monostrato è mediato dalla famiglia delle selectine, proteine di adesione. L-selectina è espressa sulla superficie dei monociti, mentre P-selectina ed E-selectina sulla superficie delle cellule del lume endoteliale attivato (Blankenberg S., 2003; Quehenberger O., 2005). L'interazione tra queste 3 selectine e i loro principali ligandi, carboidrati ricchi di fucosio e acido sialico, non determina però una ferma adesione all'endotelio che si stabilisce tramite l'interazione tra le integrine, espresse dai monociti (integrina $\beta 1$ e integrine $\beta 2$), e i loro ligandi espressi dalla superficie endoteliale; in particolare ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) e VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) appartenenti alla super famiglia delle immunoglobuline, la cui espressione aumenta in seguito all'attivazione dei monociti e delle celluleT (Galkina E, Ley K. 2007).

In studi sull'uomo e in animali sia le integrine che le selectine sono infatti espresse in modo considerevole, e con una maggiore affinità per i loro ligandi, nelle aree delle arterie caratterizzate da lesioni aterosclerotiche; così come un incremento di ICAM-1 e VCAM-1 è associato ad un accumulo di leucociti nella tonaca intima (Blankenberg S.et al., 2003; Quehenberger, 2005). Si è inoltre osservato che l'assenza di P-selectina porta ad una riduzione delle strie lipidiche, accompagnata da una riduzione dei macrofagi migrati nella

placca (Galkina E, Ley K. 2007).

Inoltre l'espressione del gene che codifica per la molecola di adesione CD44 è indotta in modo specifico nelle lesioni aterosclerotiche e la sua delezione, porta ad un minor reclutamento dei monociti con un ridotto sviluppo di aterosclerosi (Cuff CA. et al., 2001).

Molti fattori chemotattici e citochine, che regolano il legame e la migrazione delle cellule del sangue nei vasi arteriosi, sono prodotti a livello di lesioni aterosclerotiche. Tra questi troviamo monocytes chemoattractant protein-1(MCP-1), macrophage colony-stimulating factor (M-CSF), granulocyte/macrophage colony stimulating factor (GM-CSF), migratory inflammatory protein (MIP-1), transforming growth factor (TGF)- β , RANTES e endotelin-1 (ET-1) (Takahashi et al., 2002; Sheikine&Hansson, 2004; Zerneck & Weber, 2005).

Monociti circolanti sono attivati da una varietà di citochine pro-infiammatorie inclusa interleukina-1 (IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12) e il tumor necrosis factor (TNF)- α prodotto dalle cellule dell'intima in risposta all'infiltrazione delle lipoproteine (Takahashi et al., 2002; Sheikine & Hansson, 2004; Zerneck & Weber, 2005).

La sequenziale e sovrapposta azione di chemioattrattori, citochine e molecole di adesione determinano una solida adesione dei monociti circolanti a livello della lesione dell'endotelio. A sua volta le cellule dell'endotelio esprimono una varietà di fattori di crescita e mediatori vasoattivi come l'ossido nitrico (NO), ET-1, e angiotensina I e II che regolano le proprietà adesive dell'endotelio.

Formazione delle foam cells

Una volta aderito all'endotelio, i monociti migrano nell'intima, dove vanno incontro al differenziamento in cellule dendritiche, le più potenti cellule presentanti l'antigene, e in macrofagi a seconda del bilancio dei fattori di crescita (Takahashi et al., 2002; Sheikine & Hansson, 2004; Zerneck & Weber, 2005). Questi ultimi sono caratterizzati da un continuo

incremento del volume delle vescicole contenute nel citoplasma, dei vacuoli e dei lisosomi cui è associato un aumento progressivo dell'espressione di un loro antigene CD68 (Rosenfeld et al., 1992; Clinton et al., 1992) (Figura 3).

La popolazione macrofagica nelle lesioni aterosclerotiche precoci è eterogenea, ma la maggior parte accumula lipidi nel loro citoplasma trasformandosi in "foam cell" o cellule schiumose (Galkina E, Ley K., 2009) (figura 3). Nei vasi arteriosi, infatti, i macrofagi reagiscono con il microambiente della placca attraverso l'internalizzazione e il metabolismo di diverse componenti subendoteliali (Williams & Tabas, 2005; Skalen et al., 2002).

Recenti studi suggeriscono che a livello della placca aterosclerotica, si accumula preferenzialmente una sottopopolazione di macrofagi caratterizzata dall'espressione sulla membrana dell'antigene cellulare Ly6 e dei recettori delle chemochine CCR2 e CX₃CR1 (Swirski FK et al., 2007 ; Tacke F. et al., 2007).

Le lipoproteine circolanti si infiltrano nei vasi arteriosi, vengono intrappolate nell'intima, legandosi con i componenti della matrice e subiscono modificazioni (Williams & Tabas, 2005; Skalen et al., 2002). Studi biochimici e farmacologici condotti su lesioni umane o animali, mostrano come molte lipoproteine sono fuse insieme o aggregate e costituiscono il più potente induttore per la formazione di macrofagi carichi di lipidi (le "foam cell"). Il processo di internalizzazione di particelle lipoproteiche è solo parzialmente conosciuto e sembra possa avvenire tramite endocitosi mediata da recettore e fagocitosi mediante micropinocitosi all'interno di vacuoli di diametro da 0,5 a 5 µm (Kruth et al., 2005).

Queste lipoproteine aggregate o modificate (mediante ossidazione, glicazione, associazione con proteoglicani o incorporazione di immunocomplessi) sono internalizzate dai macrofagi per endocitosi mediata da recettori scavenger. Questo processo porta alla formazione di perossidi lipidici e facilita l'accumulo di colesterolo, determinando la formazione di cellule schiumose.

I macrofagi esprimono differenti tipi di recettori scavenger, con diversa struttura che possono internalizzare un vasta gamma di ligandi polianionici incluse le LDL modificate. Il ruolo dei recettori scavenger SRA-I e CD-36 nell'aterosclerosi rimane però controverso. Alcuni studi separati hanno dimostrato che la delezione del gene che codifica per SRA-I/II o CD-36 in animali (topo) iperlipidemici porta ad una marcata diminuzione dell'aterosclerosi e dell'accumulo di lipidi nelle arterie (Winther et al., 1999; Sakaguchi et al., 1998; Babaev et al., 2000; Suzuki et al., 1997). Recenti studi hanno inoltre osservato che la concomitante delezione del CD36 e SR-A I/II non determina un'ulteriore riduzione dell'aterosclerosi (Kuchibhotla S, et al. 2008).

Questi risultati suggeriscono che l'up-take delle ox-LDL da parte di SR-A e CD-36 sia un evento pre-aterogeno. Studi più recenti (Moore et al., 2005), hanno però riportato come una riduzione dell'up-take lipidico mediato da recettori scavenger A o CD36 non migliora l'aterosclerosi in topi iperlipidemici suggerendo l'esistenza di un meccanismo che può contribuire all'accumulo di colesterolo estere nei macrofagi, in vivo (Moore et al. 2005).

Dalla letteratura degli ultimi 10-20 anni si ha l'impressione che le foam cell si formino principalmente, ma non esclusivamente attraverso l'up-take di LDL ossidate anche se molte forme di LDL ossidate non inducono la formazione di foam cell in colture di macrofagi (F.R. Maxfield & Ira Tabas, 2005).

Dopo l'up-take, le varie lipoproteine, come le ox-LDL, lipoproteine remnants, β -very low density lipoproteins (β -VDLD) e LDL aggregate, vengono trasportate all'interno di vescicole verso i lisosomi, dove però, secondo recenti studi, non tutte le ox-LDL vengono degradate (Bobryshev, 2005).

L'uptake delle ox-LDL da parte dei macrofagi, almeno nei primi stadi dell'aterosclerosi, può essere considerato un meccanismo di protezione che provvede alla loro rimozione dato il loro effetto citotossico e proinfiammatorio. La progressiva migrazione di monociti-macrofagi nella tonaca intima, e il continuo up-take di ox-LDL, porta tuttavia alla formazione di un

largo numero di foam cell e quindi alla crescita della lesione aterosclerotica, il cui core soffice aumenta di dimensioni incrementando la vulnerabilità (Bobryshev Y. V., 2006). Il loro ruolo pro-aterogeno nelle lesioni precoci, è avvalorato dal fatto in topi con una ridotta differenziazione di macrofagi, causata dall'assenza del fattore di crescita M-CSF o da alterazioni dei recettori delle chemochine, le dimensioni della lesione si sono ridotte. Anche se il meccanismo con cui le foam cell inducono l'aterogenicità non è ancora ben noto, le loro abilità di secernere citochine infiammatorie e metalloproteinasi di matrice sono considerati i fattori contribuenti. I macrofagi foam cell possono partecipare in altri processi aterogeni precoci, quali la migrazione delle cellule muscolari lisce e la risposta immunitaria e infiammatoria mediata dalle cellule T. La principale questione è però se questo o l'altro ruolo delle foam cells nell'aterogenesi precoce è specificamente indotto dal carico di colesterolo o se il carico di colesterolo rappresenta un evento parallelo e non causale (Cipollone F., 2004).

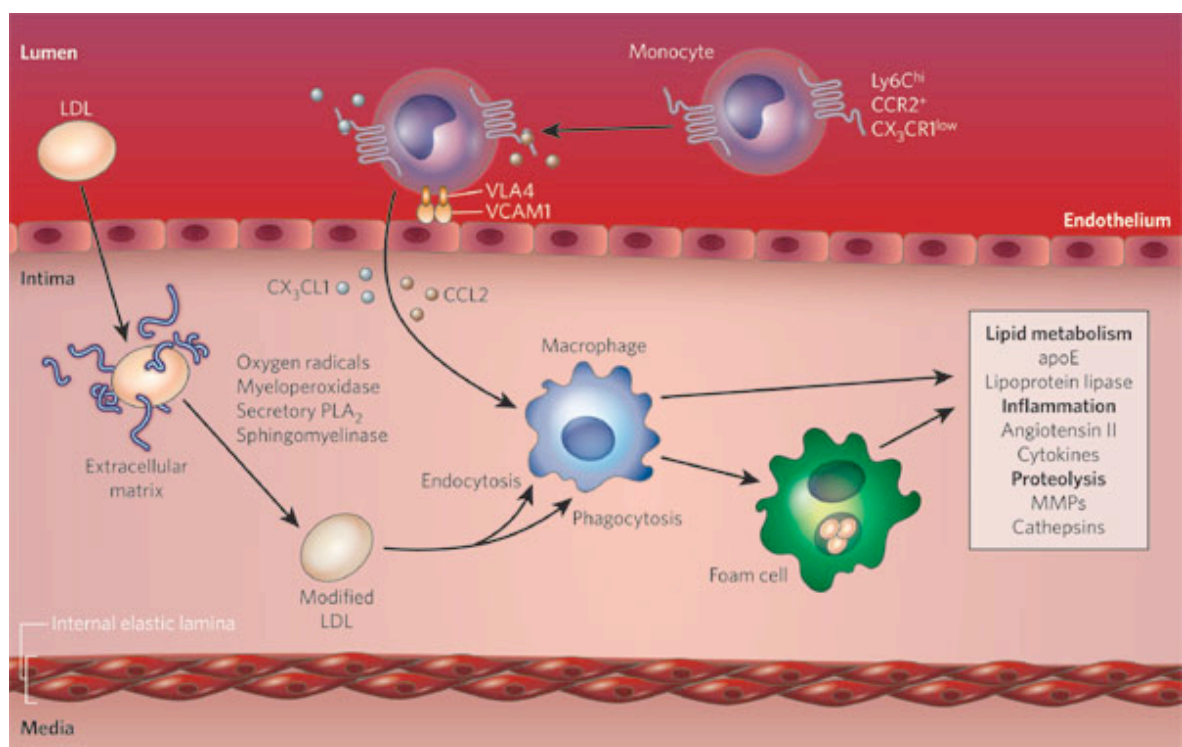


Figura 3. Reclutamento e formazione delle foam cells.

Meccanismi infiammatori dell'aterosclerosi

La presenza dei leucociti nelle arterie aterosclerotiche è riportato sin dal 1980 (Gerrity RG et al., 1979). Inizialmente si pensava che solo i macrofagi fossero principalmente presenti all'interno della placca, in realtà diversi studi hanno riportato la presenza stabile di diversi leucociti nell'aorta umana e di topo (Hansson GK, Libby P., 2006; Galkina E. Ley K., 2007).

I macrofagi attivati esprimono antigeni di istocompatibilità di classe II, che permettono loro di presentare gli antigeni ai linfociti T. Infatti i linfociti T, che risiedono normalmente nelle arterie non infiammate (Galkina E, Ley K. 2007); in condizioni prone all'aterosclerosi vengono reclutati all'interno dell'aorta sia nei primi stadi sia in nella lesione avanzata (Galkina E, Ley K. 2007). In tutte le fasi del processo aterosclerotico sia le cellule T CD4 che CD8 sono presenti nella lesione secondo diversi stadi. L'aterosclerosi è un processo dinamico e l'infiammazione che l'accompagna procede secondo diversi stadi. Le cellule T si attivano quando legano l'antigene processato e presentato dai macrofagi e la loro attivazione favorisce il rilascio di citochine, come l'INF- γ e il TNF- α e β , che amplificano la risposta infiammatoria. Ci sono evidenze che negli stadi precoci dell'aterosclerosi predomina la risposta delle cellule Th1, con produzione di IL-6, IFN- γ , e dell'anticorpo contro le LDL modificate, IgG2a (Zhou X, et al ,1998).

Anche le cellule muscolari lisce provenienti dalla lesione aterosclerotica esprimono sulla loro superficie HLA di classe II, presumibilmente indotte da IFN- γ , e possono anche presentare antigeni alle cellule T. Uno dei possibili antigeni potrebbero essere le LDL ossidate prodotte dai macrofagi. Una molecola immunoregolatrice, il ligando del CD40, può essere espressa dai macrofagi, dalle cellule T, dall'endotelio e dalle cellule muscolari lisce nelle lesioni aterosclerotiche in vivo e il suo recettore, il CD40, è espresso sulle stesse cellule. Entrambi sono presenti ad elevati livelli nelle lesioni aterosclerotiche, e ciò conferma ulteriormente l'attivazione immunitaria nelle lesioni (Cipollone F., 2004). Nella

placca aterosclerotica è stata inoltre descritta la presenza delle cellule dendritiche (Bobryshev YV, Lord RS. 1995). La loro funzione non è ancora ben chiara ma alcuni studi mostrano come le cellule dendritiche all'interno della placca nelle zone di neovascolarizzazione e in prossimità dei vasa vasorum con l'avventizia. Nel sistema immunitario, le cellule dendritiche sono definite come cellule che possono presentare l'antigene alle cellule T native. Esse migrano in modo costituzionale tra gli organi non linfoidi e i tessuti linfoidi secondari (Randolph GJ, Jakubzick C, Qu C. , 2008). Anche se non è stato dimostrato che le cellule dendritiche vascolari presentano l'antigene, diverse osservazioni sostengono la tesi che le cellule dendritiche presentino l'antigene alle cellule T in un contesto di molecole co-stimolatorie come CD40, OX40L, CD80 e CD86, promuovendo la differenziazione e la proliferazione cellulare. Se la risposta mediata dai TH1 è ben documentata nell'aterosclerosi, ci sono diverse evidenze che suggeriscono un ruolo dei linfociti Th2 nelle lesioni avanzate (figura 4).

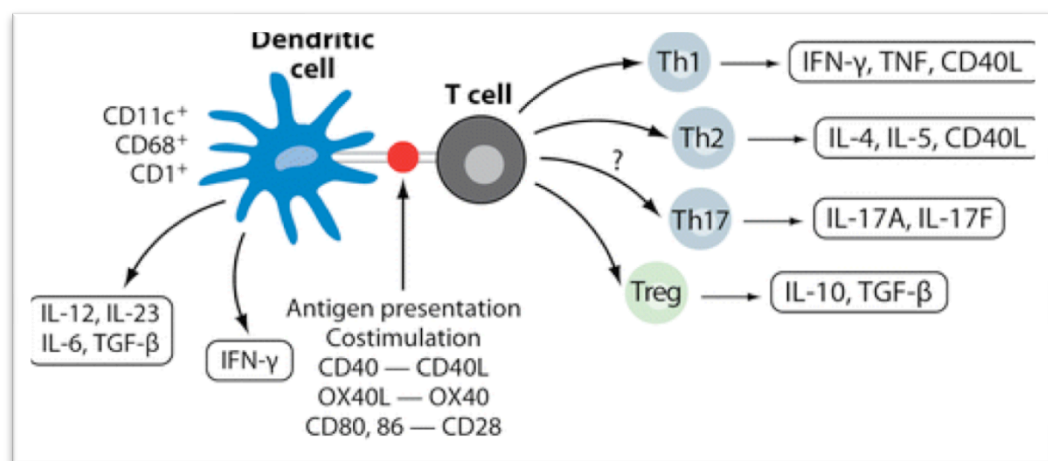


Figura 4. Interazione tra le cellule dendritiche e i linfociti T.

Formazione della capsula e del cuore necrotico

La migrazione e la proliferazione delle cellule muscolari lisce, indotta da fattori di crescita e da altre molecole, che normalmente non sono espresse nella parete del vaso, porta alla formazione della capsula fibrosa che va a rivestire il core soffice placca ricco di macrofagi della. Essa si forma per deposizione di una matrice di nuovo tessuto connettivo in cui vengono intrappolati lipidi intra ed extracellulari e le cellule muscolari stesse (Cipollone F., 2004). Inoltre l'intensa aggregazione di foam cell mediata dalla modulazione dell'E-caderine, porta alla formazione del cuore dell'ateroma, nel quale queste cellule vanno incontro a morte, determinando un accumulo extracellulare di lipidi e detriti cellulari (Takeichi, 1988, 1991; Illias & Tomlinson, 1997). Le ox-LDL contribuiscono alla citotossicità portando un danno al DNA (Hegy et al., 2001). E' ampiamente diffusa l'idea che la morte delle foam cell, nella placca aterosclerotica avviene per apoptosi, indotta da una serie di meccanismi quali il sistema Fas/Fas ligando, il NO, il p53 o dagli ossisteroli generati dall'ossidazione lipidica (Hegy et al., 2001; Takahashi et al., 2002; Akishima et al., 2005; Natarajan and Cai, 2005; tabas, 2005). Alcuni studi invece indicano che per maggior parte delle cellule dell'intima, inclusi i macrofagi foam cell, la morte viene per necrosi (Bobryshev et al., 1997, 2001). In ogni caso nelle lesioni avanzate i macrofagi vengono inglobati nel nucleo necrotico, caratteristico delle lesioni avanzate e complicate, che viene ad essere ricoperto da una capsula fibrosa.

Trombosi associata ad aterosclerosi

I macrofagi attivati, le cellule T e i mastociti nel core necrotico della placca, producono numerosi tipi di molecole come citochine infiammatorie, proteasi, fattori di coagulazione, radicali e molecole vasoattive che possono destabilizzare la lesione. Essi inibiscono la formazione della capsula fibrosa stabile, degradando il collagene che la costituisce (figura 2c). Tutti questi fattori possono indurre l'attivazione e la rottura della placca, con conseguente trombosi e ischemia. In particolare, due tipi di proteasi sono coinvolte nell'attivazione: matrice metalloproteinasi (MMPs) e cisteina proteasi (Takahashi et al., 2002). Di notevole interesse è la famiglia delle MMPs in considerazione della loro aumentata espressione ed attività negli ateromi umani, soprattutto nelle zone in cui è maggiore lo stress meccanico. Le MMPs presenti nella placca sembrano essere di origine macrofagica e la loro attività è controllata a diversi livelli: le citochine infiammatorie prodotte dai macrofagi (TNF- α e IL-1) inducono l'espressione dei geni, e il rilascio delle MMP da parte delle cellule muscolari lisce; la plasmina attiva la proforma di questi enzimi, ed infine l'inibitore delle metalloproteinasi sopprime la loro azione. Analogamente la cisteina proteasi, è indotta da alcune citochine e inibita da un inibitore chiamato "cistatina" (Goran K. et al., 2005).

Una placca instabile è caratterizzata da un notevole accumulo centrale di lipidi e detriti cellulari, riducendone così la consistenza e aumentando lo stress meccanico a cui è sottoposto il rivestimento fibroso. È stato inoltre osservato che i lipidi contenuti nel core lipidico sono caratterizzati da una elevata capacità trombogenica, e quindi possono favorire la trombosi al momento della rottura della placca.

Nella placca instabile aumenta il numero di macrofagi rispetto alle cellule muscolari. I primi potrebbero favorire la rottura della placca attraverso l'aumentata degradazione della matrice, da parte delle MMPs, e la produzione di Tissue Factor (fattore della via coagulativa che può favorire la trombosi intravascolare) (Goran K. et al., 2005). Il ridotto numero delle

cellule muscolari invece, potrebbe compromettere la capacità di produrre e di organizzare le proteine della matrice, in una struttura efficiente e resistente, favorendo la rottura (Goran K. et al., 2005) .

Il ruolo delle citochine nell'aterosclerosi

Le citochine hanno un ruolo chiave nell'infiammazione acuta e cronica. La regolazione della loro produzione dipende da diversi fattori ed è finemente regolata durante l'infiammazione. Molte citochine, come TNF- α , interleuchine quali, IL-1, IL-2, IL-3, IL-6, IL-8 (CXCL8), IL-10, IL-12, IL-15, IL-18, INF- γ , M-CSF, TGF- β 1, TGF- β 2, E TGF- β 3 sono state evidenziate nei vasi prone ad aterosclerosi (Tedgui A, Mallat Z., 2006).

Le cellule muscolari lisce e le cellule endoteliali producono TNF- α , IL-1, IL-6, CXCL8, IL-15, e regolano la produzione di altre citochine in modo autocrino e paracrino. Le cellule endoteliali agiscono sulla proliferazione delle cellule emopoietiche attraverso la produzione del fattore delle cellule staminali, IL-3, GM-CSF, G-CSF e M-CSF (Tedgui A, Mallat Z. 2006). In situazioni di iperlipidemia i macrofagi producono TNF- α , IL-1, IL-6, IL-12, IL-15 e IL-18 ma anche citochine antiinfiammatorie come IL-10 e il TGF- β . Le cellule staminali proaterogene generano IL-6 e INF- γ , che risulta fondamentale nell'accelerare lo sviluppo dell'aterosclerosi indotta dalle cellule staminali. Le citochine possono agire sulla permeabilità endoteliale, sull'espressione delle molecole di adesione, sui recettori scavenger, sul metabolismo lipidico, e sui processi di proliferazione e migrazione delle cellule muscolari lisce e delle cellule endoteliali.

TNF- α

Diversi studi sono stati condotti per chiarire il ruolo del TNF- α nell'aterogenesi,. La mancanza del gene per il TNF- α , in topi prone a sviluppare l'aterosclerosi ha mostrato una riduzione della placca aterosclerotica con la simultanea riduzione dell'espressione di VCAM-1, ICAM-1 e IL2 (Ohta H. et al., 2005). Diversamente topi mancanti del recettore del TNF- α sviluppano lesioni più estese rispetto ai controlli (Schreyer SA. et al., 1996). Recentemente studi con topi mutati hanno maggiormente chiarito il ruolo nell'iperlipidemia del TNF- α , sia di trans membrana, sia nella sua forma solubile. Inoltre il TNF- α influisce sullo sviluppo della placca nello stadio di stria lipidica (Canault M. et al., 2008).

IL-1

La stimolazione con IL-2 promuove l'adesione e la transmigrazione dei leucociti alle cellule endoteliali ed agisce stimolando in modo autocrino e paracrino altre citochine (Tedgui A Mallat Z., 2006). Diversi studi inoltre confermano il coinvolgimento dell'IL-1 nell'aterosclerosi (Tedgui A, Mallat Z. , 2006).

IL-2

Impiegando anticorpi contro l'IL-2 diversi studi in topi *ApoE*^{-/-} , hanno mostrato che l'IL-2 agisce come citochina proinfiammatoria e proaterogena (Upadhyay S. et al., 2004). In ogni caso sono in corso studi volti a valutare il ruolo dell'IL-2 nel metabolismo lipidico.

IL-6

L'IL-6 è una delle più importanti citochine pro-infiammatorie, rappresenta un interessante target per una molteplicità di patologie. e il suo coinvolgimento nel processo aterogeno è stato ampiamente studiato.

Come descritto in precedenza, l'IL-6 è sia generata a livello locale dalle cellule della lesione aterosclerotica, sia rilasciata nella circolazione sanguinea; per esempio nel tessuto adiposo, dove è in grado di esercitare numerosi effetti negativi che aumentano l'aterogenesi (Recinos A. et al., 2007).

L'IL-6 promuove la disfunzione endoteliale, la proliferazione e la migrazione delle cellule muscolari, nonché il reclutamento e l'attivazione di cellule infiammatorie, perpetuando così l'infiammazione vascolare. Inoltre, è stato in precedenza dimostrato che IL-6 incide a livello locale sull'espressione dei recettori scavenger SR-A e CD36, coinvolti nell'uptake delle LDL modificate, favorendo alla formazione dei macrofagi foam cells, un segno distintivo dello stadio iniziale e avanzato nella formazione delle lesioni aterosclerotiche (Wassmann et al., 2004; N et al., 2006; Grote K, et al., 2006).

Molti studi *in vitro* ed *in vivo* indicano chiaramente un ruolo proaterogeno dell' IL-6, la mancanza del segnale mediato dall'IL-6 infatti, sembra ridurre lo sviluppo di aterosclerosi mentre la sua over espressione sembra promuoverla. Nonostante ciò, altri risultati sperimentali sulla funzione dell'IL-6 nell'aterosclerosi rimangono ancora piuttosto controversi (Libby P. et al., 2002).

IL-12

L'IL-12 è la citochina per eccellenza prodotta dai linfociti Th1, ma anche dai macrofagi della placca, dove stimola la proliferazione e il differenziamento delle cellule T e delle cellule NK. L'IL-12 è stata identificata nell'aorta dei topi Apoe^{-/-}, e la somministrazione di IL-12 nello stesso modello di aterosclerosi, aumenta l'estensione della placca aterosclerotica (Lee TS, 1999). Alcuni studi invece supportano l'ipotesi che l'IL-12 abbia attività pro-aterogena e pro-nfiammatoria (Lee TS, 1999; Zhang X, 2006).

IL-18

L'IL-18 e l'IL-12 sono coinvolte nella generazione delle cellule effettrici Th1. Inaspettatamente la somministrazione di anticorpi IL-18 accelera lo sviluppo dell'aterosclerosi nei topi Apoe^{-/-}, ma l'over-espressione della proteina di legame dell'IL-18 invece riduce l'effetto antiinfiammatorio dell'IL-18, stabilizzando la placca (Tedgui A., 2006). La simultanea delezione del gene dell'IL-18 e dell'apoproteina E determina una riduzione dell'espressione dell'IFN- γ , un minor sviluppo della lesione ed un incremento dei livelli plasmatici di colesterolo e trigliceridi, di rispetto i topo controllo (Elhage R et al., 2003).

IFN- γ

La progressione accelerata dell'aterosclerosi in seguito a somministrazione di IFN- γ , così come la riduzione dello sviluppo della placca in assenza del recettore per l'IFN- γ , osservata in modelli animali aterosclerotici (topi ApoE^{-/-}), suggeriscono un ruolo pro-aterogeno di questa citochina (Gupta S. et al., 1997). L'IFN- γ , non è coinvolto solo negli stadi precoci dell'aterosclerosi ma anche in quelli più avanzati; una riduzione delle dimensioni della placca avanzata, così come la sua stabilità sono infatti ridotte in seguito all'inibizione dell'IFN- γ (Koga M. et al., 2007).

Ruolo dell'endotelio nell'aterosclerosi

L'endotelio vasale non è soltanto un insieme di cellule che fungono da barriera tra il sangue e i tessuti circostanti, ma rappresenta un vero e proprio organo con la funzione di modulare il tono vasale e l'entità del flusso ematico in risposta a stimoli umorali, nervosi e meccanici. In condizioni fisiologiche l'endotelio svolge un ruolo attivo nell'interscambio cellulare, essendo capace di adattarsi funzionalmente e strutturalmente alle variazioni del microambiente (Verma S, et al., 1995).

L'endotelio contribuisce inoltre alla mitogenesi, all'angiogenesi, alla permeabilità vasale, al bilancio della fluidità ematica, alla regolazione dell'infiammazione e dell'attivazione piastrinica. Sostanze vasodilatanti prodotte dall'endotelio, che contribuiscono alla sua funzione omeostatica, sono il monossido di azoto (NO), la prostaciclina (PGL₂), alcuni fattori iperpolarizzanti endoteliali, il peptide natriuretico tipo C. I vasocostrittori endoteliali comprendono l'endotelina-1 (ET-1), l'angiotensina II (AngII), il trombossano A2 e le specie reattive dell'ossigeno (ROS) (Schiffrin EL., 2001; Furchgott RF, Zawadzki JV. 1980; Holmes DR jr, Lerman A., 2000).

La disfunzione endoteliale è stata descritta per la prima volta nell'uomo nel 1990 a livello dell'arteria brachiale di soggetti ipertesi (Panza JA, 1990) ed è stata in seguito associata al diabete di tipo 1 (Park JB et al., 2001) e 2 (Rizzoni D. et al., 2002; Endermann D. et al. 2004), alla presenza di malattia coronarica (Monnink SH et al., 2002) ed allo scompenso cardiaco (Landmesser U. et al., 2002).

Il bilancio tra, i fattori che promuovono la vasodilatazione o la vasocostrizione, le componenti pro trombotiche e antitrombotiche, e la fibrinolisi, mantiene l'omeostasi vascolare. La disfunzione endoteliale, che interrompe l'omeostasi vascolare è causata da eventi come l'impatto dei classici fattori di rischio vascolare, le alterazioni genetiche, l'elevata concentrazione di omocisteina, l'infezione da parte di microorganismi (esempio

herpes virus o *Chlamydia pneumoniae*), così come lo sbilancio tra l'entità del danno endoteliale e la capacità di riparo. Quando la disfunzione endoteliale diventa evidente, è presente vasocostrizione, incremento dell'adesione dei leucociti, l'up-regolazione delle molecole di adesione, l'incremento della secrezione di chemochine e della permeabilità cellulare, l'incremento dell'ossidazione delle LDL, produzione di citochine, attivazione piastrinica mitogenesi, trombosi, alterata coagulazione, infiammazione vascolare, proliferazione e migrazione delle cellule muscolari lisce, e aterosclerosi (Park JB et al., 2001).

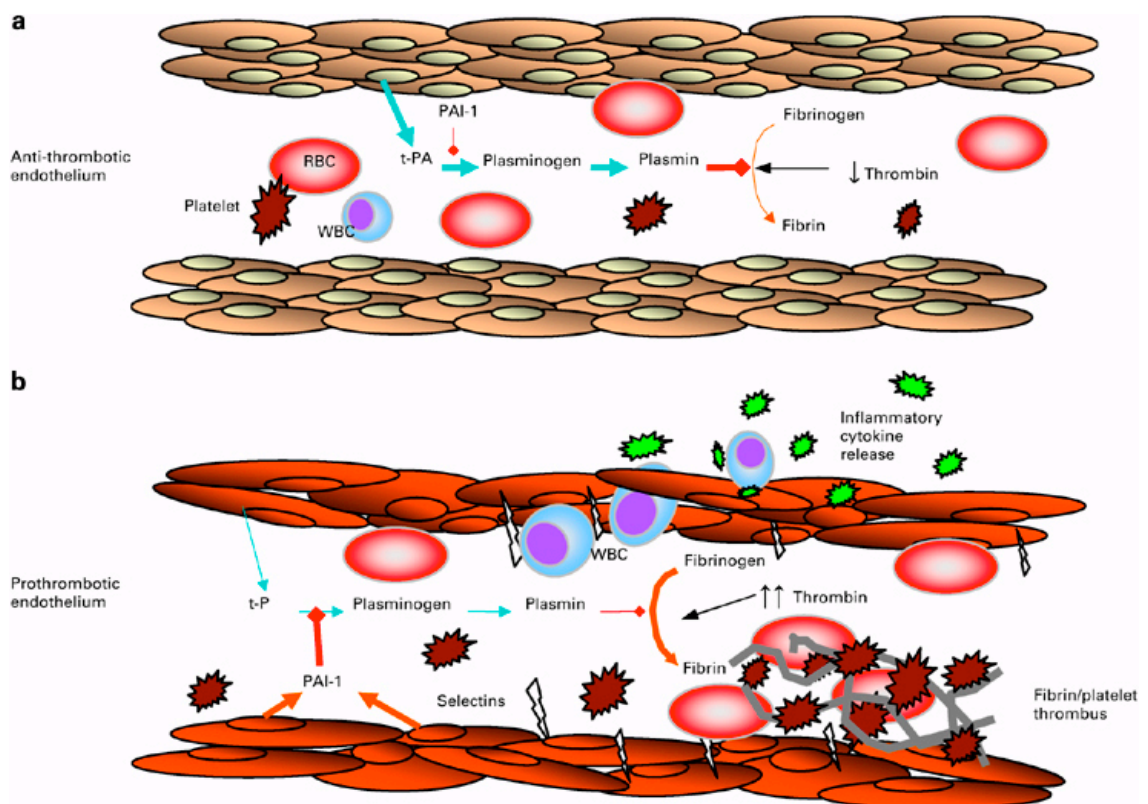


Figura 5 L'endotelio anti-trombotico e pro-trombotico

In accordo con l'attuale teoria dell'aterosclerosi, l'esposizione dell'endotelio ai fattori di rischio porta alla disfunzione endoteliale con riduzione della biodisponibilità di NO, incremento dell'eccesso ossidativo, ed espressione di molecole di adesione (figura 5). Questo è seguito dall'ispessimento dell'intima, chiara manifestazione di aterosclerosi, sviluppo di stenosi ed infine rottura della placca che termina in trombosi endovascolare. Recenti studi sostengono l'ipotesi che il danno endoteliale contribuisce non solo all'inizio dell'aterosclerosi, ma sia un elemento integrale delle patologie aterosclerotiche vascolari, e che la sua presenza rappresenti un fattore di rischio per lo sviluppo degli eventi clinici (Yeboah J. et al., 2007 Verma S. et al., 2003; Blanco M. et al., 2005).

La patofisiologia della disfunzione endoteliale rappresenta un fenomeno complesso ed articolato, che comprende diversi meccanismi. Vasocostrizione, aggregazione piastrinica, adesione leucocitaria e proliferazione delle cellule muscolari lisce caratterizzano la disfunzione endoteliale; è stata inoltre correlata ad una ridotta biodisponibilità di NO, ad un eccesso ossidativo e ad un'aumentata azione di ET-1 (Anderson TJ, 2007).

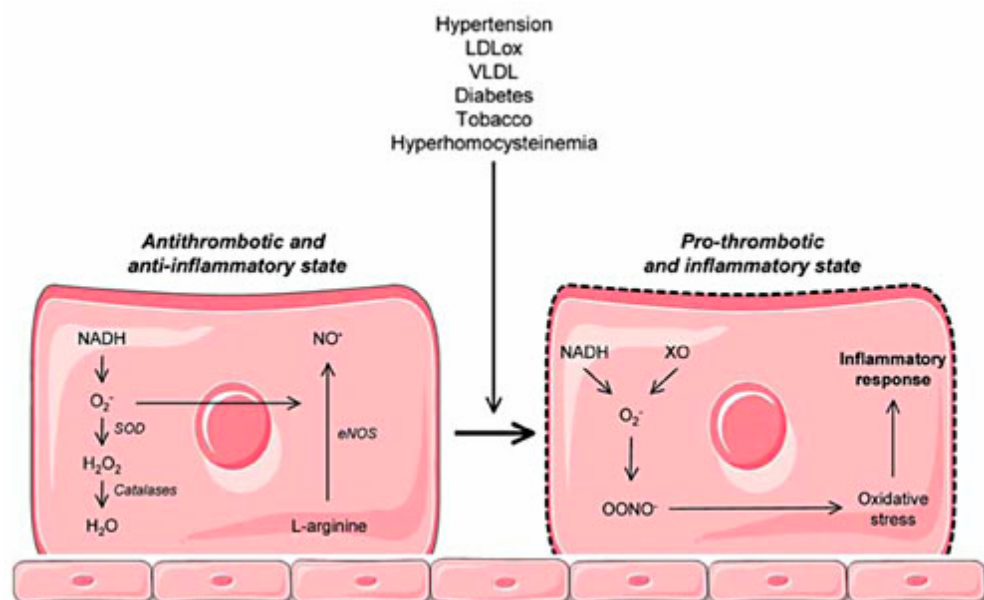


Figura 6 L'esposizione ai fattori vascolari promuove la disfunzione endoteliale

MONOSSIDO DI AZOTO (NO)

L'NO è una delle sostanze più importanti prodotte dall'endotelio, è un potente vasodilatatore, inibisce la crescita cellulare e l'infiammazione, ha effetti antiaggreganti sulle piastrine, per cui risulta la molecola chiave della normale funzione endoteliale. Inoltre nei leucociti media l'espressione delle molecole di adesione (VCAM-1) e di chemochine. Una ridotta disponibilità di NO è stata descritta in presenza di disfunzione endoteliale ed è stata associata ad una ridotta attività dell'isoforma endoteliale della NO-sintetasi (eNOS), enzima in grado di ottenere NO a partire dall'L-arginina, per ossidazione del suo nitro gruppo terminale guanidinico. La eNOS, è Ca^{2+} -dipendente, in condizioni basali produce ridotte quantità di NO, ma è in grado di incrementarne la sintesi in pochi secondi, in risposta ad agonisti recettoriali o allo shear stress di parete; quest'ultimo attiva rapidamente i canali ionici del potassio calcio-dipendenti, presenti sulla superficie endoteliale, sensibili alla forza tangenziale del flusso ematico sulla parete vasale (Sprague AH., 2009).

L'isoforma inducibile della NO-sintetasi (iNOS), produce elevate quantità di NO senza richiedere livelli elevati di Ca^{2+} intracellulare. In generale le citochine inducono l'espressione della iNOS, che a sua volta induce le cellule endoteliali a produrre NO (Vila E et al., 2005). Per esempio il $\text{TNF-}\alpha$ in combinazione con $\text{IFN-}\gamma$, prodotto dalle cellule Th1 attivate, è un potente stimolo per la produzione di NO da parte delle cellule endoteliali (Kofler S. et al., 2005).

Una ridotta disponibilità di NO sembra promuovere un fenotipo endoteliale pro infiammatorio e pro trombotico. Diversi studi hanno mostrato che la biodisponibilità di NO è associata alla salute cardiovascolare. E' stato infatti suggerito, che differenze nella biodisponibilità di NO possano permettere di discriminare soggetti con una buona salute vascolare, quindi meno esposti ad eventi cardiovascolari, da quelli con una salute vascolare compromessa (Allen JD. Et al., 2006). Nonostante ciò la generazione di NO ha un ruolo

importante nell'ictus ischemico acuto, e l'incremento della concentrazione dei metaboliti di NO è associato ad un aumento del danno al cervello e al precoce deterioramento neurologico (Castillo J. et al., 2000).

L'ECESSO OSSIDATIVO

Un ruolo preminente nella disfunzione endoteliale va assegnato all'inattivazione dell' NO da parte dei radicali liberi dell'ossigeno. Le specie reattive dell'ossigeno reagiscono con l'NO producendo perossinitriti, molecole cito-ossidanti, che tramite la nitrificazione alterano la funzione delle proteine cellulari; i perossinitriti sono anche coinvolti nell'ossidazione delle LDL, che aumentano così il loro effetto pro-aterogeno e riducono a loro volta la biodisponibilità di NO inibendone la via biosintetica tramite una alterazione della conformazione dei recettori G-dipendenti, con conseguente mancata attivazione della eNOS, oppure inattivando direttamente lo NO per un eccesso di anione superossido (Griendling KK, et al., 2003).

In modelli animali di ipertensione, un eccesso ossidativo caratterizzato da produzione di elevate quantità di radicali liberi sotto forma di anione superossido, perossido di idrogeno e radicale ossidrilico, è associato a disfunzione endoteliale, come dimostrato da un miglioramento della vasodilatazione endotelio-dipendente dopo l'uso di antiossidanti (Chen X et al., 2001) .

L'eccesso ossidativo si associa inoltre ad aumento dei processi infiammatori e della formazione di trombi e la sua entità correla con il grado di riduzione della vasodilatazione endotelio-dipendente e con lo sviluppo di eventi cardiovascolari (Heitzer T et al., 2001).

Sulla base di queste premesse, l'interesse dei ricercatori si è focalizzato, negli ultimi anni, sulla possibilità di intervenire farmacologicamente sulla disfunzione endoteliale implicata nell'ipercolesterolemia e nelle altre situazioni di rischio cardiovascolare, nel tentativo di prevenire le lesioni d'organo ad esse correlate. Il problema dell'uso dei farmaci in grado di

modulare la funzione endoteliale è spesso complicato dagli effetti contemporanei che alcuni di essi esercitano su altri parametri clinici (ipertensione, ipercolesterolemia). Molte ricerche sugli effetti dei farmaci sono state finora condotte sperimentalmente e attendono conferme significative anche nella patologia umana.

ENDOTELINA-1

L'endotelina-1 (ET-1) è la più potente sostanza vasocostrittrice di produzione endoteliale ed agisce su recettori specifici denominati ETA ed ETB. I recettori ETA sono presenti solo sulle cellule muscolari lisce e causano vasocostrizione e crescita cellulare, mentre i recettori ETB sono presenti sia sulle cellule muscolari lisce, dove inducono vasocostrizione, che sull'endotelio, dove determinano dilatazione stimolando la produzione di NO, che agisce da feed-back negativo inibendo l'ulteriore produzione di ET-1. In caso di ridotta biodisponibilità di NO questo meccanismo di feedback negativo è compromesso e di conseguenza è incrementato l'effetto vasocostrittore di ET-1 (Haynes WG, et al. 1998). L'ET-1 è inoltre in grado di attivare l'azione vascolare di altri peptidi vasoattivi come l'angiotensina II, la norepinefrina e la serotonina. L'ET-1 partecipa attivamente all'attivazione dei leucociti e delle piastrine. Nonostante elevati livelli di ET-1 siano presenti in pazienti con aterosclerosi, ipertensione, insufficienza cardiaca, diabete e disfunzione renale, la misurazione dei livelli di ET-1 non si è rivelata clinicamente utile (Roquer J. et al., 2009).

Valutazione della funzione endoteliale

Il parametro tradizionalmente usato per misurare il grado di funzione dell'endotelio è la capacità di vasodilatazione endotelio-dipendente, indotta da agonisti (acetilcolina, bradichinina o lo shear stress sulla parete vasale durante flusso iperemico) che stimolano la produzione endoteliale di sostanze vasodilatatrici. I primi studi eseguiti a livello del circolo coronarico hanno utilizzato l'infusione di acetilcolina durante coronarografia. La modificazione del diametro vascolare durante infusione intracoronarica di acetilcolina, misurata con angiografia quantitativa, è stata utilizzata come indice di produzione locale di NO. È stato dimostrato che l'acetilcolina induce una vasodilatazione nelle arterie coronariche epicardiche normali, mentre è possibile osservare una vaso-costrizione paradossa nelle arterie con disfunzione endoteliale (Verma S, et al., 2003).

Oggi è possibile utilizzare, sempre durante studio coronarografico, sostanze vasodilatatrici quali la papaverina che permettono di misurare la dilatazione coronarica dovuta allo shear stress indotto dal farmaco.

È, inoltre, possibile quantificare l'entità della risposta ai mediatori sin qui esposti, oltre che con l'angiografia quantitativa, anche mediante tecniche più sensibili quali l'ultrasonografia ed il doppler intracoronarico.

L'impiego di queste tecniche, sebbene valido in quanto utilizza agonisti endoteliali selettivi e modulabili, presenta tuttavia limitazioni dovute all'invasività della tecnica; la loro applicazione è ristretta ai pazienti che hanno una indicazione clinica alla esecuzione di una coronarografia e pertanto sono state sviluppate metodiche per valutare la vasodilatazione endotelio-dipendente in altri distretti vascolari ed in modo meno invasivo.

La pletismografia venosa viene utilizzata per valutare le variazioni di flusso a livello dell'avambraccio in risposta all'infusione diretta – mediante Incannulazione dell'arteria brachiale – di sostanze vasodilatatrici ad azione endotelio-dipendente, quali l'acetilcolina, la sostanza P o la bradichinina.

Per la valutazione della funzione endoteliale è stata recentemente standardizzata mediante linee guida una tecnica non-invasiva nota con il nome di flow-mediated dilation (FMD = dilatazione mediata dal flusso iperemico); tale metodica sfrutta l'aumento della forza tangenziale sulla parete vascolare in corso di iperemia (shear stress), che determina rilascio endoteliale di NO e conseguente vasodilatazione (Corretti MC, 2002). La tecnica prevede la visualizzazione dell'arteria brachiale in un tratto rettilineo del vaso circa 2 cm al di sopra della piega del gomito mediante ultrasonografia, con una sonda vascolare di 7,5 MHz; la misura del diametro vasale viene eseguita in condizioni di base e dopo un minuto di flusso iperemico, al picco della vasodilatazione mediata dallo shear stress. L'iperemia viene indotta tramite occlusione meccanica dell'arteria brachiale mediante gonfiaggio di un manometro a pressioni maggiori di quelle arteriose sistemiche e successivo rilascio, dopo cinque minuti di collasso del vaso. L'esame viene svolto in regime ambulatoriale, con controllo della temperatura ambientale e dello stress emotivo del paziente. Vengono sospesi per almeno 48 ore prima del test tutti i farmaci vasoattivi, l'assunzione di caffeina ed il fumo di sigaretta, che possono inficiare la risposta del vaso allo stimolo. I maggiori vantaggi di questa tecnica consistono nella non invasività, nella facile riproducibilità e ripetibilità del test, nel basso costo e nel minor rischio rispetto ad uno studio angiografico invasivo.

È stata dimostrata una buona correlazione tra la funzione endoteliale studiata a livello periferico con la FMD e quella misurata invasivamente a livello coronarico durante coronarografia (Anderson TJ, et al., 1995); ciò ha permesso l'applicazione estensiva dello studio della funzione endoteliale mediante FMD in pazienti affetti da aterosclerosi coronarica o con fattori di rischio cardiovascolare. Poiché la presenza di disfunzione endoteliale correla con lo stato infiammatorio delle pareti arteriose, sono marker di disfunzione endoteliale anche le forme solubili di mediatori dell'infiammazione, quali ICAM-1, VCAM-1 ed E-selectin, che possono essere dosate a livello plasmatico.

Trattamento della disfunzione endoteliale

La disfunzione endoteliale è associata a varie patologie cardiovascolari e rappresenta uno dei principali meccanismi attraverso cui i fattori di rischio cardiovascolare predispongono allo sviluppo di aterosclerosi, di instabilità di placca e di trombosi, e quindi, all'incidenza di eventi clinici futuri. Essendo una patologia di tipo funzionale, la disfunzione endoteliale è per lo più un processo reversibile e il trattamento delle condizioni predisponenti può almeno in parte ripristinare un endotelio integro e funzionante (Widlansky ME et al., 2003; Behrendt D, et al., 2002).

Lo stress ossidativo è considerato uno dei meccanismi patogenetici fondamentali della disfunzione endoteliale e dell'aterosclerosi; esiste, per questo motivo, una crescente attenzione sugli effetti di terapie antiossidanti sulla funzione dell'endotelio. Le terapie con sostanze antiossidanti sono a base di farmaci che agiscono sugli ossidanti lipidici circolanti (per esempio statine e Probucolo) o di farmaci che agiscono direttamente sugli anioni superossido (vitamina C). La somministrazione per via intra-arteriosa di vitamina C in pazienti con fattori di rischio cardiovascolare è stata associata ad una normalizzazione della FMD locale, ma tali effetti sono stati ottenuti con dosi molto elevate di farmaco, difficilmente raggiungibili per via sistemica. Negli studi eseguiti con somministrazione sistemica di vitamina C alle dosi di 2 g/die, la FMD a livello dell'arteria omerale è migliorata nei pazienti con malattia coronarica, ma non in quelli affetti da ipertensione arteriosa; con risultati, quindi, difficilmente interpretabili (Wilkinson IB. Et al., 1999). Gli studi che hanno usato combinazioni di antiossidanti, quali vitamina C, vitamina B e beta-carotene, hanno dato esiti discordanti e recentemente anche l'acido acetilsalicilico è stato proposto come agente antiossidante, potenzialmente utile per ridurre la disfunzione endoteliale. Un recente studio ha infine mostrato, che la concomitante somministrazione di vitamina C e vitamina E migliora la funzione endoteliale nei pazienti ipertesi (Plantinga Y. et al., 2007). La riduzione delle fonti di stress ossidativo, più che le sole terapie con sostanze antiossidanti,

probabilmente potrà dare dei risultati applicabili alla popolazione generale. Anche l'iperomocisteinemia è stata associata ad uno stato di disfunzione endoteliale, che può migliorare con la somministrazione di acido folico. Nell'ipertensione arteriosa, la semplice riduzione dei valori tensivi non è sufficiente ad indurre una involuzione del processo di disfunzione endoteliale; tuttavia farmaci anti-ipertensivi, quali gli ACE-inibitori ed i sartani, hanno mostrato un effetto benefico su tale reintegro. I meccanismi attraverso i quali il blocco del sistema renina-angiotensina riduce il grado di disfunzione endoteliale sono probabilmente legati alla riduzione dello stress ossidativo e dell'infiammazione. Gli ACE-inibitori aumentano le concentrazioni plasmatiche di bradichinina, un vasodilatatore endotelio-dipendente e migliorano la funzione endoteliale anche attraverso la riduzione di Ang II, una molecola che incrementa l'attività della NADPH ossidasi, con conseguente aumentata produzione di specie reattive dell'ossigeno ed inattivazione di NO. Le evidenze sperimentali dimostrano inoltre una stretta associazione tra profilo lipidico e disfunzione endoteliale, per cui una riduzione dei lipidi corporei è in grado di per sé di migliorare la funzione dell'endotelio (Wassmann S. et al., 2002).

I PARTE

I Calcioantagonisti

Quella dei calcioantagonisti (CA) è una famiglia di farmaci relativamente giovane, dal momento che la sintesi del verapamil risale agli anni '60. Originariamente designati come selettivi vasodilatatori coronarici, essi divennero, tra gli ultimi anni '80 e i primi anni '90, i farmaci antipertensivi più venduti nel mondo (pur non essendo stati testati per questa indicazione in nessun trial randomizzato controllato) e, ancora oggi, sono tra i farmaci più prescritti per il controllo dell'ipertensione. Chimicamente si distinguono in due categorie, le diidropiridine (nicardipina, nifedipina, lacidipina, isradipina, nitrendipina, ecc.) e le non-diidropiridine (cui appartengono le fenilalchilamine: verapamil, e le benzotiazepine: diltiazem). Differentemente, le diidropiridine possono essere classificate in composti di I generazione (nicardipina, nifedipina, lacidipina, isradipina, verapamil, diltiazem), di II generazione (nitrendipina, nisoldipina, nimodipina, isradipina, nicardipina, nilvadipina) e di III generazione (amlodipina a lunga emivita plasmatica, lercanidipina, lacidipina, manidipina e barnidipina a lunga emivita recettoriale). Il meccanismo d'azione dei CA è quello di inibire l'ingresso del Ca^{2+} nel citosol, bloccando il flusso transmembrana dello ione attraverso i canali VOC (voltage operated channels) principalmente di tipo L, che costituiscono solo una delle vie di ingresso del calcio nel citosol. Le non-diidropiridine a differenza delle diidropiridiniche mostrano maggiori effetti ionotropi a causa di una minore selettività vascolare. Lercanidipina, lacidipina, manidipina e barnidipina sono composti a lunga emivita recettoriale, cioè sono composti caratterizzati dalla capacità di abbandonare rapidamente il flusso ematico, portandosi all'interno del tessuto vascolare (nello spessore della parete del vaso), dal quale sono rilasciati progressivamente per interagire con i canali del calcio. Questa caratteristica dona a queste molecole la capacità di prolungare la loro azione antipertensiva e vasculoprotettiva, anche dopo il decadimento del $T_{1/2}$ plasmatico, riducendo il rischio di eventi avversi (la cui comparsa in genere è correlata all'interazione diretta concentrazione plasmatica/concentrazione sul recettore tissutale) (Verza M, A et al.,

2007).

Recenti dati provenienti da studi randomizzati hanno mostrato una riduzione della mortalità e della morbilità cardiovascolare in pazienti ipertesi trattati con i calcioantagonisti (Hansson L., 1998; Hansson L. et al., 1998; Brown MJ et al., 2000; Dahlof B et al., 2005; Hansson L et al., 1999; Hansson L et al. 2000; Julius S et al., 2004). In particolare si è osservato un miglioramento cardiovascolare comparabile a quello osservato con altre classi di farmaci, b-bloccati o diuretici, e un potenziale aumento di termini di prevenzione di ictus (Staessen JA. et al., 2001). A tale proposito dati provenienti da una meta analisi mostrano che i nuovi farmaci antiipertensivi compresi i calcioantagonisti, hanno un effetto positivo nello spessore dell'intima carotidea (IMT), rispetto ai diuretici e ai beta-bloccati (Wang JG. Et al., 2006).

Nel 2000, sono stati pubblicati i risultati di un altro trial, lo studio PREVENT (amlodipina vs placebo) (Pitt B. et al., 2000), condotto per valutare l'effetto dell'amlodipina sulle placche aterosclerotiche e sul rischio di eventi coronarici acuti. Lo studio è stato condotto per un periodo di osservazione di 3 anni, su uomini e donne con età compresa tra 30 e 80 anni, ipertesi, con e senza fattori di rischio aggiuntivi per cardiopatia ischemica (CAD) ed eventi cardiovascolari; tutti i partecipanti allo studio erano affetti da patologie alle coronarie angiograficamente dimostrate. I pazienti sono stati suddivisi in 2 gruppi: i CA-trattati e i placebo-trattati (che ricevevano comunque nitrati, beta-bloccanti e statine). Il risultato di tale studio è che l'amlodipina rispetto al placebo non impedisce l'insorgere dell'aterosclerosi, ma ne rallenta la progressione (riducendo il calcio nelle CML della placca) e riduce gli episodi di insufficienza cardiaca (HF) e di angina instabile; inoltre, insieme ai beta-bloccanti, alle statine e ai nitrati, riduce la necessità di angioplastiche e di bypass aorta-coronarici nei soggetti con fattori di rischio multipli per aterosclerosi, o con pregressa patologia coronarica (CHD).

Lo studio ELSA (Zanchetti A. et al. 2002), (studio europeo degli effetti della lacidipina sull'aterosclerosi vs etanolo), condotto per 4 anni in pazienti tra i 45 e i 75 anni, ha

dimostrato che la lacidipina è in grado di esercitare una protezione vascolare maggiore, rispetto ai beta-bloccanti, con una minore progressione dell'ispessimento intimale medio della carotide comune distale e della biforcazione carotidea, nel gruppo dei CA-trattati; questo nonostante una riduzione pressoria sovrapponibile nei due gruppi di trattamento. Nel 2004, infine, sono giunti i risultati dello studio VALUE (valsartan vs amlodipina) (Weber MA et al., 2002; Stults B et al., 2006), condotto per 6 anni, su pazienti anziani ipertesi con fattori di rischio multipli per patologie alle arterie coronarie (CAD) ed eventi cardiovascolari (CV), nel quale appare evidente che: in pazienti ipertesi ad alto rischio cardiovascolare l'amlodipina riduce la PAS più rapidamente (considerando l'inizio del trattamento) e più intensamente del valsartan con, dopo più di sei mesi di trattamento, una riduzione di eventi CV acuti (stroke, decessi per CAD, ecc.) sovrapponibile nei due gruppi.

I Calcioantagonisti nel trattamento della disfunzione endoteliale

Nelle cellule endoteliali non sono presenti recettori specifici del calcio di tipo L ed è noto che il calcio rappresenta un cofattore per l'NO-sintetasi, necessario per la sua attivazione (Palmer RMJ et al., 1997; Moncada S et al., 1991). Tuttavia, è stato osservato che il blocco dei canali del calcio riduce la pressione arteriosa e migliora la disfunzione endoteliale nelle arterie perfuse, dei ratti spontaneamente ipertesi (Dohi Y et al., 1994). Inoltre il trattamento con un calcioantagonista diidropiridinico ha determinato un miglioramento del rilassamento arterioso endotelio-mediato anche nei conigli ipercolesterolemici (Habib JB et al., 1986). Il meccanismo di tali azioni non è stato completamente chiarito. Infatti, è stato recentemente dimostrato, che la nifedipina e il diltiazem non stimolano il rilascio di NO dai microvasi coronarici isolati di cani normali, mentre l'amlodipina si è dimostrata efficace. Si tratta presumibilmente di un meccanismo chinina-dipendente ma non è escluso che alcuni calcioantagonisti facilitino gli effetti di fattori rilassanti endoteliali o contrastino l'azione

vasocostrittrice dell'endotelina-1 (ET-1). Alcuni studi su pazienti ipertesi hanno dimostrato che la nifedipina non migliorerebbe neppure in acuto (Pitt B et al. 2000) il rilassamento vascolare endotelio-dipendente, mentre altri avrebbero dimostrato un effetto favorevole nei pazienti con ipercolesterolemia familiare. L'isradipina, al contrario, ha determinato sia a medio che a lungo termine, un miglioramento della vasodilatazione endotelio-dipendente in pazienti ipertesi mai trattati. Si è ipotizzato che ciò sia dovuto a un aumento della produzione endoteliale di NO, attraverso un meccanismo calcio-dipendente (Perticone F et al., 1999). È tuttavia presumibile che i calcioantagonisti possiedano anche una capacità antiossidante, che potrebbe contrastare l'eccesso di anioni superossido, in grado di inattivare l'NO ed ossidare le LDL. Non si può neppure escludere che i calcioantagonisti ostacolino l'azione dell'ET-1. Infatti, il blocco dei canali del calcio, contrariamente ai nitrati e al fattore rilassante endoteliale, ha determinato nell'uomo una regressione della vasocostrizione indotta dall'ET-1 (Li JS et al., 1997). Infine nelle situazioni di cronica deprivazione di NO come l'ipertensione sia il calcioantagonista verapamil che l'ACE-inibitore trandolapril sembrano potenziare meccanismi vasodilatatori endoteliali indipendenti dall'NO che di norma non hanno un ruolo nel mantenere il tono vascolare. Nonostante queste osservazioni, sono necessarie ricerche per confermare l'effetto sulla funzione endoteliale anche nell'uomo.

Da studi effettuati con Nifedipina e Lercanidipina emerge che i calcio-antagonisti possono avere degli effetti positivi sulla struttura e sulla funzione endoteliale, indipendentemente dal loro effetto sulla pressione arteriosa. Lo spessore medio intinale è il target primario valutato nello studio MIDAS (the Multicenter Isradipine Diuretic Atherosclerosis Study) (Borhani NO et al., 1996) nello studio VHAS (the Verapamil Hypertension and Atherosclerosis Study), (Zanchetti A et al. 1998), e nello INSIGHT (Simon A et al., 2001). Nel MIDAS si è osservata la tendenza ad un minor spessore intinale in seguito a 3 anni di trattamento con il calcio antagonista rispetto che al trattamento con il diuretico. Lo stesso

orientamento si è osservato nello studio VHAS in cui 337 pazienti hanno ricevuto 240 mg di verapamil o 25 mg clortalidone al giorno per 4 anni. La maggior regressione della lesione carotidea osservata con il Verapamil è associata a una minor incidenza di eventi cardiovascolari.

Nello studio INSIGHT (nifedipina long-acting vs co-amidazolide), che è stato condotto su pazienti con età compresa tra 55 e 80 anni, con PA>150/95 o PAS >160 mmHg e fattori di rischio addizionali per CV (durata del follow-up 2 anni circa). Si è osservato che la nifedipina è efficace quanto il diuretico, nel ridurre la PA e l'incidenza delle complicanze cardio cerebrovascolari, mentre la valutazione con ecocolor-Doppler di placche carotidee (già presenti al momento dell'inizio dello studio) mostra che la nifedipina è in grado di evitare l'ulteriore ispessimento della placca (non così i diuretici), verosimilmente per la capacità di inibire l'ingresso di calcio nelle CML della media (e dunque la loro attivazione e migrazione) e per la più marcata riduzione della PAS (Simon A et al., 2001).

Questi risultati suggeriscono che l'effetto antiaterosclerotico dei calcio antagonisti nei pazienti con ipertensione potrebbe essere indipendente dalla riduzione della pressione sanguinea (Wang JG et al., 2002); ciò è in accordo sia con gli studi *in vitro* che con studi clinici farmacologici (De Siati L. et al., 2005).

La Manidipina

La Manidipina è un calcioantagonista diidropiridinico di terza generazione legata ad effetti metabolici con potenziale interesse clinico. Tra 16 farmaci ipertensivi analizzati in una meta analisi, che ha coinvolto 10818 pazienti, partecipati a 80 studi randomizzati, la Manidipina ha determinato una maggiore riduzione della pressione diastolica (13 mmHg) (Baguet JP et al., 2007). Questo farmaco calcio antagonista ha mostrato inoltre effetti pleiotropici indipendenti dall'azione sulla pressione. Infatti, la terapia con Manidipina, diversamente che con altri composti diidropiridinici, è associata a un marcato incremento dell'insulina sensibilità, e un aumento dei livelli plasmatici di adiponectina (Francisco M-MJ, 2005). Quest'ultima appartiene alle "adipochine", molecole espresse dal tessuto adiposo correlate ad infiammazione cronica, e che può avere un ruolo importante nello sviluppo dell'insulina resistenza (Antuna-Puente B. et al., 2008). Da studi preliminari in vitro, emerge che questo effetto, non osservato con altri calcio antagonisti diidropiridinici quali, benidipina, efonidipina, amlodipina, e lercanispina, sembra essere associato all'attivazione dei recettori nucleari PPAR- γ , maggiormente espressi negli adipociti (Nakami T., 2006). Infine la Manidipina ha ridotto, *in vitro*, la produzione dell'anione superossido attraverso l'over-espressione della NADPH ossidasi in cellule endoteliali stimulate con angiotensina II (Toba H., 2006).

Scopo della Ricerca

Negli ultimi anni molti studi si sono focalizzati sul ruolo chiave del processo infiammatorio nella patogenesi dell'aterosclerosi. L'attivazione delle cellule endoteliali indotta dalle citochine o da altri mediatori dell'infiammazione è uno dei primi eventi nel processo aterosclerotico, che porta alla sintesi di molecole di adesione, di fattori chemiotattici e un incremento dell'interazione con i leucociti (Libby P., 1991, 2009). Inoltre, diversi studi mettono in luce come l'ossidazione delle lipoproteine a bassa densità (ox-LDL) abbiano un ruolo chiave nelle prime fasi dell'aterosclerosi, ed è dimostrato che le LDL ossidate sono in grado di incrementare l'espressione di alcune molecole di adesione nelle cellule endoteliali isolate da cordone ombelicale umano (HUVEC). Le Ox-LDL vengono captate dai macrofagi ad una velocità maggiore rispetto alle LDL native, questo porta all'accumulo di colesterolo e alla formazione delle foams cells (Poston R. et al., 1992).

Anche l'interleuchina 6 (IL-6), secreta dalle cellule endoteliali, è presente nella placca aterosclerotica e promuove l'accumulo e la differenziazione dei monociti e i processi di aggregazione piastrinica. E' stato dimostrato che la somministrazione di IL-6 negli animali accelera lo sviluppo dell'aterosclerosi (Recinos A. et al., 2007). Inoltre tale citochina può reagire con le cellule endoteliali stesse amplificando e sostenendo ulteriormente la loro attivazione (Ronda N. et al., 2003). Come l'IL-6 un'altra citochina pro-infiammatoria, il Tumor necrosis factor alpha, TNF- α è secreto dai macrofagi attivati, incrementa l'attività pro-coagulante delle cellule endoteliali, induce l'espressione di VCAM-1, M-CSF e IL-6 in cellule vascolari, stimola la proliferazione delle cellule muscolari, amplificando quindi il processo pro-aterogeno.

I calcioantagonisti di terza generazione hanno mostrato in diversi modelli sperimentali e studi clinici avere effetti positivi sulla struttura e sulla funzione endoteliale, indipendentemente dal loro effetto sulla pressione sanguigna. Lo scopo di questo studio è stato quello di valutare a livello cellulare, l'attività antiinfiammatoria della Manidipina, calcio antagonista di terza generazione, nella modulazione del rilascio di IL-6 e IL-8 da

cellule endoteliali umane (HUVEC), in seguito a stimoli pro-infiammatori.

Materiali e Metodi

Caratteri generali

Tutte le operazioni riguardanti la manipolazione delle colture cellulari vengono effettuate in condizioni di sterilità, utilizzando una cappa a flusso laminare verticale.

La vetreria viene sterilizzata in stufa a secco (Air Concept, FIRLABO Lione) per 4 ore a 180°C, mentre i materiali plastici (puntali per pipettatrici automatiche, vials) in autoclave (Certoclav, Austria) per 20 minuti a 121°C ad 1 atmosfera.

Le cellule sono mantenute in incubatore (Napco, Chicago, Illinois) a 37°C con un tasso di umidità del 90-95% e di anidride carbonica del 5%.

L'osservazione morfologica delle cellule viene effettuata con un microscopio ad ottica invertita (Leica, Germania).

Isolamento e coltura delle cellule endoteliali umane isolate da cordone ombelicale (HUVEC)

Le cellule endoteliali umane isolate da cordone ombelicale (HUVEC), ancora oggi rappresentano per molti ricercatori di tutto il mondo un buon modello di studio del sistema vascolare. In realtà le proprietà delle HUVEC non rappresentano in modo completo, le attitudini metaboliche né le risposte fisio-patologiche o tossiche, di tutte le cellule endoteliali presenti nell'organismo. Nonostante ciò le HUVEC sono il tipo di cellula endoteliale facilmente disponibile e ottenibile in modo semplice in quantità esigue.

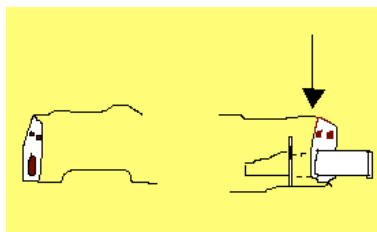
Reagenti:

- ◆ **medium base DMEM_{cpl}** (DMEM + 4mM Gln + 1%P/S) (DMEM, Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Lonza, Vervieres, Belgio) sono addizionati di Glutamina 4mM e Penicillina-Streptamicina 1% (Invitrogen, Carlsband, CA)
- ◆ **DMEM_{cpl} completato** con siero bovino fetale FCS al 20% (Lonza, Vervieres, Belgio)
- ◆ **Soluzione di Collagenasi** (Sigma-Aldrich), disciogliere la polvere di **Collagenasi** (Sigma-Aldrich) in PBS 1X, per avere una soluzione 1mg/ml, filtrare a 0,20µm, aliquotare e conservare a -20 C;

- ◆ DPBS contenente Ca^{++} e Mg^{++} Lonza, Vervieres, Belgio addizionato di Penicillina-Streptamicina 1%
- ◆ Provette da 50ml
- ◆ 1 siringa da 20ml
- ◆ 2 siringhe da 10ml
- ◆ 1 siringa da 5ml
- ◆ Bisturi sterile
- ◆ Connettori SP-19
- ◆ Stringhe in plastica autosigillanti
- ◆ Foglio di alluminio
- ◆ Carta assorbente
- ◆ Pipette da 10-35ml
- ◆ Gelatina (SIGMA)

Procedimento:

- 1)** Il giorno precedente l'isolamento delle cellule HUVEC, gelatinare le flask di coltura con la gelatina.
- 2)** Preparare il piano di lavoro (strato di carta assorbente + foglio di alluminio) e controllare il cordone (aspetto, eventuale presenza clampaggi, trombi, buchi, ecc.)
- 3)** Tagliare le estremità con il bisturi (eliminare ogni clampaggio)
- 4)** Preparare due stringhe in plastica, chiudendole per circa metà (si deve formare un cappio del diametro giusto per poter stringere le estremità del cordone)
- 5)** Prendere un SP-19 maneggiandolo per l'estremità esterna (*quella che si aggancia alla siringa*) ed inserirlo nella vena ombelicale (più larga, lassa e beante, si distingue dalle due arterie); fissarlo con la stringa precedentemente preparata (nella figura seguente, la freccia indica dove fissare la stringa)



- 6)** Caricare 10ml di DPBS nella siringa mantenendo una piccola quantità di aria all'interno (aiuterà l'espulsione del liquido dal cordone), inserirla nel SP-19 e procedere con il primo lavaggio, scartando il liquido; porre attenzione all'eventuale

fuoriuscita di liquido (zampilli) lungo il cordone, indicante la presenza di buchi (se presenti, bisognerà tagliare il cordone a monte e ricominciare l'operazione); rimuovere la siringa.

- 7)** Ripetere le operazioni dei punti **5.** e **6.** per l'altra estremità, senza rimuovere la siringa al termine.
- 8)** Caricare la siringa (da 5 o 10 ml, a seconda della lunghezza del cordone) con 4-7 ml di soluzione di collagenasi, collegarla all'estremità libera del cordone e rilasciare il contenuto nel cordone.
- 9)** Incubare a 37°C per 17 min
- 10)** Nel frattempo, preparare sterilmente la siringa da 20ml con 15-20 ml di DMEM mantenendo una piccola quantità di aria all'interno (aiuterà l'espulsione del liquido dal cordone) ed una provetta sterile da 50 ml; mettere nell'incubatore le flask gelatinate per la coltura
- 11)** Al termine dell'incubazione, prelevare il cordone e portarsi sottocappa; "massaggiare" dolcemente il cordone per circa 1 minuto.
- 12)** Disinserire una siringa da un'estremità qualsiasi del cordone ed inserirvi la siringa contenente il DMEM; disinserire l'altra siringa vuota e posizionarsi in prossimità della provetta sterile.
- 13)** Vuotare il contenuto del cordone facendovi passare il medium; chiudere il provettone e centrifugare a 3000rpm per 15 secondi.
- 14)** Aspirare il surnatante, risospendere il pellet con poche gocce di $\text{DMEM}_{\text{cpl}} + 20\% \text{FCS}$, portare a volume (5-7ml per le T25 e 10ml per le T75) con lo stesso medium e porre in incubatore.
- 15)** Da 3 a 24 ore dopo sarà possibile osservare le HUVEC sul fondo (mediamente, formano dei "nidi" traslucidi).

Cultura di monociti umani THP-1

I monociti umani THP-1, cellule monocitarie derivanti da leucemia umana acuta, sono state mantenute in coltura in sospensione in terreno RPMI 1640 (Lonza, Vervieres, Belgio) addizionato siero bovino fetale (10%), L-glutamina (1%), sodio piruvato (1 mM), 2.5 Glucosio, antibiotici (penicillina 10.000 unità/ml e streptomina 10.000 µg/ml) e β-mercaptoetanololo (50 µM; Sigma–Aldrich).

Modificazione delle Lipoproteine LDL

Le LDL sono state isolate da plasma umano fresco tramite ultracentrifugazione ($d=1.019-1.063$ g/ml) (Havel R.J. and E. Rapaport,1995). LDL sono state acetilare tramite la reazione con anidride acetica, mentre le OxLDL sono state ottenute mediante reazione con solfato cuprico 20µM (Basu, S.K., et al., 1976) in PBS, e incubate per 24H a 37°C. L'ossidazione è stata bloccata tramite l'aggiunta di idrossitoluene butilato 40µM. Prima dell'utilizzo le OxLDL sono dializzate in PBS.

Stimolazione e trattamento con Manidipina

HUVEC

Le cellule endoteliali sono staccate dalla flask con tripsina (Invitrogen), e seminate in piastre da 12 pozzetti, precedentemente gelatinate, in DMEM + 20% FCS. Una volta raggiunta la confluenza, le cellule vengono pre-trattate con Manidipina alle diverse concentrazioni testate per 18 ore, in medium addizionato con albumina 0.2% (Sigma–Aldrich). In seguito le cellule sono incubate per 24 ore rispettivamente con solo terreno di coltura, OxLDL (100 µg/ml), AcLDL (50 µg/ml) o TNF-α (2ng/ml) .

THP-1

Il differenziamento cellulare in macrofagi, è stato ottenuto mediante trattamento delle THP-1 con un estere del forbolo, il 12-meristato 13-acetato di forbolo (PMA) (Sigma–Aldrich), per 48 ore. Successivamente le cellule sono state incubate per 24 ore in presenza di LPS (Sigma–Aldrich), singole citochine quali, inteluchina-1 β (10 ng/ml), INF- γ , TNF- α (25 ng/ml) o un mix di delle stesse, in presenza o meno di Manidipina.

Test di vitalità' (MTT test)

Il saggio dell'MTT è un saggio colorimetrico sensibile e quantitativo che permette di stimare il numero delle cellule aventi ancora attività mitocondriale, e quindi la vitalità delle cellule. Si basa sulla capacità delle deidrogenasi mitocondriali delle cellule vive di convertire il substrato giallo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazolio bromide (MethylThiazole Tetrazoliumbromide, MTT), solubile in acqua, in un prodotto insolubile di colore blu scuro, il formazano. La quantità di formazano prodotta risulta essere proporzionale al numero di cellule vive, poichè solo queste sono metabolicamente attive e quindi in grado convertire del colorante nel prodotto dedectabile allo spettrofotometro (56). Alle HUVEC seminate in piastre da 12 pozzetti, terminato il trattamento come da protocollo, sono stati aggiunti 10 μ l di MTT e la successiva incubazione in termostato è stata condotta per 3 ore. In seguito sono stati aggiunti 100 μ l di un solvente 0,04 M HCl in propan-2-olo (Sigma) ed è stata eseguita lettura spettrofotometrica alla lunghezza d'onda di 570 nm e con una lunghezza d'onda di riferimento di 630 nm.

Determinazione del contenuto proteico

Il contenuto proteico dei campioni è funzione del numero di cellule presenti nei pozzetti e viene valutato attraverso il metodo di Lowry (Lowry O.H. et al.,1951).

Il substrato cellulare dei campioni utilizzati per i diversi esperimenti, dopo essere stato lavato due volte con PBS non sterile, viene congelato fino al momento della determinazione.

Una volta scongelate, le cellule vengono trattate con NaOH 1N (0.5ml/pozzetto) e lasciate su piastra agitante per qualche ora in modo da favorirne la disaggregazione; 100µl di questa sospensione vengono diluiti in provetta con 100µl di acqua deionizzata ed addizionati di 1ml di soluzione A+B (50:1).

Si incubano quindi le provette per 10 minuti in un bagno termostato a 37°C; al termine di questo periodo, ai campioni si aggiungono 100µl di reattivo di Folin, diluito con acqua (1:1).

Dopo venti minuti di incubazione i campioni sono letti allo spettrofotometro a 550nm, ricavando la quantità di proteine dai valori di assorbanza di una curva standard ottenuta con l'albumina.

Preparazione della scala standard e del bianco

La scala standard è costituita da cinque campioni in doppio di 10, 20, 30, 40 e 50µg di albumina, ottenuti a partire da una soluzione madre di 1mg/ml.

Ad ogni provetta vengono aggiunti 100µl di soda 1N ed il quantitativo d'acqua necessario per arrivare ad un volume totale di 200µl. La metodica prosegue come per i campioni.

I bianchi sono preparati con 100µl di acqua e 100µl di soda, a cui vengono aggiunti, in sequenza, la soluzione A+B ed il Folin.

Preparazione della soluzione A

Si pesano 20g di carbonato di sodio, 4g di soda e 0.2 di tartrato di sodio (oppure 0.237g di tartrato biidrato di sodio) e si sciolgono in 1l di acqua deionizzata.

Poiché tale soluzione è fotosensibile e termolabile la bottiglia in cui è conservata dev'essere avvolta in carta d'alluminio e mantenuta alla temperatura di 4°C.

La soluzione, prima di essere utilizzata, viene testata contro quella già in uso: due campioni di 30µg di albumina, addizionati con una delle due soluzioni, devono fornire assorbanze simili dopo lettura allo spettrofotometro.

Preparazione della soluzione B

Dopo aver pesato 5g di solfato rameico si disciolgono in 1l di acqua deionizzata.

La bottiglia di conservazione va ricoperta di carta di alluminio e mantenuta alla temperatura di 4°C.

Come per la soluzione A, è necessaria una prova preventiva per testare la validità del nuovo preparato.

Calcolo del contenuto proteico

Si calcola la media dei valori di assorbanza di ciascuno standard (ϵ) e si dividono i µg dello standard per tale valore; facendo la media di questi dati si ottiene M medio.

Moltiplicando l'assorbanza dei singoli campioni (Abs) per M medio, dividendo per il volume di NaOH prelevato all'inizio dell'esperimento e moltiplicando per il volume totale del pozzetto, si ottiene la quantità di proteine.

$(\text{Abs} \times \text{M medio} / 100\mu\text{l}) \times 0.5\text{ml} = \text{mg di proteine nel pozzetto}$

Valutazione della secrezione di IL-6

Al termine di ogni trattamento, il surnatante cellulare è stato raccolto, centrifugato e la secrezione di IL-6 nel medium di cultura è stata valutata mediante un kit ELISA (BENDER, Medsystem, Vienna, Austria), seguente le indicazioni riportate. Ogni valore è stato normalizzato per la vitalità cellulare.

Analisi statistiche

I risultati degli esperimenti in vitro sono riportati come media di triplicati $\pm$ deviazione standard. La significatività statistica è stata determinata dal test di Student utilizzando Graph Pad Prism (GraphPad Software). Le variazioni osservate sono state ritenute significative a partire da $p < 0.05$.

Risultati

Vitalità cellulare

Per ogni esperimento effettuato, sulle cellule endoteliali isolate da cordone ombelicale, HUVEC, e nei macrofagi umani, abbiamo valutato la vitalità cellulare per verificare che la concentrazione di farmaco o il tipo di stimolazione impiegati non fossero tossici per le cellule. La percentuale di vitalità per le cellule HUVEC è stata valutata attraverso la misurazione del contenuto in proteina per ogni trattamento, o con il test dell' MTT. I risultati, espressi come percentuale sulle condizioni di controllo, sono riportati nella tabella 1. Il trattamento delle HUVEC con le lipoproteine AcLDL non ha mostrato nessun effetto tossico sia in presenza che in assenza di Manidipina. L'incubazione delle HUVEC con le OxLDL ha ridotto la vitalità cellulare del 30% rispetto le condizioni di controllo, e il trattamento con Manidipina 1 μ M non ha ulteriormente aumentato la tossicità cellulare. La riduzione della vitalità cellulare osservata con le OxLDL e non con Manidipina, è stata confermata utilizzando il test dell' MTT. Il trattamento delle HUVEC con il TNF- α 2ng/ml non è risultato citotossico né in condizioni basali né in seguito all'aggiunta di Manidipina ad entrambe le concentrazioni utilizzate. Sempre nella tabella 1 sono riportati le percentuali di vitalità dei macrofagi THP-1. Il mix di citochine utilizzato per indurre la risposta infiammatoria in queste cellule non ha determinato alcuna tossicità cellulare, così come il trattamento con Manidipina 1 μ M.

Condizioni Sperimentali		% VITALITÀ CELLULARE	
HUVEC			
		MEDIA	SD
	Controllo	100	
AcLDL 50µg/ml		110.7	3.5
	+ Manidipina 1µM	123.3	6.99
OxLDL 100µg/ml		69.33	2.31
	+ Manidipina 1µM	70.7	8.33
TNF-a 2ng/ml		108.9	3.14
	+ Manidipina 1µM	96.9	15.9
	+ Manidipina 5µM	150.9	12.9
THP-I			
		MEDIA	SD
	Controllo	100	
IFN- 10ng/ml, TNF-α 25ng/ml, IL-1β 10ng/ml		104.1	7.11
	+Manidipina 1µM	104.7	4.41

Tabella 1 .Percentuale della vitalità cellulare dopo il trattamento delle cellule endoteliali da cordone ombelicale (HUVEC) con le lipoproteine pro-aterogene AcLDL e OxLDL e TNF-α in presenza o meno di Manidipina. Percentuale della vitalità cellulare dopo il trattamento dei monociti umani THP-1 in seguito al trattamento con IFN-γ 10 ng/ml, TNF-α 25ng/ml, IL1 10ng/ml in presenza o meno di Manidipina. La vitalità cellulare è stata valutata attraverso la determinazione del contenuto di proteina o tramite il test dell'MTT, ed è espressa come percentuale sulle condizioni di controllo. I dati sono espressi come media ± SD (n=3).

Secrezione di IL-6 da cellule endoteliali, HUVEC, trattate con lipoproteine modificate.

Diversi studi indicano che il recettore LOX-1, lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1, media l'internalizzazione delle OxLDL nelle cellule vascolari quali macrofagi e cellule endoteliali (Chen, M., et al.2002).

Il trasporto intracellulare delle OxLDL è presumibilmente diverso a seconda dei tipi cellulari, infatti le cellule endoteliali, a differenza dei macrofagi, non accumulano le lipoproteine. A tale proposito è stato proposto che le cellule endoteliali possiedano delle proteasi e delle lipasi, assenti nei leucociti che possano mediare diversi meccanismi del metabolismo delle lipoproteine (Dunn S. et al., 2008).

E' inoltre stato mostrato che le cellule endoteliali, possiedano dei sistemi biochimici per la sintesi degli steroli, e per l'endocitosi delle lipoproteine mediata da recettori. Nonostante ciò uno studio ha mostrato come le LDL native o modificate, fungono da importanti attivatori dell'infiammazione (Ronda N. et al., 2003; Cominacini L. et al., 1998).

Inizialmente abbiamo messo a punto un protocollo in termini di tempi di incubazione e concentrazioni per osservare un' apprezzabile secrezione di IL-6 indotta da lipoproteine modificate, quali, AcLDL e OxLDL. Successivamente abbiamo valutato la capacità della Manidipina 1 μ M nel modulare la secrezione di IL-6 indotta dall'incubazione delle HUVEC con 50 μ g/ml di AcLDL. I risultati in figura 7, mostrano che in assenza di Manidipina, l'incubazione delle cellule con AcLDL incrementa la secrezione di IL-6 del 105%. La preincubazione delle cellule con Manidipina 1 μ M invece, previene completamente questo incremento indotto dalle AcLDL.

Effetto della Manidipina sulla secrezione di IL-6 indotta da AcLDL nelle HUVEC

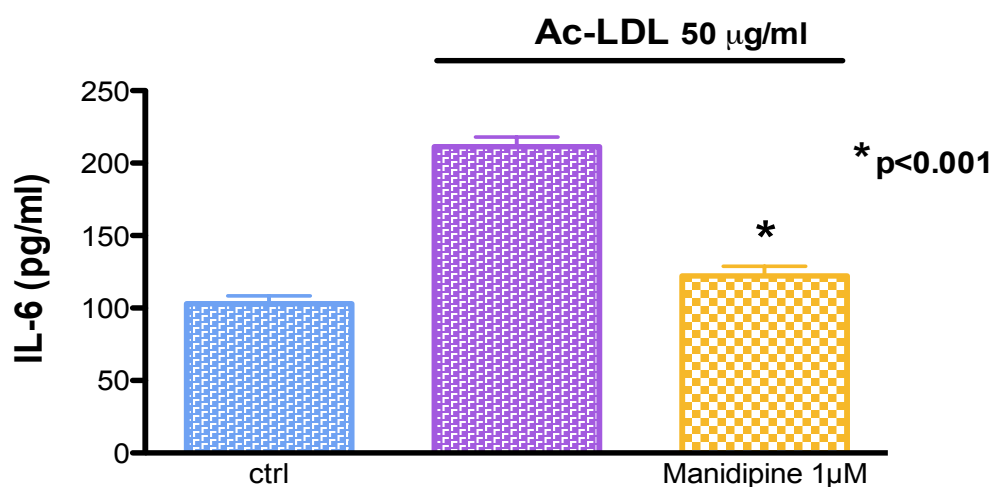


Figura 7 Effetto della Manidipina sulla secrezione di IL-6 indotta da AcLDL nelle HUVEC. Le cellule endoteliali sono state isolate da cordone ombelicale come descritto nei materiali e metodi . Una volta piastrate sono state trattate con Manidipina 1µM per 24 ore e successivamente incubate con AcLDL 50 µg/ml nelle successive 18 ore. L'IL-6 è stata misurata mediante kit ELISA; * $p<0.001$. I dati sono espressi come media $\pm$ SD.

Risultati simili ai precedenti sono stati ottenuti quando le HUVEC sono state pre-incubate con Manidipina 1 µM e poi trattate con 100 µg/ml di OxLDL (Figura 8). In assenza del farmaco le OxLDL incrementano la secrezione di IL-6 di circa il 100% rispetto le condizioni basali, mentre la pre-incubazione con Manidipina inibisce tale secrezione.

Effetto della Manidipina sulla secrezione di IL-6 indotta da OxLDL nelle HUVEC.

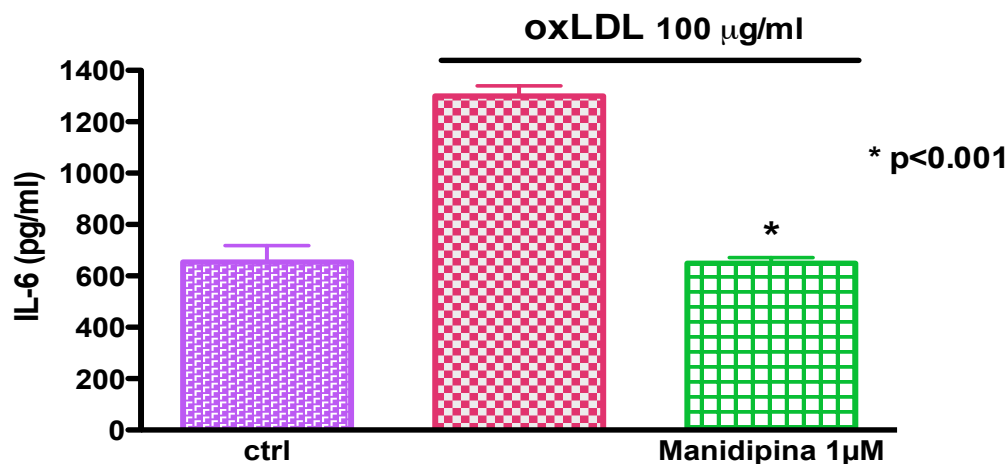


Figura 8 Effetto della Manidipina sulla secrezione di IL-6 indotta da OxLDL nelle HUVEC. Le cellule endoteliali, HUVEC, sono state isolate da cordone ombelicale come descritto nei materiali e metodi . Una volta piastrate sono state trattate con Manidipina 1µM per 24 ore e successivamente incubate con OxLDL 100 µg/ml nelle successive 18 ore. La secrezione di IL-6 nel surnatante è stata misurata mediante specifico kit ELISA; *p<0.001. I dati sono espressi come media± SD.

Secrezione di IL-6 e di IL-8 da cellule endoteliali, HUVEC, stimulate con TNF-α.

Successivamente è stata valutata la capacità della Manidipina di modulare la secrezione di IL-6 e di IL-8, nello stesso modello cellulare, ma in presenza di 2 ng/ml di TNF-α. Diversi studi infatti, mostrano come il TNF-α è sintetizzato all'interno della placca e può promuovere la progressione dell'aterosclerosi enfatizzando la risposta infiammatoria (Shima, E., et al., 2008).

Le cellule sono state quindi incubate con TNF-α per 24 ore allo scopo di indurre la secrezione di IL-6 e IL-8 nel terreno di cultura. Come mostrato nella tabella 2, l'incubazione con il TNF-α ha indotto un rilascio di IL-6 di circa il 56%. Il pretrattamento

con Manidipina 1 μ M ha ridotto tale secrezione di circa il 20% (con una tendenza verso la significatività statistica). La Manidipina 5 μ M invece ha completamente abolito la risposta infiammatoria indotta nelle HUVEC da parte del TNF- α .

Con lo stesso disegno sperimentale è stata valutata anche la secrezione di IL-8. Sempre dalla tabella 2, si osserva che il TNF- α ha indotto il rilascio di IL-8 nel terreno di cultura, in questo caso di 4 volte rispetto le cellule non stimulate. Il pre-trattamento con Manidipina 5 μ M ha ridotto tale incremento di circa il 40% (tabella 2)

	CTRL	TNF-α 2ng/ml	+Manidipina 1μM	+Manidipina 5 μM
IL-6 (pg/ml)	281 $\pm$ 10.9	437.8 $\pm$ 36.48	358.1 $\pm$ 11.5	247.5 $\pm$ 44
IL-8 (pg/ml)	3.06 $\pm$ 0.03	12.88 $\pm$ 2.27	N.A.	7.32 $\pm$ 1.15

Tabella 2 Effetto della Manidipina sulla secrezione di IL-6 e IL-8 indotta nelle HUVEC in seguito a stimolazione con TNF- α . Le cellule endoteliali, HUVEC, sono state isolate da cordone ombelicale come descritto nei materiali e metodi. Una volta plastrate sono state trattate TNF- α 2ng/ml, in presenza o meno di Manidipina 1 μ M o 5 μ M per 30 ore. La secrezione di IL-6 e IL-8 nel surnatante, è stata misurata mediante specifici kit ELISA; *p<0.001. I dati sono espressi come media $\pm$ SD.

Secrezione di IL-6 da cellule THP-1, indotta da diversi stimoli pro-infiammatori

Allo scopo di confermare l'effetto osservato sulle cellule endoteliali primarie umane, da parte della Manidipina, abbiamo utilizzato un altro modello di cellula umana, ossia i macrofagi, anch'essi coinvolti nell'aterosclerosi. I macrofagi infatti, sono cellule infiammatorie multipotenti in grado di sintetizzare e secernere diverse citochine pro-infiammatorie, tra le quali l'IL-6. La valutazione degli effetti pleiotropici della Manidipina è quindi proseguita sulla linea cellulare di macrofagi umani THP-1. Per stabilire le condizioni sulle quali valutare l'effetto del calcioantagonista nella secrezione di IL-6, i monociti umani THP-1, una volta differenziati in macrofagi, sono stati incubati inizialmente con LPS 0.1 µg/ml o TNF- α 2ng/ml per 24h.

Come si può vedere dalla figura 9 sia l'LPS 0.1 µg/ml, e in misura minore il TNF- α hanno stimolato la secrezione di IL-6. Nella valutazione degli effetti antiinfiammatori della Manidipina abbiamo preferito proseguire il nostro studio utilizzando una stimolazione costituita da TNF- α associato a altre citochine. In questo modo, abbiamo evitato che la forte stimolazione indotta dall' LPS potesse mascherare l'effetto della Manidipina; poichè recenti studi hanno confermato il ruolo del TNF- α nell'aterosclerosi questo tipo di scelta è più coerente nel mimare le condizioni che si realizzano in vivo (Shima et al., 2008).

Rilascio di IL-6 da macrofagi umani THP-1 incubati con LPS e con TNF- α .

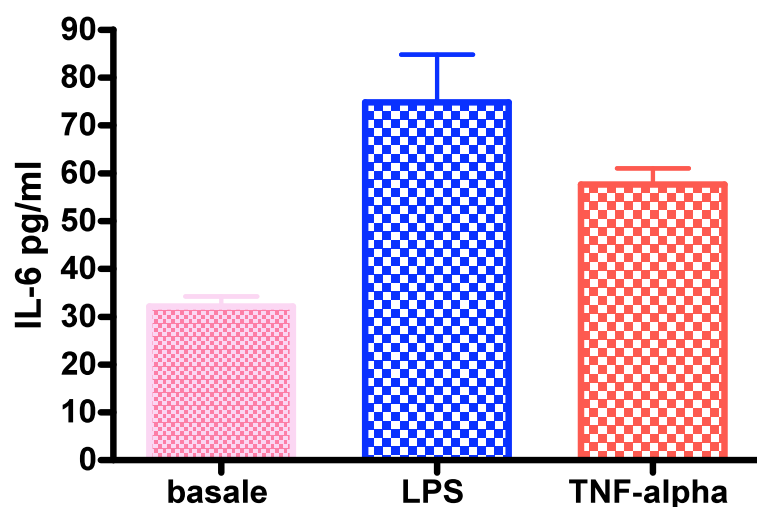


Figura 9 Rilascio di IL-6 da macrofagi umani THP-1 incubati con LPS e con TNF- α . Le cellule ThP-1 sono state piastrate e in seguito differenziate tramite incubazione con 100ng/ml di PMA. Successivamente le cellule sono state incubate con LPS 1 μ g/ml o TNF- α 25ng/ml. La secrezione di IL-6 nel surnatante, è stata misurata mediante uno specifico kit ELISA; I dati sono espressi come MEDIA $\pm$ SD (n=3).

Effetto della Manidipina sulla secrezione di IL-6, da cellule THP-1, indotta da un mix di citochine

Negli esperimenti successivi abbiamo testato sui macrofagi THP-1, la stimolazione indotta singolarmente da TNF- α , INF- γ , e IL-1 β o una loro combinazione. Quest'ultima associazione ha portato ad un maggiore rilascio di IL-6 nel medium, rispetto all'incubazione con ogni singola citochina utilizzata (tabella 3). Per tale motivo, aggiunto al fatto che riproduce meglio l'insieme delle molecole infiammatorie prodotte a livello del danno vascolare (Alexander H., 2009), abbiamo utilizzato questo tipo di stimolo per valutare la capacità antiinfiammatoria della Manidipina.

Trattamento	Basale (MEDIA±SD)
Terrenio di cultura	19.04±7.33
IL-1 10ng/ml	44.83±9.83
IFN- γ 10ng/ml	48.80±21.98
TNF- α 25ng/ml	54.39±1.16
LPS 1 μ g/ml	368.63±5.01
IL-1 + IFN- γ + TNF- α	123.06±7.18

Tabella 3 Rilascio di IL-6 da macrofagi umani THP-1 incubati con LPS, con singole differenti citochine o un mix delle stesse. Le cellule ThP-1 sono state piastrate e in seguito differenziate tramite incubazione con 100ng/ml di PMA. Successivamente le cellule sono state incubate per 16 ore, con le singole citochine o con un mix delle stesse, alle concentrazioni indicate in tabella. I dati sono espressi come MEDIA± SD.

I risultati mostrati in figura 10 mostrano che il mix di citochine da noi utilizzato, prodotte *in vivo* nell'infiammazione vascolare, (Cignarella, A., et al., 2006), inducono un forte incremento dell'IL-6, che aumenta di 6 volte rispetto le cellule di controllo non trattate. L'incubazione con Manidipina 1 μ M riduce questa risposta infiammatoria nei macrofagi THP-1, di circa il 30%.

Rilascio di IL-6 da macrofagi umani THP-1 incubati con un mix di citochine

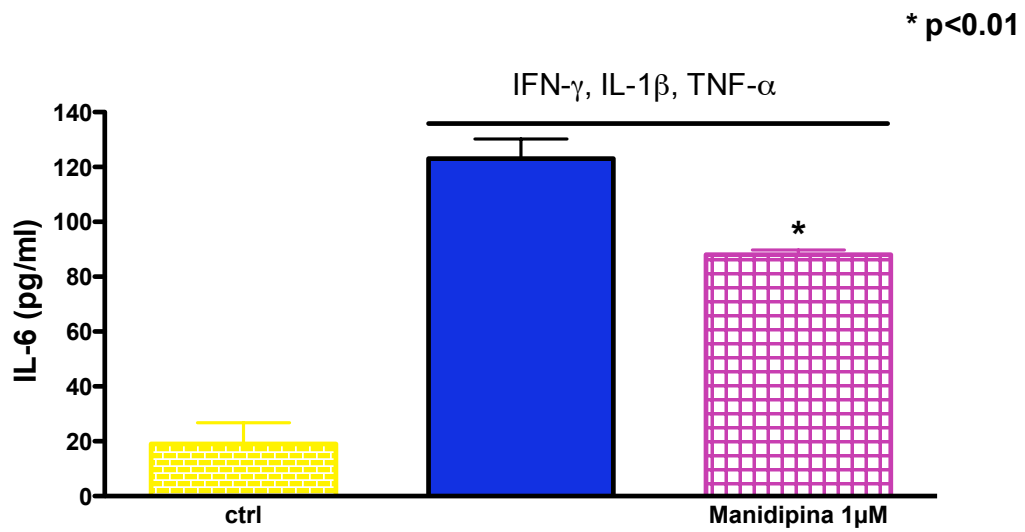


Figura 10. Rilascio di IL-6 da macrofagi umani THP-1 incubati con un mix di citochine. Le cellule ThP-1 sono state piastrate e in seguito differenziate tramite incubazione con 100ng/ml di PMA. Successivamente le cellule sono state incubate con un mix di citochine quali, INF- γ 10 ng/ml, TNF- α 25 ng/ml e IL-1 β 10 ng/ml per 16 ore in presenza o meno di Manidipina 1 μ M. * $p < 0.01$. I dati sono espressi come MEDIA $\pm$ SD (n=3).

Discussione

L'arterosclerosi è stata per molto tempo vista come un semplice accumulo di lipidi nelle pareti delle arterie di medio o grande calibro. Oggi questo concetto è stato rivoluzionato, è ormai assodata l'ipotesi che una complessa disfunzione endoteliale indotta da fattori quali, elevati livelli plasmatici di LDL, loro modificazioni ossidative, i radicali liberi, le infezioni di microorganismi, lo shear stress, l'ipertensione, il fumo di sigaretta o la loro combinazione, porti a una risposta infiammatoria di tipo compensatorio (Ross R., 1999).

I calcio antagonisti diidropiridinici sono ad oggi tra i farmaci più prescritti per il controllo dell'ipertensione. Essi sono in grado di bloccare l'ingresso del calcio intracellulare legandosi ai canali del calcio. Questo porta al rilassamento delle cellule muscolari lisce con conseguente dilatazione dei vasi sanguinei ed infine riduzione della pressione arteriosa (Shima E. et al., 2008). Diversi studi inoltre hanno mostrato che questi farmaci possiedono effetti pleiotropici, quali un'attività antiossidante, antiproliferativa e proprietà antiinfiammatorie. In particolare i risultati positivi che questa classe di farmaci ha mostrato negli studi condotti sulle cellule endoteliali, sembrano non essere attribuibili all'azione dei calcioantagonisti sui canali del calcio, ed essere quindi indipendenti dall'azione sulla pressione arteriosa. A tale proposito viene suggerito che l'azione di questi composti nel contribuire alla prevenzione dell'aterosclerosi, può essere in parte attribuito alle specifiche proprietà fisico chimiche che li caratterizzano (Toba et al., 2005; Martin-Ventura J.L., et al. 2008). La Manidipina è un calcio antagonista diidropiridinico di terza generazione e come descritto per la Lacidipina e la Lercanidipina, è un composto fortemente lipofilo. Questo fa sì che il farmaco si leghi lentamente alle membrane cellulari e da esse sia rilasciato in modo graduale, aumentando in questo modo la durata d'azione (Zanchetti A., 2005). In questo lavoro abbiamo valutato l'abilità della Manidipina nel ridurre la secrezione di citochine pro-infiammatorie come l'IL-6 e l'IL-8 *in-vitro*, sulle HUVEC, cellule endoteliali isolate da cordone ombelicale.

L'isolamento in vitro, la propagazione e lo studio delle cellule endoteliali rappresentano un prezioso mezzo attraverso il quale è possibile esplorare il ruolo dell'endotelio nei diversi processi fisiologici e patologici. Questo tipo di approccio ha portato ad un notevole incremento delle conoscenze sulla funzione endoteliale. La cultura delle cellule endoteliali è utilizzata abitualmente in laboratorio da più di 30 anni, e per tutto questo tempo si sono evolute differenti metodiche per l'isolamento delle cellule endoteliali dai diversi comparti vascolari. Le cellule endoteliali umane isolate da cordone ombelicale (HUVEC), ancora oggi rappresentano per molti ricercatori di tutto il mondo, un buon modello di studio del sistema vascolare. In realtà le proprietà delle HUVEC non rappresentano in modo completo, le attitudini metaboliche né le risposte fisio-patologiche o tossiche, di tutte le cellule endoteliali presenti nell'organismo. Nonostante ciò le HUVEC sono il tipo di cellula endoteliale facilmente disponibile e ottenibile in modo semplice in quantità esigue. Nel nostro studio abbiamo inoltre testato gli stessi parametri su un altro modello di linea cellulare umana coinvolta nell'aterosclerosi, i monociti umani THP-1, differenziati in macrofagi.

Inizialmente abbiamo definito il protocollo in modo tale da stimolare prima nelle cellule endoteliali, poi nei macrofagi la secrezione di IL-6 e IL-8. A tale scopo abbiamo utilizzato le lipoproteine modificate pro-aterogene, OxLDL e AcLDL, stimoli pro infiammatori quali il TNF- α o una combinazione di IL-1 β , IFN- γ e di TNF- α . La Manidipina ha ridotto la secrezione di IL-6 e IL-8 nelle cellule endoteliali, con un maggiore effetto inibitorio quando la stimolazione pro infiammatoria è stata indotta con la AcLDL e le OxLDL.

Gli effetti diretti, dei calcioantagonisti diiripiridinici riportati nei diversi aspetti dell'aterosclerosi, compreso il metabolismo del colesterolo o la risposta infiammatoria a livello cellulare, sono stati oggetto di precedenti studi: nel nostro laboratorio infatti, è stato dimostrato che la Lacidipina e la Lercanidipina, inibiscono in modo concentrazione dipendente l'esterificazione di colesterolo e la secrezione di metallo-proteinasi, MMPs, in

macrofagi in coltura (Bernini F. et al., 1997; Canavesi, M. et al., 2004); il gruppo di ricerca di Cominacini et al., hanno mostrato che la Lacidipina ha un effetto antiinfiammatorio nelle cellule endoteliali umane, riducendo l'espressione di VCAM-1, IVAM-1 e dell'E-selectina, stimolati con TNF- α . Questo effetto inibitorio sembra essere correlato a un'inibizione dell'attivazione del fattore di trascrizione nucleare NF-kB (Cominacini L. et al., 1998).

E' inoltre riportato che le cellule endoteliali non esprimono i recettori dei canali del calcio, ne deriva che il meccanismo attraverso il quale la Manidipina manifesta l'effetto antiinfiammatorio da noi osservato nelle cellule endoteliali e nei macrofagi, sia indipendente dalla riduzione della pressione arteriosa. Diverse linee di ricerca supportano questa conclusione: innanzitutto, nel nostro laboratorio è stato in precedenza dimostrato che la Lacidipina e la Lercanidipina, ma non la Nifedipina, sono in grado di inibire le funzioni cellulari coinvolte nella stabilità della placca, come l'esterificazione di colesterolo o la secrezione di MPPs nei macrofagi; ciò suggerisce che le proprietà lipofile dei DHP-CA possono essere coinvolte nell'effetto inibitorio del farmaco a livello cellulare, indipendentemente dall'affinità con i canali del calcio (Bernini F., et al., 1997; Canavesi M., et al., 2004).

Inoltre, la concentrazione attiva del farmaco *in vitro*, della Lercanidipina e delle Manidipina negli studi sulla secrezione delle citochine, sono elevate rispetto a quelle richieste per bloccare i canali del calcio, e molto più alte di quelle osservate nel plasma dei soggetti trattati con questi farmaci.

Tuttavia, studi precedenti con la Lercanidipina, hanno mostrato che l'effetto sul metabolismo del colesterolo e sulla secrezione di MPPs è mantenuto sino ad un concentrazione più bassa di quella utilizzata nella pratica clinica (10^{-9} M) , mentre il farmaco è incubato con le cellule per più tempo (Canavesi, M., et al., 2004). Queste considerazioni aderiscono all'ipotesi che le proprietà lipofile di questi composti, che

permettono al farmaco di arrivare alle membrane cellulari ed equilibrarsi lentamente nel pool intracellulare, sono strettamente necessarie per l'inibizione dell'esterificazione del colesterolo, e probabilmente per le altre attività cellulari, come l'effetto antiinfiammatorio osservato sulle cellule endoteliali.

Lo stress ossidativo ha un ruolo fondamentale nello sviluppo dell'aterosclerosi. Un altro potenziale meccanismo attraverso il quale la Manidipina, manifesta la sua attività antiinfiammatoria, può essere correlato alle proprietà antiossidanti connesse sempre alla sua natura lipofila (Toba H. et al., 2006). Precedenti studi hanno messo in evidenza l'effetto antiinfiammatorio e antiossidante della Manidipina e di altri calcioantagonisti come l'Amlodipina, osservando un incremento della eNOS e l'inibizione della dell'Enzima di Conversione dell' Angiotensina (Angiotensin Converting Enzyme = ACE), indipendentemente dall'azione sulla pressione sanguinea. In questo studio è stato infatti osservato che la Manidipina ha normalizzato la riduzione del gene e della proteina dell'eNOS, ed ha attenuato l' over-espressione della NADPH ossidasi, VCAM-1 e della MPC-1 nell'aorta di ratti ipertesi (Toba H. et al., 2005).

Sempre sulla stessa corrente di ricerca, è stato mostrato che la Lacidipina è in grado di diminuire l'espressione delle molecole di adesione nelle HUVEC, riducendo la formazione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS), indotta dalle Ox-LDL (Cominacini L. et al., 1998). L'Amlodipina è in grado di diminuire la produzione della generazione superossido nelle cellule endoteliali umane e lo stesso effetto è stato osservato per la Manidipina nelle cellule endoteliali di aorta di ratto (Toba H, et al., 2006). In fine la Alzenidipina ha mostrato inibire l'espressione delle molecole di adesione dipendente dalle specie reattive dell'ossigeno, indotte dal TNF- α nelle cellule endoteliali dell'aorta umana (Naito Y., et al., 2006).

Nuovi studi potranno aiutare a comprendere meglio i meccanismi che stanno alla base degli effetti pleiotropici della Manidipina, ed eventualmente stabilire una relazione tra gli

effetti antiinfiammatori osservati, la modulazione dell'espressione di Nf-Kb, e la capacità antiossidante di questi composti.