

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI ROMA "TOR
VERGATA"**

FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA

Dottorato di ricerca in
MEDICINA DI LABORATORIO XIX ciclo

**"Ruolo della stromelisina-1 nel determinismo
dell'aterosclerosi"**

Dottoranda: Dott.ssa Paola Allori

Coordinatore: Prof. Claudio Cortese

Anno Accademico 2006-2007

INDICE

1. ATEROSCLEROSI	1
1.1 Endotelio vascolare	2
1.2 Aterogenesi	4
1.3 Progressione della placca ateromasica	7
2. METALLOPROTEINASI DELLA MATRICE	10
2.1 Classificazione e struttura	11
2.2 Regolazione e attivazione	15
2.3 Stromelisina-1	18
3. SCOPO DELLA RICERCA	22
4. MATERIALI E METODI	
24	
4.1 Estrazione del DNA da sangue intero	25
4.2 Recupero del DNA	28
4.3 Quantificazione del DNA mediante analisi allo spettrofotometro	28
4.4 Generalità sulla reazione a catena della polimerasi (PCR)	29
4.5 Condizioni sperimentali della PCR	31
4.6 Disegno dei primers mutagenici	32
4.7 Analisi di restrizione	37
4.8 Dosaggio dei livelli di MMP-3 nel siero	38
5. RISULTATI	39
6. DISCUSSIONE	44

1. ATEROSCLEROSI

L'aterosclerosi è una patologia degenerativa cronica che, in termini di morbilità e mortalità, rappresenta la principale causa di malattia nei paesi occidentali.

Ha un ruolo centrale nella patogenesi dell'infarto cardiaco e cerebrale, dei processi di gangrena e di perdita di funzionalità degli arti inferiori.

La principale lesione tipica dell'aterosclerosi è la placca ateromasica che nella sua fase matura è formata da un nucleo lipidico (costituito per lo più da esteri del colesterolo) e da un involucro fibroso-connettivale con notevole presenza di cellule muscolari lisce, macrofagi ed elementi linfocitari. Le alterazioni funzionali e morfologiche dell'endotelio e della capsula fibrosa che sovrastano la placca sono la causa della sua rottura, il che scatena fenomeni trombotici che possono condurre ad una riduzione o ad un arresto del flusso nel vaso interessato, oppure alla formazione di emboli.¹

L'aterosclerosi è un processo caratterizzato dall'accumulo di lipidi nella parete delle arterie, ma non solo. Infatti, le lesioni aterosclerotiche derivano da una serie di specifiche risposte cellulari e molecolari, in seguito ad un danno alla parete vasale, che nel loro complesso rappresentano differenti stadi di un processo infiammatorio cronico nell'arteria.²

A livello clinico e sperimentale i processi infiammatori della parete vascolare rappresentano importanti fattori per seguire la storia naturale

delle lesioni aterosclerotiche e per stabilire il potenziale destino delle placche ateromasiche.

1.1 Endotelio vascolare

L'endotelio può essere considerato in senso lato un "organo" diffuso nell'organismo in grado di rispondere strutturalmente e funzionalmente a molteplici stimoli o insulti.

Esso consiste di un sottile strato di cellule che delimita internamente tutte le cavità dell'apparato circolatorio. Presenta una struttura da epitelio monostratificato appiattito nel quale le singole cellule costituenti sono collegate le une alle altre da giunzioni che assicurano la continuità del monostrato. Una conseguenza di questa struttura è la polarizzazione dell'endotelio: le cellule endoteliali hanno un lato apicale che è a contatto con il sangue, esposto ai costituenti plasmatici e alle cellule circolanti, ed uno basale, rivolto verso i tessuti e separato dai tessuti stessi da una membrana basale o matrice sottoendoteliale.

L'endotelio è in grado di raccogliere, integrare e trasmettere i messaggi che provengono dal sangue e dai tessuti utilizzando come "interlocutori" cellulari i leucociti e le piastrine verso l'esterno e cellule muscolari lisce e fibroblasti verso l'interno. Queste comunicazioni possono avvenire sia per contatto diretto tra le cellule tramite strutture adesive, sia a distanza tramite la liberazione di sostanze attive come citochine o fattori di crescita.

L'endotelio è in grado di sintetizzare ed organizzare sulla sua faccia basale la matrice sottoendoteliale. Questa struttura extracellulare molto complessa costituita da una rete di diverse proteine e di zuccheri complessi, funge da base di aggancio alla parete vascolare per le cellule endoteliali. Tuttavia questo non è l'unico ruolo svolto dalla matrice che regola anche l'attività funzionale delle cellule immagazzinando fattori di crescita o fattori che intervengono nella coagulazione che, fin quando legati, non sono attivi ma una volta liberi sono in grado di stimolare potenti risposte biologiche.

Le cellule endoteliali esprimono sulla superficie della membrana dei recettori specifici per i diversi componenti della matrice extracellulare.

L'interazione tra endotelio e matrice extracellulare è fondamentale sia nel mantenimento dell'integrità della parete del vaso, sia nella riparazione di danni, sia nella formazione di nuovi vasi. Infatti su questo substrato le cellule non solo rimangono adese, ma possono crescere e migrare. Quando la superficie endoteliale viene lesa, la matrice adesiva sottoendoteliale favorisce sia l'attivazione del sistema della coagulazione, sia l'adesione delle piastrine del sangue. Questo processo è controllato fisiologicamente e, in condizioni normali, è seguito dalla migrazione e divisione delle cellule endoteliali dai margini della superficie danneggiata fino a ricostituire uno strato endoteliale normale.

In situazioni patologiche quali, per esempio l'aterosclerosi, le malattie reumatiche ed i tumori, si innescano fenomeni diversi in cui è importante l'intervento della matrice extracellulare.³

1.2 Aterogenesi

Il processo aterosclerotico, nasce come un fenomeno riparativo agli insulti contro l'endotelio e le cellule muscolari lisce della parete arteriosa. E' un processo fisiopatologico lentamente progressivo che, per la maggior parte della sua evoluzione, non dà manifestazioni e giunge all'attenzione del clinico solo quando causa una marcata riduzione del lume di un'arteria o quando si complica per il soppravvenire di una trombosi.

Stress meccanici legati ad aumenti pressori, alterazioni regionali di flusso, stimoli tossici come il fumo, l'ipercolesterolemia e l'omocisteina, l'azione lesiva di virus, tossine esogene o immunocomplessi, agiscono alterando funzionalmente e strutturalmente l'endotelio vascolare. Qualunque sia lo stimolo, l'endotelio risponde producendo molecole d'adesione e segnali chemiotattici per monociti e linfociti T, incrementando la propria permeabilità a lipidi e proteine plasmatiche e riducendo la propria attività antitrombotica (figura 1a).⁴

E' possibile classificare le lesioni aterosclerotiche come segue (Stary HC, 1990):

- Tipo I: accumulo isolato di macrofagi contenenti lipidi (foam cells)

- Tipo II: stria lipidica (fatty streak): ispessimento intimale focale ricco in monociti-macrofagi, linfociti T e poche cellule muscolari lisce, quindi un vero e proprio piccolo nucleo di flogosi sub-endoteliale
- Tipo III: (pre-ateromatosa): lesione fibro-muscolo-elastica dell'intima, costituita da cellule muscolari lisce proliferate e circondate da tessuto connettivo.
- Tipo IV: placca ateromasica: costituita da un nucleo centrale aterosclerotico (core) circondato da una capsula fibrosa.
- Tipo V: placca fibrosa ricca di collagene.⁵

Uno dei principali fattori che contribuiscono alla genesi e alla progressione delle lesioni aterosclerotiche è rappresentato dalle lipoproteine a bassa densità (LDL).

Le LDL sono macromolecole formate da un nucleo non polare di trigliceridi ed esteri del colesterolo e da un rivestimento superficiale di fosfolipidi, colesterolo non esterificato e apoproteina B-100.

L'aumentata permeabilità endoteliale comporta l'infiltrazione delle LDL nella parete arteriosa a livello dell'intima dove restano intrappolate andando incontro a modificazioni chimiche ossidative.

Il sequestro e la rimozione delle LDL modificate è una parte importante dell'iniziale ruolo protettivo dei macrofagi nella risposta infiammatoria ed avviene attraverso vie recettoriali (recettori scavenger) diverse dal recettore LDL e non regolate dalla concentrazione intracellulare di colesterolo.

I monociti, una volta giunti nello spazio subendoteliale, vengono esposti all'azione delle LDL ossidate che inducono l'espressione del recettore scavenger, necessario per la fagocitosi delle LDL stesse, trasformandosi in cellule schiumose (foam cells), primo elemento cellulare del processo ateromasico (figura 1b).

Le LDL ossidate sono anche in grado di indurre l'espressione di molecole di adesione endotelio-leucocitarie e di stimolare le cellule endoteliali a produrre:

- fattori chemiotattici per i monociti/macrofagi come l' MCP-1 (Monocyte Chemiotactic Protein-1)
- fattori di crescita quali il PAF (Platelet Activating Factor) e il PDGF (Platelet Derived Growth Factor)
- citochine infiammatorie quali IL-1 (Interleukin-1) e TNF (Tumor Necrosis Factor)

Inoltre, contribuiscono all'accumulo dei macrofagi a livello subintimale, inibendone la motilità. I macrofagi, a loro volta, producono mitogeni e citochine, enzimi idrolitici-proteolitici e fattori della coagulazione. Tutto questo porta ad un aumento della risposta infiammatoria che condiziona sia la progressione che le complicanze della lesione.

Se la causa del danno endoteliale non viene rimossa dalla risposta infiammatoria e l'infiammazione prosegue, il processo diviene dannoso.^{2,6}

1.3 Progressione della placca ateromasica

L'evoluzione della placca, legata alla persistenza dello stimolo aterogeno, è determinata dalle differenti azioni esercitate da vari elementi cellulari, siano essi intrinseci alla parete arteriosa, come endotelio e miociti, oppure elementi circolanti come linfociti e macrofagi.

La morfologia della placca stessa varia da solida struttura fibrosa, ricca in collagene (placca fibrosa), a “soffice” core lipidico, circondate, entrambe, da una capsula fibrosa che prende il nome di cappuccio (figura 1c).

La placca fibrosa è essenzialmente una lesione stabile, mentre quella ricca in lipidi ha una elevata suscettibilità alla rottura.

I fattori che predispongono alla rottura di una placca vulnerabile sono il volume e la consistenza del core, lo spessore della capsula fibrosa ed il grado di flogosi nella capsula. La rottura del cappuccio fibroso avviene più frequentemente nella “regione spalla” , dove il cappuccio si inserisce nell'intima normale del vaso ed è più sottile (figura 1d).

I ricchi infiltrati infiammatori costituiti da monociti-macrofagi e linfociti attivati si localizzano preferibilmente nella spalla dell'ateroma suggerendo che il processo infiammatorio gioca un importante ruolo nella destabilizzazione della placca e di conseguenza, nell'innescare dei fenomeni trombotici.⁶

Lo spettro di alterazioni che coinvolgono la superficie della placca complicata includono la fissurazione, l'erosione, l'ulcerazione e la rottura, tutte conseguenze di un'alterazione delle proprietà meccaniche

del vaso interessato dal processo aterosclerotico a livello del cappuccio fibroso.

Il cappuccio fibroso non è una struttura statica ma va incontro a continui rimodellamenti, l'equilibrio tra processi di sintesi e degradazione è regolato dai mediatori dell'infiammazione che controllano i livelli di collagene in questa struttura.⁷

Poiché la componente principale del cappuccio fibroso è la matrice extracellulare, le conoscenze di come le cellule dell'ateroma producono, organizzano e degradano la matrice è importante per la stabilizzazione della placca.

I processi implicati nella fisiopatologia della placca ateromasica sono riassunti in figura 1.

2. METALLOPROTEINASI DELLA MATRICE

La parete dell'arteria, è sottoposta a continui cambiamenti in risposta alle condizioni emodinamiche (es. shear stress) e alla presenza di stati patologici.

In queste circostanze l'endotelio rilascia localmente sostanze attive come ossido nitrico (NO) ed endoteline che agiscono immediatamente sul tono vascolare ripristinando i livelli basali di stress e a lungo termine, inducono un rimodellamento vascolare agendo sulle cellule muscolari lisce.

Il tono vascolare è controllato da queste cellule che non solo regolano la tensione della parete ma sintetizzano anche i maggiori componenti strutturali della parete dei vasi: collagene di tipo I, III, IV e V, elastina, proteoglicani e glicoproteine. Questi componenti, che nel loro complesso formano la cosiddetta matrice extracellulare, interagiscono in modo da conferire ai vasi sanguigni le loro caratteristiche fisiche elastiche.

Ripetuti stress meccanici possono indebolire la parete dei vasi se non vengono mantenute le proprietà fisiche e l'integrità della matrice.

L'omeostasi all'interno della parete dei vasi dipende dall'azione coordinata di alcune proteasi e dei loro inibitori.⁸

Le metalloproteinasi della matrice (MMPs), anche chiamate matrixine, sono una famiglia di enzimi coinvolti nel turnover dei componenti della matrice extracellulare.

Questi enzimi sono normalmente presenti negli individui sani e hanno un ruolo importante in molti processi fisiologici (sviluppo embrionale, morfogenesi, angiogenesi, rimodellamento tissutale) così come in vari processi patologici (artrite reumatoide, aterosclerosi, cancro)⁹.

2.1 Classificazione e struttura

Le metalloproteinasi della matrice vengono classificate funzionalmente in base alle seguenti caratteristiche:

- 1) sono proteinasi che degradano almeno un componente della matrice extracellulare;
- 2) contengono uno ione zinco e sono inibite da agenti chelanti;
- 3) sono secrete in forma latente e richiedono, quindi, attivazione per esercitare la loro attività proteolitica;
- 4) condividono sequenze aminoacidiche comuni.¹⁰

La famiglia delle MMP comprende almeno 17 membri che hanno una elevata omologia di sequenza e comuni domini strutturali.

Sulla base del tipo di substrato che preferiscono, si possono dividere in quattro classi principali: *collagenasi*, *gelatinasi*, *stromelisine* e “*membrane-type*” (MT) MMPs (Tabella 1).

Tutte le matrixine sono secrete in forma inattiva come pro-enzimi (pro-MMPs) e la loro struttura primaria comprende vari domini, come illustrato in figura 2.

MMP	Nome	Substrato
Collagenasi		
MMP-1	Collagenasi interstiziale	Collagene tipo I, II, III, VII, X; gelatina, proteoglicani
MMN-8	Collagenasi neutrofica	Collagene tipo I, II, III; proteoglicani
MMP-13	Collagenasi-3	Collagene tipo I, II, III; proteoglicani
MMP-18	Collagenasi-4	
Gelatinasi		
MMP-2	Gelatinasi A	Collagene tipo IV, I, VII; gelatina, elastina
MMP-9	Gelatinosi B	Collagene tipo IV, V, VII; gelatina, elastina
Stromelisine		
MMP-3	Stromelisina-1	Collagene tipo III, IV, V, IX; laminina, fibronectina, elastina, gelatina, proteoglicani, procollagenasi
MMP-10	Stromelisina-2	Collagene tipo III, IV, V, IX; laminina, fibronectina, elastina, gelatina, proteoglicani
Membrane tipo MMPs		
MMP-14	MT1-MMP	Ccollagene tipo IV, proMMP-1, proMMP-13
MMP-15	MT2-MMP	Sconosciuto
MMP-16	MT3-MMP	ProMMP-2, gelatina
MMP-17	MT4-MMP	Sconosciuto
Altre		
MMP-7	Matrilisina	Proteoglicani, elastina, gelatina
MMP-11	Stromelisina-3	Serpine
MMP-12	Metalloelastasi	Elastina
MMP-19	Nessun nome	Sconosciuto
MMP-20	Enamelisina	Matrice dello smalto

Figura 1: Membri della famiglia delle Metalloproteinasi della Matrice

MMP	DOMINI
MMP-1	B
MMP-2	C
MMP-3	B
MMP-7	A
MMP-8	B
MMP-9	D
MMP-10	B
MMP-11	E
MMP-12	B
MMP-13	B
MMP-14	F
MMP-15	F
MMP-16	F
MMP-17	F
MMP-18	B
MMP-19	B
MMP-20	B

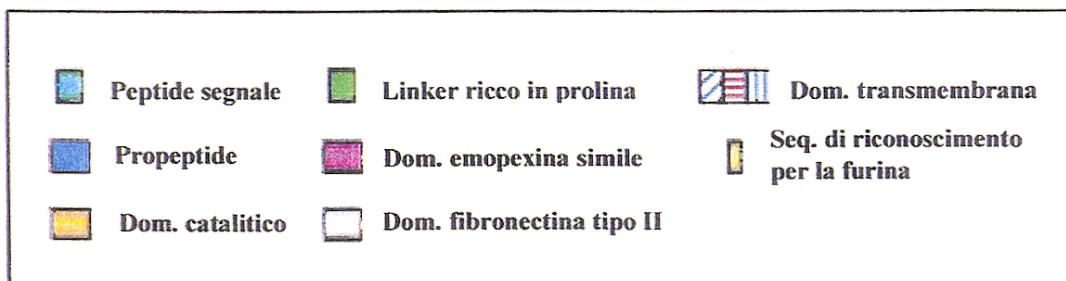
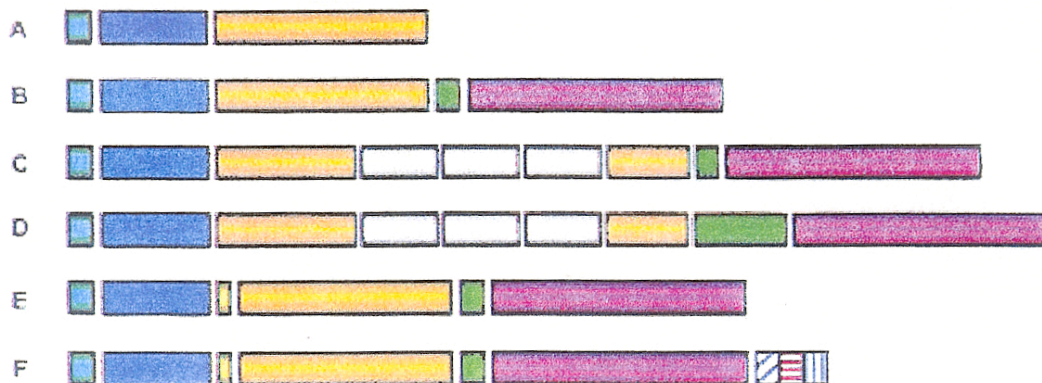


Figura 2: Domini strutturali delle MMMPs

Il dominio propeptide (circa 80 aa) ha sequenza PRCG(V/N)PD strettamente conservata. La cisteina dentro la sequenza lega lo zinco presente nel sito attivo e mantiene lo stato di latenza delle pro-MMPs.

Il dominio catalitico (circa 170 aa) contiene un motivo HEXXHXXGXXH, con tre istidine che legano lo zinco, ed una metionina conservata che formano, nell'insieme, una struttura a "giro" (Met-turn). Questo dominio consiste di 5 foglietti β , tre α -eliche e "loops" di collegamento. Inoltre, nello stesso dominio è presente un ulteriore ione zinco e 2-3 ioni calcio, che sono richiesti per la stabilità e l'espressione dell'attività enzimatica.

Le MMP-2 e MMP-9 hanno tre domini fibronectina-tipo II inseriti nel dominio catalitico. Queste ripetizioni interagiscono con collagene e gelatine.

All'estremità C-terminale si trova un dominio emopexina-simile (circa 210 aa) che è indispensabile alle collagenasi per tagliare la tripla elica dei collagene interstiziali, anche se i domini catalitici, da soli, mantengono l'attività proteolitica verso altri substrati.

Non si conosce ancora la funzione del peptide di legame ricco in prolina che collega il dominio catalitico a quello emopexina simile.

Le MT-MMPs hanno un ulteriore dominio transmembrana che ancora questi enzimi alla superficie delle cellule.¹¹

2.2 Regolazione e attivazione

L'espressione genica delle MMPs è regolata a vari livelli (trascrizione, attivazione ed inibizione) per mantenere inalterato l'equilibrio dinamico tra sintesi e degradazione dei componenti della matrice extracellulare e quindi l'integrità della matrice stessa.

Le MMPs non sono costitutivamente espresse ma vengono indotte in risposta a stimoli specifici che comprendono fattori di crescita, ormoni, citochine e agenti chimici.

Una volta secrete le pro-MMPs, ad eccezione di pochi membri attivati dalla furina, vengono attivate, *in vitro*, da proteinasi e da agenti non proteolitici come gli agenti SH-reattivi e denaturanti.

In vivo, molte matrixine sembrano essere attivate da proteinasi tissutali o del plasma, tra queste, anche se gli esatti processi dell'attivazione in condizioni fisiologiche e patologiche sono ancora oggetto di studio, la plasmina sembra avere un ruolo chiave. Infatti, si è visto che se le cellule del tessuto connettivo vengono stimulate con l'IL-1, il TNF- α o con fattori di crescita per aumentare l'espressione delle MMPs, aumenta anche la produzione del precursore dell'attivatore urochinasi-tipo del plasminogeno (pro-uPA).

Il pro-uPA si lega ad uno specifico recettore presente sulla membrana di varie cellule tra cui fibroblasti, macrofagi e cellule neoplastiche, e attiva lo uPA che a sua volta converte il plasminogeno in plasmina.⁹

Mentre la plasmina taglia e attiva stromelisine e collagenasi, la forma attiva delle stromelisine può agire su altre MMPs e aumentarne

l'espressione: gli stessi membri della famiglia delle metalloproteinasi sono, quindi, in grado di attivarsi l'un l'altro (figura 3).⁸

In tutti i casi l'attivazione richiede la distruzione dell'interazione cisteina-zinco, e la rimozione del propeptide.

L'attività proteolitica delle MMPs è controllata, infine, dalla presenza di inibitori endogeni chiamati TIMPs (inibitori tissutali delle metalloproteinasi).

A questa famiglia di inibitori appartengono quattro membri chiamati TIMP-1, 2, 3 e 4 che agiscono sulle MMPs legandosi in un rapporto molare 1:1 in forma di stretti complessi non covalenti.

Il TIMP-1 è una glicoproteina di 184 aa con una massa di circa 29 kDa ed è il più ubiquitario dei TIMPs.

Il TIMP-2 è una proteina non glicosilata di 194 aa e 22 kDa di massa.

Il TIMP-3 è una glicoproteina di 188 aa e ha una massa di circa 22 kDa.¹²

Riguardo al TIMP-4 di più recente scoperta non si sa ancora molto.

Nella sequenza di queste proteine sono conservati 12 residui di cisteina che formando ponti disolfuro intramolecolari ripiegano la proteina in due domini, uno N-terminale più grande, ed uno C-terminale più piccolo, con tre "loops" per ogni dominio.

Il meccanismo dell'inibizione delle MMPs da parte dei TIMPs non è stato ancora ben compreso, si sa però che il sito inibitorio per le MMPs si trova nel dominio N-terminale, dove è altamente conservata una

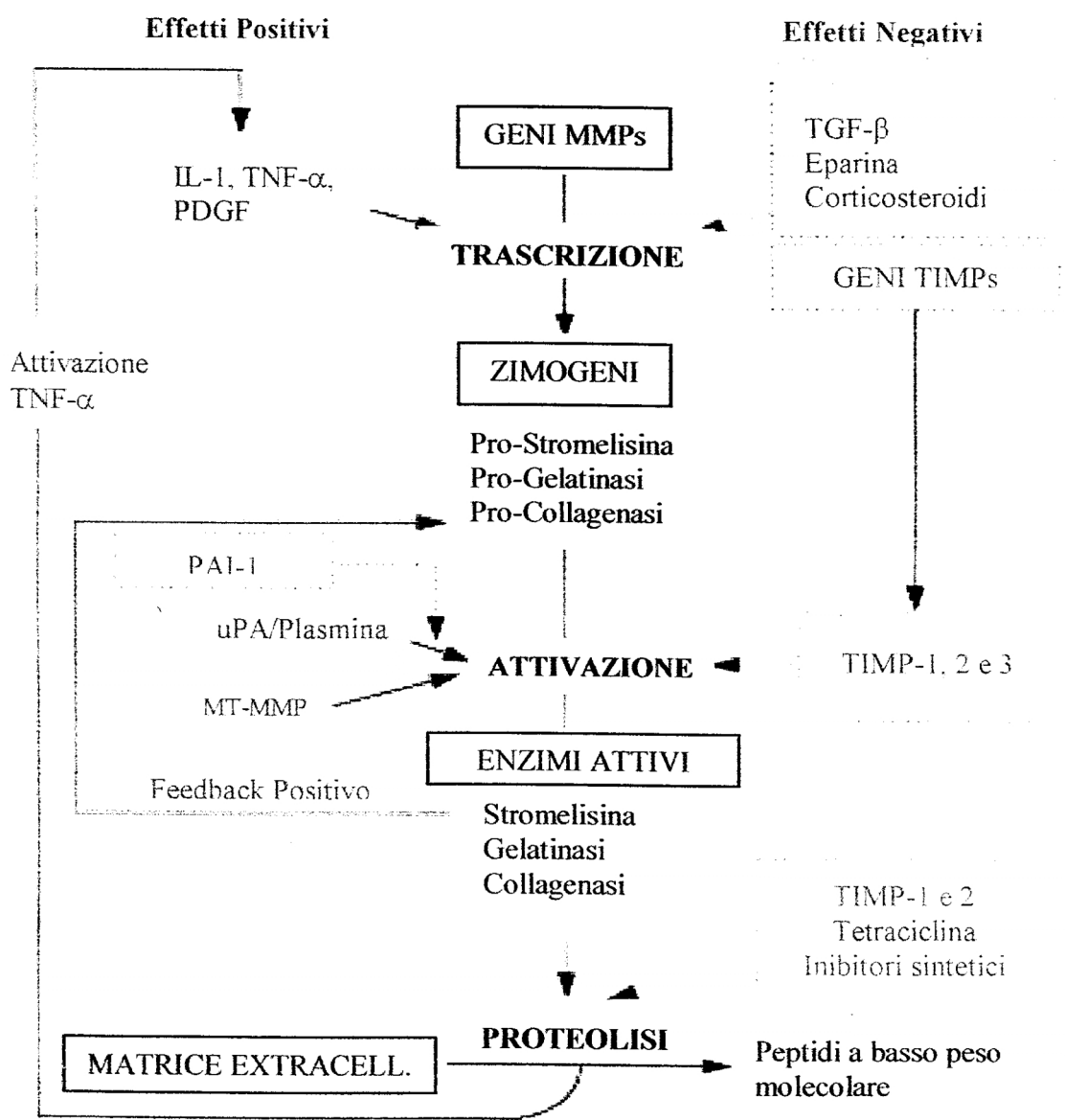


Figura 3: Meccanismi di attivazione e regolazione delle MMPs

sequenza di 22 aa. In generale esiste una omologia di sequenza del 30-50% nella struttura primaria dei quattro inibitori.¹³

In figura 4 è riportata la struttura cristallina del complesso TIMP-1 (in rosso) e sito catalico della MMP-3 (in grigio). Gli ioni zinco e calcio sono

rappresentati come sfere viola e rosse, rispettivamente; le tre istidine che legano lo zinco sono mostrate in verde.

I TIMPs sono importanti per mantenere l'equilibrio tra sintesi e degradazione della matrice ad opera delle MMPs e sono presenti ovunque siano queste ultime; sono in grado di inibire, *in vitro*, la tumorigenesi, *in vivo* le metastasi e l'angiogenesi.

Questi inibitori mostrano anche altre funzioni biologiche: TIMP-1 e TIMP-2 hanno un'attività mitogenica su vari tipi di cellule sebbene la loro overespressione riduce la crescita delle cellule tumorali.

TIMP-1 può anche stimolare i fibroblasti a produrre MMP-1.

I TIMP sono quindi importanti regolatori non solo del turnover della matrice ma anche delle attività cellulari.¹¹

2.3 Stromelisina-1

La stromelisina-1, anche detta MMP-3, appartiene alla famiglia delle metalloproteinasi della matrice e fa parte della classe delle stromelisine.

Questo enzima ha un'ampio spettro di attività: è in grado di degradare i proteoglicani, collagene III, IV, V e IX, laminina, fibronectina, gelatina ed elastina, inoltre, attiva altri membri della famiglia delle MMP, come le collagenasi.

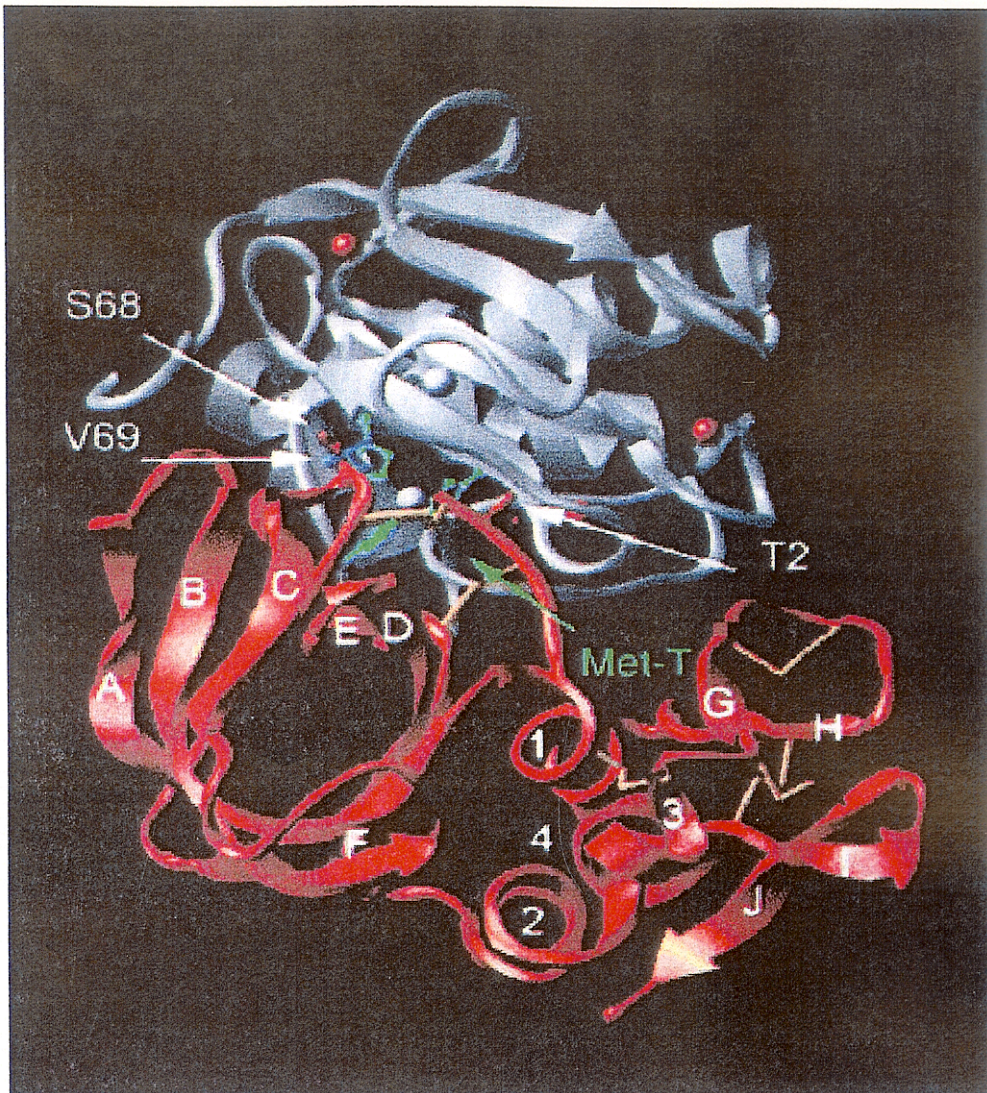


Figura 4: Interazioni TIMP-1 e sito catalitico MMP-3

La stromelisina-1 gioca, quindi, un ruolo importante negli eventi fisiologici e patologici associati al metabolismo del tessuto connettivo, compresi i cambiamenti nella composizione e/o nella funzione della parete delle arterie.

Il gene che codifica per la stromelisina nell'uomo è localizzato sul cromosoma 11q22.

La proteina è una metalloproteinasi di 54 kDa, formata da 447 aminoacidi la cui espressione è indotta in risposta a vari stimoli e regolata dall'interazione con l'inibitore TIMP-1.¹⁴

Recentemente è stata identificata una variante comune nella regione del promotore del gene localizzata 1171 bp a monte del sito di inizio della trascrizione che presenta un allele con 5 adenosine (5A) e l'altro con 6 adenosine (6A).¹⁵

Esperimenti in vitro hanno dimostrato che l'allele 6A è associato ad una più bassa attività del promotore che, probabilmente, è attribuibile al legame preferenziale di un repressore trascrizionale.

Soggetti portatori dell'allele 6A potrebbero accumulare matrice extracellulare in seguito alla diminuzione della degradazione.¹⁶

E' stato visto che la MMP-3 viene ampiamente espressa nelle placche ateromasiche dalle foam cells che originano dai macrofagi e dalle cellule muscolari lisce nel cappuccio della placca, nell'intima e nell'avventizia.

Questo ha portato all'ipotesi che la MMP-3 potrebbe essere coinvolta nella rottura della placca , seguita dall'attivazione delle piastrine e dalla cascata della coagulazione.^{17,18}

Inoltre, dati provenienti da studi che coinvolgono il polimorfismo 5A/6A nel promotore della stromelisin-1 indicano che la condizione associata con la ridotta attività enzimatica (allele 6A) predispone i soggetti alla progressione delle lesioni aterosclerotiche nel distretto coronarico; infatti, l'accumulo della matrice è una delle principali caratteristiche delle lesioni ateromasiche.¹⁵

3. SCOPO DELLA RICERCA

E' chiaro ormai che le MMPs sono importanti nel turnover della matrice, per questo motivo hanno un potenziale ruolo in molti aspetti della biologia vascolare, dall'aterosclerosi alle malattie coronariche post-trapianto.⁸

E' stato dimostrato in particolare che le cellule muscolari lisce e i macrofagi esprimono la stromelisin-1 nelle placche aterosclerotiche.

L'ampia varietà di substrati e l'azione svolta a pH neutro rende questa metalloproteinasi un componente molto importante nell'arsenale degli enzimi proteolitici della cellula, permettendo la degradazione di molti componenti della matrice.¹⁷

Se da una parte l'aumentata attività della MMP-3 può promuovere la rottura della placca, dall'altra il polimorfismo scoperto nel promotore del gene della stromelisin-1 che determina una riduzione dell'espressione enzimatica, si è visto essere associato alla progressione dell'aterosclerosi coronarica.¹⁹

Il presente studio è stato condotto per esaminare la relazione tra il polimorfismo della MMP-3, la geometria e lo shear stress nella arteria carotide comune di individui maschi sani che non presentano nessuno dei principali fattori di rischio per l'aterosclerosi.

In altre parole lo scopo precipuo è stato quello di indagare la funzione fisiologica di tale proteinasi, in condizioni di presumibile bassa o alta attività, in assenza di patologia aterosclerotica e indipendentemente

dallo stimolo di altri fattori come il fumo di sigaretta, l'iperlipidemia, l'ipertensione o il diabete.

4. MATERIALI E METODI

L'analisi è stata condotta su 42 soggetti maschi, selezionati per l'assenza dei maggiori fattori di rischio per l'aterosclerosi (non fumatori, assenza di iperlipidemia, ipertensione o diabete, e non facenti uso di farmaci di alcun tipo).

Lo studio è stato condotto in collaborazione con un gruppo di angiologi dell'Università di Catanzaro che hanno eseguito l'analisi dei parametri carotidei su questi soggetti. Di ciascuno si conosceva: la pressione sistolica (SBP) e quella diastolica (DBP), l'indice di massa corporea (BMI), la velocità del flusso sanguigno, la viscosità del sangue e lo shear stress.

Con il termine di shear stress s'intende l'attrito che viene esercitato dal sangue sulle pareti del vaso.

E' una forza emodinamica in grado di regolare alcune delle funzioni dell'endotelio e i fattori che ne condizionano i livelli sono la velocità di scorrimento del sangue, la viscosità del sangue e la dimensione del vaso intesa come diametro. Noti questi tre valori è possibile calcolare lo shear stress secondo la seguente formula:

$$\text{Shear stress} = \frac{\text{Velocità del sangue} \times \text{Viscosità del sangue}}{\text{Diametro del vaso}}$$

L'esame Eco-Doppler per i diametri delle arterie, le misure dello spessore medio-intimale (IMT) e delle velocità del flusso sanguigno sono

state eseguite usando uno strumento EKG ad alta risoluzione ATL Ultramark 9 HDI (Advanced Technology Laboratories, Inc.), equipaggiato con un probe lineare ad una multi-frequenza di 5-10 MHz.

Tutte le misurazioni sono state eseguite nella arteria carotide comune sinistra, a 1-2 centimetri di distanza dal bulbo.

I lipidi ed il glucosio nel sangue sono stati misurati con i kits disponibili in commercio e il colesterolo LDL è stato calcolato con la formula di Friedewald.

Il polimorfismo nel promotore del gene della stromelisina-1 è stato studiato mediante PCR con l'utilizzo di primers mutagenici (*mismatch*).

4.1 Estrazione del DNA da sangue intero

Il DNA è stato estratto da campioni di sangue intero con fenolo e cloroformio secondo le metodiche riportate in letteratura).²⁰

Primo giorno

L'estrazione del DNA è stata eseguita a partire da 2 ml di sangue intero in EDTA (1 mg/ml).

Il sangue è stato trasferito in provette Corning da 14 ml sterili e sono stati aggiunti 10 ml di tampone di lisi freddo, che determina la rottura delle cellule sanguigne con conseguente rilascio di tutti gli organuli cellulari, tra cui gli acidi nucleici.

La composizione del tampone di lisi è la seguente:

- Saccarosio 0.32 M
- Tris HCl 10 mM, pH 7.5

- MgCl₂ 5 mM
- Triton X 100 1%
- H₂O sterile a volume

I campioni di sangue con il tampone di lisi sono stati centrifugati a 3500 rpm per 20 minuti a 4°C.

Al termine di questa operazione è stato eliminato il sovrantante, mentre il pellet è stato risospeso in 10 ml di tampone di lisi e quindi nuovamente centrifugato.

Questi passaggi sono stati ripetuti per due volte, al fine di lisare le cellule ed isolare il più possibile gli acidi nucleici.

Al pellet ottenuto con l'ultima centrifugazione sono stati aggiunti 400 µl di SET buffer (Sodium-EDTA-Tris); il tutto è stato omogenato con il vortex e trasferito in Eppendorf sterili da 1.5 ml.

Il SET buffer è così composto:

- NaCl 100 mM
- EDTA 5 mM
- Tris-HCl 50 mM, pH 7.5

Alla miscela così ottenuta sono stati aggiunti 20µl di proteinasi K (10 mg/ml) (Boehringer Mannheim) al fine di eliminare le proteine ancora legate al DNA e 14 µl di SDS al 20% per un volume finale di circa 500 µl.

I campioni così trattati sono stati incubati per tutta la notte a 45-50°C.

Secondo giorno

A ciascun campione sono stati aggiunti 500µl di fenolo (equilibrato in Tris-HCl 0.1 M pH 8.0), quindi si è proceduto ad una agitazione per inversione per la durata di 5 minuti e successivamente con una centrifugazione per 15 minuti a 4°C e 5000 rpm.

Al termine della centrifugazione è stata recuperata la fase acquosa che è stata trasferita in una Eppendorf sterile, dove è stato aggiunto un egual volume di cloroformio contenente il 4% di alcool isoamilico; i campioni sono stati nuovamente centrifugati per 15 minuti a 5000 rpm a 4°C.

Al termine della centrifugazione la fase acquosa è stata recuperata e trasferita in una nuova Eppendorf sterile dove sono stati aggiunti il 10% di NaCl 4 M ed il 90% di etanolo assoluto a - 20°C.

Durante questo passaggio, agitando i campioni per inversione, è stato possibile osservare la presenza del DNA in quanto il sale e l'etanolo provocano la sua precipitazione sotto forma di una particolare aggregato chiamato "medusa".

La medusa è stata recuperata utilizzando pipette Pasteur modificate (la punta delle pipette, cioè, è stata scaldata alla fiamma e piegata ad uncino) e trasferita in un'altra Eppendorf sterile contenente etanolo al 70%.

Dopo centrifugazione per eliminare il più possibile l'etanolo, la medusa è stata risospesa in 100µl di tampone TE 1X composto da Tris-HCl 100 mM, pH 7.5 e da EDTA 10 mM, pH 8.0.

4.2 Recupero del DNA

Nei campioni in cui la medusa non si è formata, è stato necessario procedere con la metodica di recupero del DNA.

I campioni che, dopo l'aggiunta del 10% di NaCl 4M ed il 90% di etanolo assoluto, non mostravano la "medusa", sono stati incubati a - 20°C over-night.

Questi, il giorno dopo sono stati centrifugati a 4000 rpm per 10 minuti a 4°C. Al termine di questa operazione, è stato accuratamente scartato il sovrnatante, mentre il pellet di DNA è stato risospeso in etanolo glaciale (- 20°C) al 70%.

I campioni sono stati nuovamente centrifugati a 4000 rpm per 10 minuti a 4°C e, dopo aver scartato il sovrnatante, il pellet è stato asciugato sotto vuoto per 10 min. circa.

Infine, il DNA è stato risospeso in 50 µl di tampone TE 1X.

4.3 Quantificazione del DNA mediante analisi allo spettrofotometro

Ogni campione è stato preparato mediante diluizione del DNA 1:20 in H₂O sterile e prima della lettura tutti i campioni sono stati brevemente agitati con il vortex.

Il blank era costituito semplicemente da 1 ml di H₂O sterile.

Le letture sono state effettuate utilizzando lo spettrofotometro Smart Spec 3300 della BioRad.

Su ogni campione è stata effettuata una lettura a 260 nm (lunghezza d'onda corrispondente al picco di assorbimento massimo del DNA) e

una lettura a 280 nm (lunghezza d'onda corrispondente al picco di assorbimento massimo delle proteine).

Il rapporto OD_{260}/OD_{280} fornisce una misura della purezza dell'acido nucleico: valori ottimali sono compresi tra 1.7 e 2.

Infatti, rapporti inferiori a 1.7 sono indice di un'eccessiva presenza di proteine, mentre quelli maggiori di 2 evidenziano un processo di degradazione a carico del DNA.

Una volta terminate le operazioni di lettura allo spettrofotometro, i campioni sono stati conservati a 4°C.

La concentrazione del DNA, espressa in $\mu\text{g/ml}$, è stata calcolata moltiplicando il valore della lettura a 260 nm per il fattore di diluizione (nel nostro caso 20) e ancora per 50 (il valore di 1 OD corrisponde approssimativamente a 50 $\mu\text{g/ml}$ di DNA a doppio filamento).

4.4 Generalità sulla reazione a catena della polimerasi (PCR)

La PCR (polymerase chain reaction) è una tecnica di amplificazione in vitro diffusa sia nella ricerca di base che nella diagnostica di laboratorio, in quanto consente la sintesi esponenziale di un frammento di DNA (la cui lunghezza non deve superare le 2-3 kb) a partire da uno stampo di cui si conosce la sequenza nucleotidica delle regioni terminali.

La reazione avviene mediante ripetuti cicli di polimerizzazione grazie all'utilizzo di una polimerasi termostabile (Taq polimerasi) isolata dal batterio *Thermus Aquaticus*.

Le sequenze di innesco della reazione sono due oligonucleotidi sintetici (primer sense e antisense), che delimitano la regione da amplificare e la cui scelta è di fondamentale importanza per la messa a punto di una buona amplificazione.

Generalmente, i primers usati in una PCR hanno una lunghezza media compresa tra 18 e 30 nucleotidi; inoltre il contenuto in G+C deve essere compreso tra 40 e 60% e le sequenze non devono essere tra loro complementari perché altrimenti potrebbero verificarsi interazioni primer-primer.

Il DNA che funge da stampo viene denaturato al calore (94°C); successivamente la temperatura viene abbassata in modo da favorire l'ibridazione del DNA bersaglio con i primers; infine la temperatura viene portata a 72°C per consentire alla Taq polimerasi di sintetizzare il filamento complementare utilizzando i quattro deossiribonucleotidi trifosfati (dNTPs) presenti nella miscela di reazione.²¹

Una caratteristica importante da cui dipende il buon esito della reazione di amplificazione è proprio la temperatura di ibridazione dei primers.

A tale proposito esiste una formula che consente di calcolare la temperatura di ibridazione teorica: $T = 2(A+T) + 4(G+C) - 5$ dove A, T, G e C rappresentano rispettivamente il numero di adenine, timine, guanine e citosine presenti nella sequenza del primer.

Comunque è opportuno ricordare che, quasi sempre, la temperatura ottimale per l'ibridazione di ciascun primer si trova soltanto attraverso tentativi empirici.

Un componente importante per la reazione di amplificazione è il dimetilsulfossido (DMSO), in quanto ha la capacità di sfavorire le ibridazioni poco stabili; inoltre è necessaria anche la presenza dell'MgCl₂ sia per l'attività della Taq polimerasi, sia per la stabilizzazione del DNA a doppio filamento.

4.5 Condizioni sperimentali della PCR

Nel nostro studio la PCR è stata compiuta per amplificare un frammento di 130 bp sul DNA genomico, contenente la regione del promotore del gene della stromelisin in cui si trova il polimorfismo oggetto di analisi.

L'apparecchio utilizzato è il Thermal Cycler Gene Amp PCR System 2400 della Perkin Elmer.

I primers mutagenici utilizzati sono stati disegnati appositamente per il nostro studio, e sono stati forniti, liofilizzati dalla Life-Technologies.

La miscela di reazione per ciascun campione sottoposto ad amplificazione, aveva un volume finale di 50 µl e conteneva:

- 1 µg di DNA
- 0.8 µM di ciascun primers
- 1.5 mM di MgCl₂
- 0.2 mM di dNTPs
- 1U di Taq Polimerasi

I dNTPS e la Taq polimerasi, completa di buffer e MgCl₂, sono della Promega.

Dopo denaturazione del DNA per 5 min. a 95°C, la miscela di reazione è stata sottoposta a 30 cicli di denaturazione, annealing ed estensione come segue:

- denaturazione per 30" a 94°C
- annealing per 30" a 65°C
- estensione per 1' a 72°C

Al termine dei 30 cicli di amplificazione si aggiungeva un'ulteriore fase di estensione a 72 °C per 7'. Gli amplificati così ottenuti si conservano in frigorifero a 4°C.

4.6 Disegno dei primers mutagenici

I primers utilizzati nel corso di questo studio sono stati disegnati con l'ausilio di un apposito programma per computer Macintosh (MacMolly 3.5-1). Questi primers sono oligonucleotidi in cui sono inserite una o più basi *mismatch*, ossia non complementari al corrispondente tratto di gene con cui il primers si appaia.

Ciononostante, rispettando determinate condizioni, la base o le basi *mismatch* non impediscono la reazione di polimerizzazione catalizzata dall'enzima Taq polimerasi utilizzato nella PCR.

Il risultato di un'amplificazione eseguita con oligonucleotidi mutagenici consiste in molte copie di una regione genica contenente una o più basi modificate artificialmente in modo mirato rispetto alla sequenza originale. Per disegnare un primer *mismatch* per lo studio di mutazioni che si trovano in regioni di DNA di cui si conosce la sequenza, per prima

cosa occorre scegliere una zona adiacente (in direzione 5' o 3' indifferentemente) alla mutazione per cui si sta indagando.

La lunghezza ottimale del primer può variare da 18 a 30 nucleotidi.

Noi abbiamo disegnato oligonucleotidi di 30 basi.

La regione scelta deve estendersi sino al nucleotide adiacente al sito della mutazione che si sta esaminando. E' molto importante evitare di rimpiazzare con una base *mismatch* l'ultimo nucleotide all'estremità 3' terminale nel primer mutagenico. Se così fosse, infatti, verrebbe completamente ostacolata l'attività polimerasica e la reazione di amplificazione non potrebbe avvenire.

Una volta stabilito il tratto di DNA che si vuole usare per creare il primer mutagenico, il programma per computer sopra menzionato consente di cambiare uno o più nucleotidi alla volta e di analizzare i diversi patterns di restrizione corrispondenti alle varie soluzioni. I tentativi partono dalla penultima base all'estremità 3'; per ogni base da sostituire vi sono tre possibili basi *mismatch* da utilizzare.

Al termine di queste operazioni, si avranno un certo numero di oligonucleotidi che introducono siti di restrizione (comprendenti anche la mutazione che vogliamo studiare) per endonucleasi reperibili in commercio.

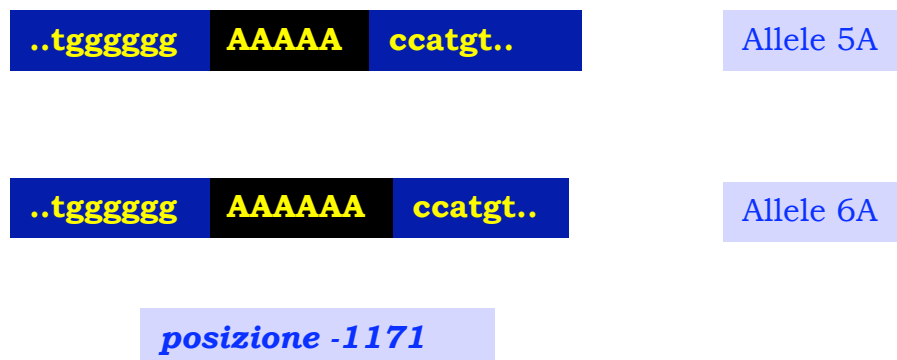
Abbiamo scelto il primer che meglio rispondeva alle nostre esigenze tenendo conto di alcuni fattori, tra cui:

- ◆ la presenza nell'amplificato di altre sequenze eventualmente riconosciute dall'enzima di restrizione che si deve utilizzare;

- ◆ i costi e l'efficienza dell'endonucleasi necessaria per l'analisi di restrizione;
- ◆ la presenza nell'oligonucleotide disegnato di sequenze ripetute o invertite che mal si presterebbero ad una corretta ibridazione con la sequenza bersaglio.

E' inoltre buona norma controllare che nella regione che vogliamo amplificare non esistano tratti complementari al primer mutagenico; in tal modo si evitano appaiamenti aspecifici che comprometterebbero il buon esito della PCR.

Il polimorfismo oggetto del nostro studio si trova nella regione del promotore del gene della stromelisina-1, 1171 bp a monte del sito di inizio della trascrizione e consiste nella presenza in un allele di cinque adenosine (5A) e nell'altro di sei (6A) come mostrato, schematicamente, di seguito.



La sequenza del primer sense mutagenico creato per lo studio del polimorfismo nel promotore del gene della stromelisina-1 è la seguente:

5' GGTTCTCCATTCCTTTGATGGGGGGAAAgA 3'

In questo caso il primer crea un sito di restrizione per l'enzima Tth111I (GACN/NNGTC) in presenza dell'allele 5A (figura 5).

Il secondo primer che si impiega per l'amplificazione, congiuntamente a quello *mismatch*, deve avere un rapporto (G+C)/(A+T) simile a quello dell'oligonucleotide mutagenico.

Noi abbiamo utilizzato il seguente :

5' CTCCTGGAATTCACATCACTGCCACCACT 3'

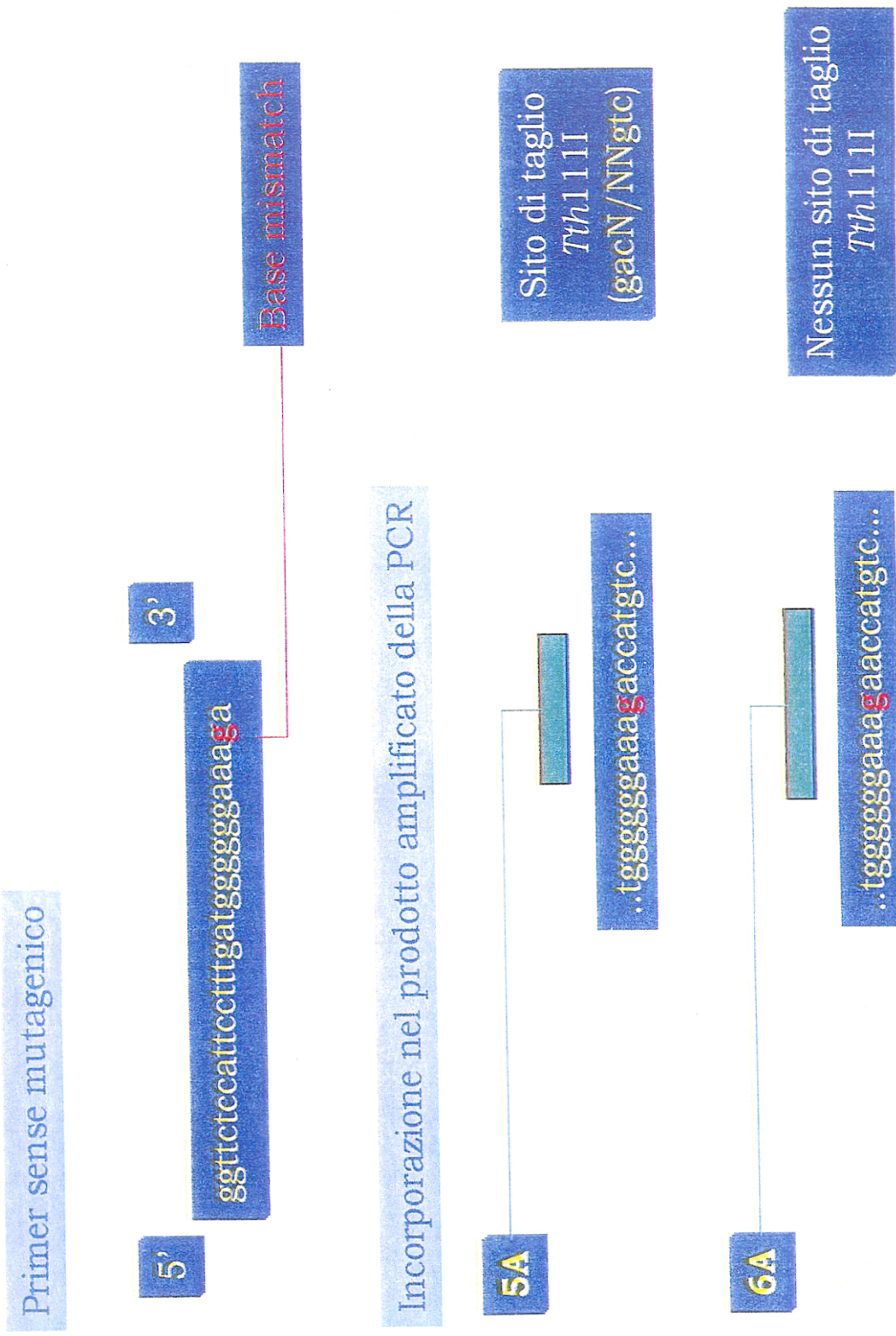
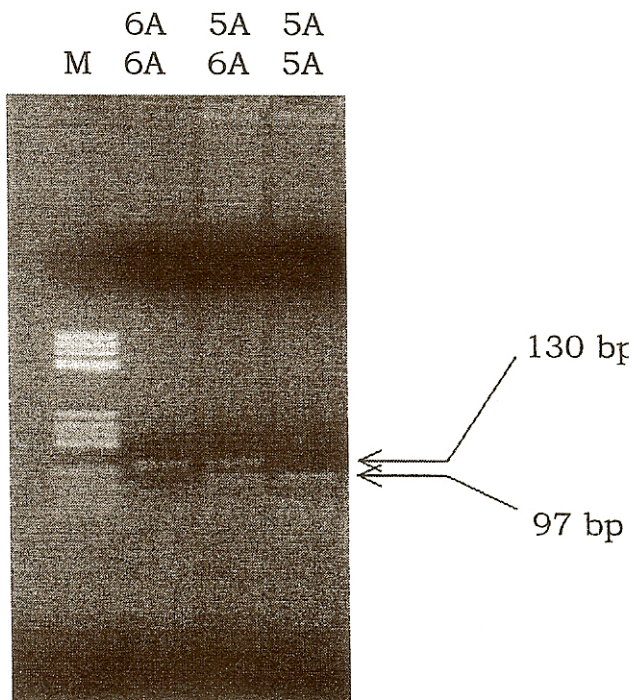


Figura 5: Primer mutagenico

4.7 Analisi di restrizione

Dopo aver verificato l'esito della PCR mediante elettroforesi su gel d'agarosio al 2%, 10µl del prodotto di PCR di ciascun campione sono stati digeriti con 5U dell'enzima Tth111I (Promega) per 3 ore a 65°C.

Terminato il periodo di incubazione il prodotto di digestione è stato separato mediante elettroforesi su gel d'agarosio al 2% e visualizzato con etidio bromuro. I soggetti 6A/6A mostrano una sola banda indigerita da 130 bp mentre la presenza di un unico sito di taglio per Tth111I nei soggetti 5A/5A da origine ad una banda da 97 bp e ad una da 32 bp (non visibile su gel); i soggetti 5A/6A mostrano le bande da 130 e 97 bp. I tre possibili genotipi sono mostrati nella figura che segue, la M indica il Marker usato (Marker V della Boehringer-Mannheim).



4.8 Dosaggio dei livelli di MMP-3 nel siero

La concentrazione della MMP-3 umana nel siero è stata misurata con il saggio ELISA Biotrak™ (Amersham International) basato sul metodo del doppio anticorpo.

Gli standard ed i campioni sono stati incubati in pozzetti contenenti un anticorpo specifico per la MMP-3, quest'ultima viene legata e gli altri componenti del campione vengono rimossi con dei lavaggi.

Si aggiunge l'anticorpo per la MMP-3 marcato con l'enzima perossidasi e dopo incubazione si lava di nuovo per rimuovere ogni eccesso.

Si aggiunge, infine, il substrato dell'enzima. La reazione viene bloccata con l'aggiunta di una soluzione acida ed il colore sviluppato (proporzionale alla quantità di MMP-3 presente) viene letto ad uno spettrofotometro a 450 nm.

La concentrazione di MMP-3 nei campioni viene determinata per estrapolazione dalla curva standard.

Le misurazioni sono state eseguite in doppio.

Tale saggio permette di riconoscere i livelli totali di MMP-3: proMMP-3, MMP-3 attiva ed i complessi MMP-3/TIMP. La sensibilità del saggio è di 2.35 ng/ml.

5. RISULTATI

Dei 42 soggetti partecipanti allo studio, 8 sono risultati omozigoti per l'allele 5A (19.1%), 10 omozigoti per l'allele 6A (23.8%) e 24 sono risultati eterozigoti (57.1%).

Le frequenze degli alleli 5A e 6A sono 0.476 (95% CI 0.367-0.587) e 0.524 (95% CI 0.413-0.633), rispettivamente.

La distribuzione genotipica non è significativamente differente dall'equilibrio di Hardy-Weinberg.

Le caratteristiche cliniche e biochimiche dei partecipanti, separate in base al polimorfismo dell'MMP-3, sono mostrate in tabella 2.

L'età, la pressione diastolica, l'indice di massa corporea e la viscosità del sangue sono simili nei tre gruppi.

La pressione sistolica, il colesterolo totale, i trigliceridi ed il colesterolo HDL sono lievemente più alti negli omozigoti per l'allele 6A, ma la differenza non raggiunge la significatività statistica del 5%.

Il glucosio nel sangue è lievemente, ma di nuovo non significativamente, più basso negli omozigoti 6A.

I livelli di MMP-3 nel siero (media \pm SD) non sono significativamente differenti tra i genotipi: 88.9 \pm 8.1 ng/ml nei 5A/5A, 93.3 \pm 15.3 ng/ml nei 5A/6A, 92.8 \pm 12.8 ng/ml nei 6A/6A (ANOVA: F=0.317, p=0.73).

Il diametro dell'arteria carotide comune e l'IMT sono significativamente più larghi nei soggetti 6A/6A, confrontati con gli eterozigoti o gli omozigoti per l'allele 5A. Non sono state osservate differenze tra questi due ultimi gruppi.

La velocità media del flusso sanguigno è significativamente più bassa negli omozigoti 6A. L'aumento nel diametro dell'arteria e la riduzione nella velocità del flusso producono valori di shear stress della parete significativamente più bassi nei soggetti 6A/6A. Non si osservano differenze tra i soggetti 5A/6A ed i 5A/5A (tabella 3).

La tabella 4 riporta le stesse variabili illustrate in tabella 3 dopo l'aggiustamento per possibili varianti confondenti con l'analisi di regressione multipla. Benchè lievemente attenuati, le differenze tra gli omozigoti per l'allele 6A e gli eterozigoti o gli omozigoti per l'allele 5A persistono anche dopo l'aggiustamento.

Tabella 2 Caratteristiche cliniche e biochimiche dei soggetti in accordo con i genotipi

	5A/5A	5A/6A	6A/6A	p≤
N	8	24	10	
Età (anni)	49.9±11.5	48.3±14.8	49.9±10.5	0.929
SBP (mmHg)	117.6±10.0	116.7±13.9	124.1±13.3	0.327
DBP (mmHg)	79.2±6.0	76.1±6.8	80.6±10.9	0.271
BMI (kg/m ²)	27.1±3.8	25.6±2.5	27.3±3.1	0.222
Col (mmol/l)	4.51±0.61	5.11±0.77	5.21±0.91	0.134
HDL-C (mmol/l)	1.10±0.26	1.19±0.31	1.32±0.36	0.342
Trig (mmol/l)	0.94±0.60	1.33±0.62	1.49±0.69	0.191
LDL-C (mmol/l)	2.98±0.58	3.31±0.76	3.20±0.66	0.506
Gluc (mmol/l)	5.49±1.24	5.18±0.70	4.85±0.65	0.260
η (cP)	4.6±0.5	4.6±0.4	4.6±0.3	0.793

SBP, pressione sanguigna sistolica; DBP, pressione sanguigna diastolica; BMI, indice di massa corporea; Col, colesterolo totale; HDL-C, colesterolo HDL; Trig, trigliceridi; LDL-C, colesterolo LDL; Gluc, glucosio; η , viscosità del sangue.

Tabella 3 Parametri carotidei in accordo con i genotipi

	5A/5A	5A/6A	6A/6A	p≤
N	8	24	10	
ID (cm)	0.57±0.03	0.60±0.06	0.67±0.10	0.001
IMT (μm)	630±92	670±116	765±116	0.03
V _M (cm/s)	36.2±4.3	39.7±6.0	34.2±5.8	0.03
τ _M (dynes/cm ²)	12.6±1.9	13.5±3.5	10.4±2.9	0.04

ID, diametro interno; IMT, spessore medio-intimale; V_M, velocità media del flusso sanguigno; τ_M, media dello shear stress di parete.

Tabella 4 Parametri carotidei, in accordo con i genotipi, dopo l'analisi di regressione multipla

	5A/5A	5A/6A	6A/6A	p≤
N	8	24	10	
ID (cm)	0.58±0.04	0.60±0.05	0.66±0.08	0.01
IMT (μm)	657±68	668±91	748±93	0.04
V _M (cm/s)	36.8±3.8	38.9±4.3	35.4±2.5	0.05
τ _M (dynes/cm ²)	12.9±1.6	13.1±2.5	11.1±1.3	0.05

ID, diametro interno; IMT, spessore medio-intimale; V_M, velocità media del flusso sanguigno; τ_M, media dello shear stress di parete.

Tutte le variabili sono state aggiustate per età, pressione sanguigna sistolica, pressione sanguigna diastolica, indice di massa corporea, glucosio e colesterolo-LDL.

6. DISCUSSIONE

I risultati ottenuti suggeriscono che il polimorfismo nel promotore del gene della stromelisina-1, che ne regola l'attività, è associato con caratteristiche strutturali e funzionali della arteria carotide comune in individui sani, maschi, in assenza dei maggiori fattori di rischio per l'aterosclerosi. Individui omozigoti per l'allele 6A mostrano una triade di eventi, vale a dire, aumento dello spessore della parete, allargamento del lume dell'arteria, e locale riduzione dello shear stress di parete, che potrebbero predisporre alla localizzazione della placca aterosclerotica.

La relazione tra il polimorfismo dell'MMP-3 e la triade degli eventi vascolari osservata, può essere spiegata in vari modi.

La ridotta attività della stromelisina-1 nei soggetti 6A potrebbe indurre l'accumulo di matrice extracellulare e l'ispessimento della parete dell'arteria. Questo potrebbe causare il restringimento del lume dell'arteria, ed esporre l'endotelio ad un incremento nello shear stress della parete.

L'allargamento dell'arteria per ripristinare le forze emodinamiche originali potrebbe compensare, determinando l'osservata dilatazione dell'arteria e la riduzione dello shear stress. Tale meccanismo è stato ipotizzato da vari autori per spiegare l'allargamento compensatorio della carotide così come delle arterie in risposta all'aterosclerosi.^{22,23}

Un'ipotesi alternativa potrebbe considerare l'indebolimento delle proprietà elastiche della parete dell'arteria, come conseguenza dell'incoordinata accumulazione della matrice, come evento primario. Questo porterebbe ad una ridotta resistenza agli effetti dilatatori della pressione sanguigna, dilatazione dell'arteria e riduzione dello shear stress. L' inspessimento della parete dell'arteria potrebbe essere un processo adattativo, conseguente ai cambiamenti nel carico emodinamico.²³

L'aumento del diametro della carotide comune è stato osservato in diverse situazioni fisiologiche e patologiche.

Studi di popolazioni hanno riportato un aumento del diametro della carotide comune con l'età ed è stata osservata una correlazione anche tra peso, altezza e diametro dell'arteria.^{24,25}

Ci sono, tuttavia, anche condizioni patologiche associate con l'aumento del volume della carotide comune. Soggetti, maschi, con diabete mellito non insulino-dipendente hanno diametri della carotide comune significativamente più larghi rispetto a controlli della stessa età e sesso.²⁶ Inoltre, la presenza delle placche aterosclerotiche, sia nella circolazione carotidea che coronarica, è spesso associata con un più

largo diametro dell'arteria.²⁷ E' ancora questione di dibattito se questo allargamento sia primario o secondario alla presenza della placca.

Nel complesso, i dati in letteratura indicano che l'incremento nel lume dell'arteria e lo spessore della parete sono ritrovamenti costanti che accompagnano il procedere dell'età così come condizioni cliniche associate all'aterosclerosi.²⁸

I nostri studi dimostrano che i soggetti di mezza età omozigoti per l'allele 6A, anche se sani e senza i maggiori rischi per l'aterosclerosi, mostrano alterazioni nella arteria carotide comune simili a quelle osservate nell'età e nell'aterosclerosi.

Le attuali conoscenze sull'influenza del polimorfismo dell'MMP-3 sull'aterosclerosi, forniscono l'evidenza di un legame tra la presenza dell'allele 6A e la progressione delle lesioni coronariche.

In un indagine condotta per tre anni su 72 pazienti con malattie coronariche definite tramite angiografia, partecipanti al St. Thomas Atherosclerosis Regression Study (STAR), YE ed altri hanno trovato che gli individui omozigoti per l'allele 6A mostrano una più rapida progressione sia della globale che della focale stenosi aterosclerotica; questo è particolarmente evidente in pazienti con una lieve stenosi o con alte concentrazioni di colesterolo LDL.¹⁵

Ulteriori dati provenienti dal Regression Growth Evaluation Statin Study (REGRESS), che ha studiato pazienti sintomatici per un periodo di due anni, e dal Lipid Coronary Angiography Trial (LOCAT) su pazienti con bypass coronarico e con basso colesterolo HDL, mostrano

simili risultati nei gruppi placebo, mentre non è stata osservata alcuna differenza nei cambiamenti del diametro dei vasi in gruppi trattati con pravastatina (REGRESS) o gemfibrozil (LOCAT).^{29,30}

I risultati del nostro studio, che miravano ad esaminare la relazione tra il polimorfismo dell'MMP-3 e l'arteria carotide in uno stadio pre-lesione, sono in accordo con i risultati dei sopramenzionati studi.

Il progetto del nostro studio rende difficile una diretta comparazione dei nostri risultati con i dati pubblicati sin qui.

In base alle nostre conoscenze, il nostro studio è il primo a dare notizie sugli effetti del polimorfismo dell'MMP-3 in un campione selezionato di soggetti sani e relativamente giovani, liberi da sintomi e segni di aterosclerosi.

Il distretto extracraniale della carotide è stato scelto perché è facilmente e riproducibilmente studiabile con tecniche non invasive.

Noi abbiamo anche misurato i livelli di MMP-3 nel siero allo scopo di trovare una possibile relazione con il genotipo.

Nessuna significativa associazione è stata evidenziata, anche se la limitata misura dei campioni non permette una adeguata analisi statistica.

In varie condizioni patologiche (cancro, malattie infiammatorie etc.) è possibile trovare quantità maggiori di metalloproteinasi nel sangue.³¹

Tuttavia, un' aumentata produzione locale di MMPs può non essere necessariamente associata con l'aumento dei livelli circolanti, poichè le MMPs sono in grado di legarsi alla matrice connettivale.³²

I nostri dati suggeriscono che i cambiamenti nell'espressione della MMP-3 nella parete vascolare, dovuti al polimorfismo nel promotore del gene, non riflettono i livelli di MMP-3 nel sangue.

L'ipotesi che una ridotta espressione della stromelisina determinata geneticamente, sia associata alla progressione della aterosclerosi è in qualche modo in contrasto con l'opinione corrente che un'aumentata attività negli enzimi che degradano la matrice è una potenziale origine di instabilità della placca.²

Recentemente, Terashima ed altri hanno riscontrato una significativa più alta prevalenza di genotipi 5A/6A + 5A/5A in pazienti con infarto acuto del miocardio confrontati con soggetti di controllo.³³

In questo gruppo tuttavia, la frequenza dell'allele 5A è molto più bassa di quella osservata nella popolazione Europea.

Ulteriori studi sono necessari per chiarire questo punto.

Inoltre, bisogna considerare che la progressione e la rottura della placca sono due processi distinti, che riconoscono differenti momenti e meccanismi patogenetici.³⁴

Si può ipotizzare che uno sbilanciamento nell'espressione della stromelisina-1 nella parete dell'arteria in entrambe le direzioni può avere effetti deleteri, in modo dipendente dallo stadio della lesione ateromasica.

Se da una parte una riduzione nell'attività enzimatica della stromelisina-1 porta all'accumulo di matrice extracellulare e alla progressione dell'aterosclerosi ¹⁵ dall'altra, la sovraespressione della

attività degradante in siti della placca cruciali può provocare la rottura del cappuccio fibroso e l'evento trombotico.³⁵

Il basso numero di soggetti esaminati necessita di un commento.

I soggetti sono stati selezionati in base all'assenza dei maggiori rischi collegati allo sviluppo di malattie coronariche.

Anche se un più largo numero di persone, presumibilmente sane, era stato inizialmente considerato, solo 42 individui soddisfacevano i criteri di arruolamento.

La distribuzione dei genotipi dell'MMP-3, mostra un sufficiente numero di soggetti per ogni gruppo.

In conclusione i nostri studi identificano il polimorfismo del promotore dell'MMP-3 come il maggior determinante genetico dello spessore della parete e della dilatazione del vaso dell'arteria carotide comune in assenza di altri fattori di rischio per l'aterosclerosi.

BIBLIOGRAFIA

1. Cortese C. and Massoud R.
Il laboratorio nelle malattie cardiovascolari.
In: *Medicina di laboratorio*, G. Federici, P.Cipriani, C.Cortese, A.Fusco, P. Ialongo, C. Milani; cap. 9:170-192.
2. Russel Ross
Atherosclerosis-An Inflammatory Disease.
The New England Journal of Medicine 1999; 340(2): 115-126.
3. Catapano A. L., Manzato E., Poli A., Volpe M.
L'endotelio vascolare: non solo una barriera.
In: *Endotelio e Aterosclerosi – Fisiopatologia e terapia*.
Edizioni Medico-Scientifiche- Pavia 1999
4. Auteri A., Bova G., Pasqui AL. – Immunità e aterogenesi
In: *Flogosi, immunità e aterosclerosi: i fatti e le idee*. Verduci editore,
Roma 1998; 1-39
5. Francesco Russo
Controllo della progressione della placca aterosclerotica mediante
ACE-inibitori ed antagonisti AT-1.
In: *Le complicanze della placca aterosclerotica: dalla fisiopatologia
alla clinica*.
Russo F., Marci M., Raffa S.-Casa editrice Scientifica Internazionale,
Roma 1998; 73-89
6. Ross R.
The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s.
Nature 1993; 362: 801-809
7. Ravn HB., Kristensen SD. And Falk E.
Role of thrombosis and hematoma in atherosclerosis progression.
In: *Atherosclerosis XI. Proceedings of the XIth International
Symposium on Atherosclerosis, held in Paris, France, on 5-9 October
1997* – Editors: Jacotot B., Mathè D., Fruchart J.-C. 1998
8. Dollery C.M., McEwan J.R., Henney A.M.
Matrix metalloproteinases and cardiovascular disease.
Circulation Research.. 1995; 77: 863
9. Nagase H.
Activation mechanisms of matrix metalloproteinases.
Biol Chem. 1997; 378: 151-160

- 10.** Parsons S.L., Watson S.A., Brown P.D., Collins H.M.
Matrix metalloproteinases.
British Journal of Surgery 1997; 84: 160-166
- 11.** Nagase H. and Woessner J.F.
Matrix metalloproteinases.
Journal of Biological Chemistry 1999; 274: 31: 21491-21494
- 12.** Slawomir M. Wojtowicz-Praga, Dicckson R.B., Hawkins M.J.
Matrix metalloproteinases inhibitors.
Investigational New Drugs 1997; 15: 61-75
- 13.** Murate T., Hayakawa
Multiple functions of tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): new aspects in hematopoiesis.
Platelets 1999; 10: 5-16
- 14.** Matrisian LM.
Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling.
Trends Genet. 1990; 6: 121-125
- 15.** Ye S., Watts GF., Mandalia S., Humphries SE., Henney AM.
Preliminary report: genetic variation in the human stromelysin promoter is associated with progression of coronary atherosclerosis.
Br. Heart J. 1995; 73: 209-215
- 16.** Ye S., Eriksson P., Hamsten A., Kirkinen M., Humphries SE., Henney AM.
Progression of coronary atherosclerosis is associated with a common genetic variant of the human stromelysin-1 promoter which results in reduced gene expression.
J. Biol. Chem. 1996; 271: 13055-13060
- 17.** Henney AM., Wakeley PR., Davies MJ., Foster K., Hembry R., Murphy G., and Humphries S.
Localization of stromelysin gene expression in atherosclerotic plaques by in situ hybridization.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1991; 88: 8154-8158.
- 18.** Galis ZS., Sukhova GK., Lark M., Libby P.
Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques.
J. Clin. Invest. 1994; 94: 2493-2503

- 19.** Rauramaa R., Vaisanen S.B., Luong L., Schmidt-Trucksass A., Penttila I.M., Bouchard C., Toyry J., Humphries S.E.
Stromelysin-1 and interleukin-6 gene promoter polymorphisms are determinants of asymptomatic carotid artery atherosclerosis.
Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol 200; 20: 2657-2662
- 20.** Sambrook J. Fritsch EF, Maniatis T.
Molecular cloning: a laboratory manual. All Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- 21.** Giacca M., Diviacco S., D'Adda d Fagagna F.
Guida critica all'utilizzo della polimerase chain reaction in diagnostica clinica.
Giorn. It. Chim. Clin. 1993; 18: 148-165
- 22.** Steinke W., Els T., Hennerici M.,
Compensatory carotid artery dilation in atherosclerosis.
Circulation 1994; 89: 2578-2581
- 23.** Glagov S., Weisenberg E., Zarins CK., Stankunavicius R., Kolettis GJ.
Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries.
N. Engl. J. Med. 1987; 316: 1371-11375
- 24.** Crouse JR., Goldbourt U., Evans G., Pinsky J., Sharrett AR., Sorlie P., Riley W., Heiss G., for the ARIC Investigators.
Risk factors and segment-specific carotid arterial enlargement in the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) cohort.
Stroke 1996; 27: 69-75
- 25.** Bonithon-Kopp C., Touboul PJ., Berr C., Magne C., Ducimetière P.
Factors of carotid arterial enlargement in a population aged 59 to 71 years: the EVA Study.
Stroke 1996; 27:654-660
- 26.** Irace C., Carallo C., Crescenzo A., Motti C., De Franceschi MS., Mattioli PL., Gnasso A.
NIDDM is associated with lower wall shear stress of the common carotid artery.
Diabetes 1999; 48: 193-197
- 27.** Gnasso A., Irace C., Carallo C., De Franceschi MS., Motti C., Mattioli PL., Pujia A.
In vivo association between low wall shear stress and plaque in subjects with asymmetrical carotid atherosclerosis.

Stroke 1997; 28: 993-998

- 28.** O' Leary DH., Polak JF., Kronmal RA., Manolio TA., Burke GL., Wolfson SK., for the Cardiovascular Health Study Collaborative Research Group.
Carotid-artery intima and media thickness as a risk factor for myocardial infarction and stroke in older adults.
N. Engl. J. Med. 1999; 340: 14-22
- 29.** De Maat MPM, Jukema W, Ye S, Zwinderman AH, Moghaddam PH, Beekman M, Kastelein JJP, Van Boven AJ, Brusckhe AVG, Humphries SE, Kluft C, Henney AM.
Effect of stromelysin-1 promoter on efficacy of pravastatin in coronary atherosclerosis and restenosis.
Am. J. Cardiol. 1999; 83: 852-856
- 30.** Humphries SE, Luong LA, Talmud PJ, Frick MH, Kesaniemi YA, Pasternack A, Taskinen MR, Syvanne M.
The 5A/6A polymorphism in the promoter of the stromelysin-1 (MMP-3) gene predicts progression of angiographically determined coronary artery disease in men in the LOCAT gemfibrozil study.
Atherosclerosis 1998; 139: 49-56
- 31.** Zucker S, Hymowitz M, Conner C, Zarrabi HM, Hurewitz AN, Matrisian L, Boyd D, Nicolson G, Montana S.
Measurement of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in blood and tissue.
Ann. N. Y. Acad. Sci 1999; 878: 212-227
- 32.** Moscatelli D, Rifkin DB.
Membrane and matrix localization of proteinases: a common theme in tumor invasion and angiogenesis.
Biochim. Biophys. Acta 1988; 948: 67-84
- 33.** Terashima M, Akita H, Kanazawa K, Inoue N, Yamada S, Ito K, Matsuda Y, Takai E, Iwai C, Kurogane H, Yoshida Y, Yokoyama M.
Stromelysin promoter 5A/6A polymorphism is associated with Acute myocardial infarction.
Circulation 1999; 99: 2717-2719
- 34.** Falk E, Shah PK, Fuster V.
Pathogenesis of plaque disruption. In: Fuster V, Ross R, Topol EJ, eds.
Atherosclerosis and Coronary Artery Disease. Philadelphia, Pa: Lippincott-Raven; 1996: 2: 492-510

- 35.** Libby P, Geng YJ, Aikawa M, Schonbeck U, Mach F, Clinton SK, Sukhova GK, Lee RT.
Macrophage and atherosclerosis plaque stability.
Curr. Opin. Lipidol. 1996; 7: 330-335
- 36.** Stary HC.
Lesioni aterosclerotiche in giovani.
G. Mal. Cardiol. 1990; 20: 1056