



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI ROMA
"TOR VERGATA"**

FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA

DOTTORATO DI RICERCA IN
"FISIOPATOLOGIA SPERIMENTALE"
XXII CICLO

**Il ruolo della modulazione del sistema immunitario
in seguito alla rottura della placca aterosclerotica durante IMA**

Dottorando: Dr. Pasquale Ceravolo

A.A. 2009/2010

Docente Guida/Tutor: Chiar.mo Prof. Claudio Cortese

Coordinatore: Chiar.mo Prof. Francesco Romeo

Indice

1. Aterosclerosi	3
2. Patogenesi dell'aterosclerosi	11
<i>2.1 Disfunzione endoteliale ed alterazioni della muscolatura liscia vasale.....</i>	<i>11</i>
<i>2.2 Il recettore per le ox-LDL come mediatore nella genesi del danno vascolare.....</i>	<i>18</i>
<i>2.3 Struttura e funzione del recettore per le ox-LDL: LOX-1.....</i>	<i>21</i>
<i>2.4 Effetti biologici delle LDL ossidate (ox-LDL).....</i>	<i>23</i>
3. Sistema immunitario ed aterosclerosi	25
4. Sindromi coronariche acute	35
5. Intervento coronarico percutaneo.....	41
6. Iperplasia neointimale nella restenosi.....	44
7. Obbiettivi della tesi	48
<i>7.1 Materiali, metodi e arruolamento pazienti.....</i>	<i>48</i>
<i>7.2 Coronarografia e PTCA.....</i>	<i>50</i>
<i>7.3 Sistema di tromboaspirazione</i>	<i>50</i>
<i>7.4 Citofluorimetro.....</i>	<i>51</i>
<i>7.5 Analisi statistica</i>	<i>51</i>
8. Risultati	52
9. Discussione.....	55
10. Bibliografia	61

1. ATEROSCLEROSI

L'aterosclerosi è una malattia infiammatoria cronica delle arterie di grande e medio calibro correlata patogeneticamente ai fattori di rischio cardiovascolare: diabete mellito, ipertensione, ipercolesterolemia, obesità e stile di vita (fumo, inattività fisica, abitudini alimentari).

Anatomicamente la lesione caratteristica dell'aterosclerosi è l'ateroma o placca aterosclerotica, ossia un ispessimento dell'intima dovuto principalmente all'accumulo di materiale lipidico e a proliferazione del tessuto connettivo. Il termine aterosclerosi è stato proposto da *Marchand* nel 1904 per sottolineare la presenza dell'ateroma (dal greco "athere", che significa "pappa"), ad indicare il materiale grasso, poltaceo, contenuto nelle placche. Le lesioni evolvono nel tempo, iniziando dalle strie lipidiche che poi tendono a divenire delle vere e proprie placche aterosclerotiche (*Figura 1*).

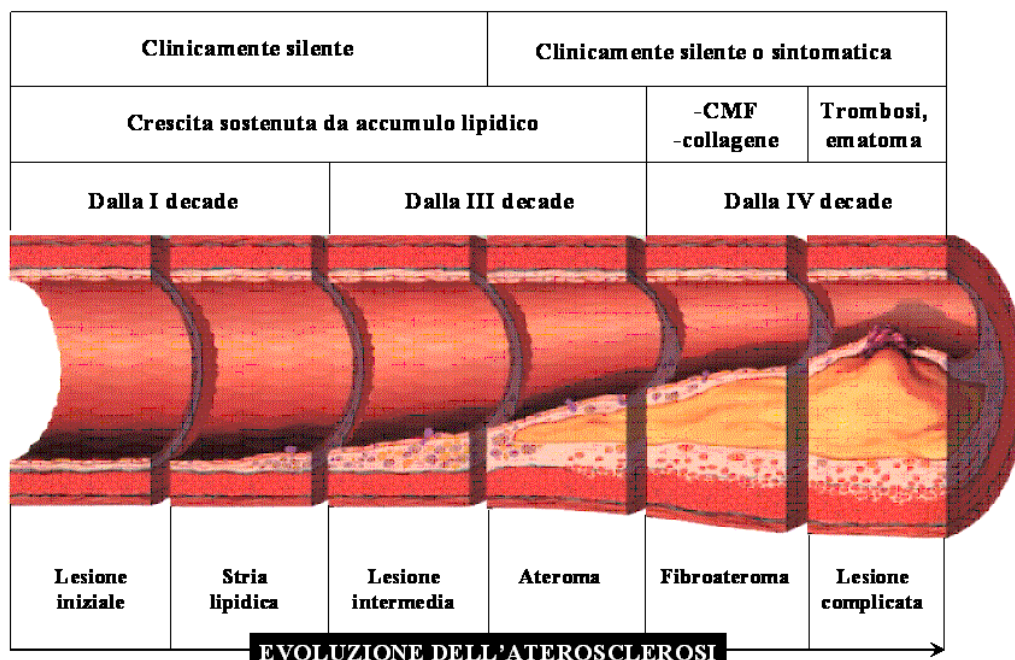


Figura 1 - Evoluzione dell' Aterosclerosi.

Queste nelle fasi avanzate possono restringere il lume arterioso provocando stenosi, oppure ulcerarsi e complicarsi con una trombosi sovrapposta, che può portare ad una occlusione dell'arteria.

Per quanto i fattori di rischio generali e sistemici che conferiscono una predisposizione allo sviluppo di questa malattia siano molteplici, essa colpisce di preferenza alcune regioni del circolo con manifestazioni cliniche diverse a seconda del letto vascolare colpito.

L'aterosclerosi delle arterie coronarie determina *angina pectoris* ed infarto del miocardio, mentre, nel sistema nervoso centrale determina di frequente ischemia cerebrale transitoria ed ictus.

La patologia può colpire anche l'arteria mesenterica (distretto splancnico) provocando *angina abdominis* ed infarto intestinale e, qualora interessi il rene, determina stenosi e occlusione dell'arteria renale.

Le lesioni aterosclerotiche si localizzano frequentemente nei punti di biforcazione delle arterie, punti in cui il flusso ematico passa da un moto lineare ad uno turbolento.

L'Angioplastica transluminale coronarica percutanea (PTCA), sin dal momento dalla sua prima applicazione, avvenuta verso la metà degli anni '70, ha rivoluzionato il trattamento della malattia aterosclerotica coronarica. La PTCA rappresenta la piu' diffusa tecnica di rivascolarizzazione miocardica: in tutto il mondo ogni anno, circa un milione di pazienti affetti da cardiopatia ischemica sintomatica vengono sottoposti a tale procedura interventistica. In Italia nel 2008 sono state eseguite oltre 320.000 coronarografie ed oltre 130.000 PTCA (*GISE 2008*). Anche il bypass aorto-coronarico rappresenta l'approccio chirurgico ormai standardizzato da anni nel trattamento di vasculopatie coronariche occlusive su base ateromasica non suscettibili a trattamento percutaneo, ciò nonostante circa il 50% dei bypass si occlude entro 5-10

anni dall'esecuzione dell'intervento a causa di fenomeni di iperplasia intimale e di un'accelerata aterogenesi all'interno del bypass stesso.

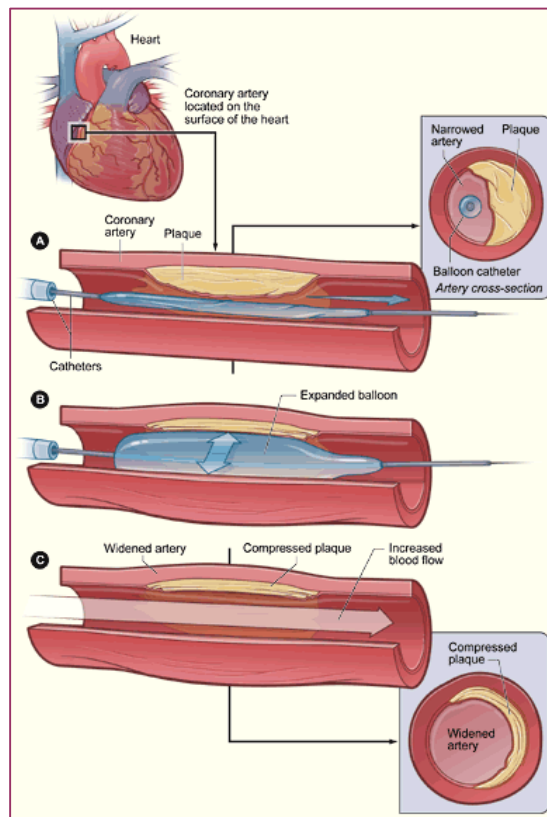


Figura 2 - Inserzione del catetere palloncino - Il catetere a palloncino viene inserito nell'arteria ostruita e gonfiato per ripristinare la pervietà vasale.

Il limite maggiore della PTCA (Indolfi et al., 2000) continua ad essere la restenosi che si verifica in circa il 30-45% dei pazienti trattati (McBride, 1988; Virmani et al., 1994). La lesione che si verifica dopo PTCA è indotta a livello del rivestimento endoteliale dell'intima mediante introduzione di cateteri endoarteriosi alla cui estremità viene gonfiato un palloncino fino ad una pressione predeterminata per periodi di tempo variabili (Figura 2).

Studi effettuati con le metodiche dell'IVUS (Intravascular Ultrasound) (Figura 3) e dell'OCT (Optical coherence tomography) (Figura 4) hanno contribuito a chiarire le caratteristiche morfo-funzionali sia della placca che della restenosi dopo trattamento con PTCA.

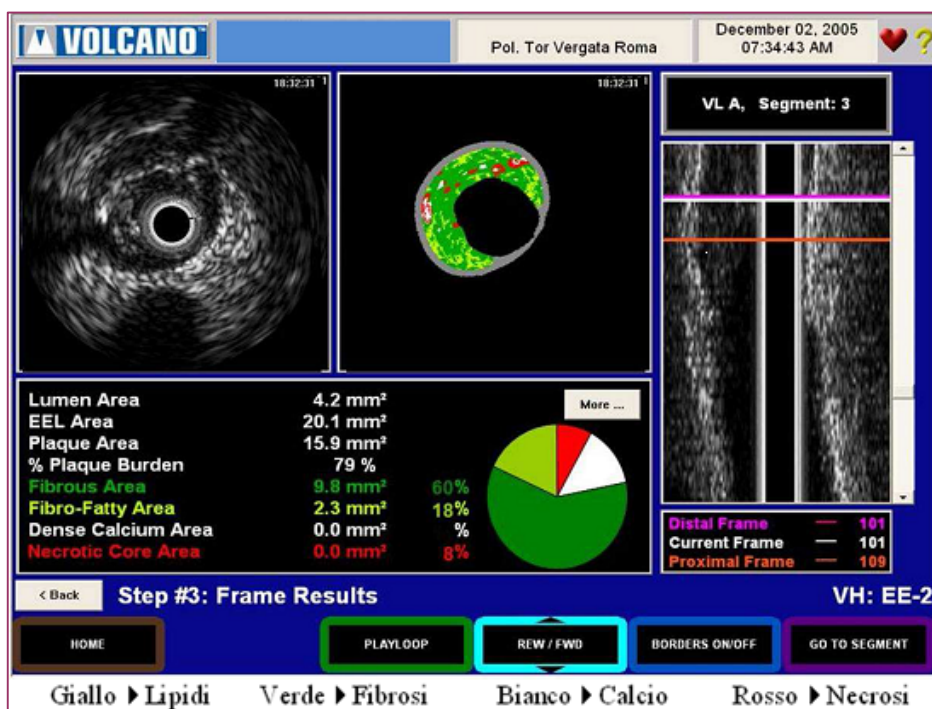


Figura 3 - Immagine ultrasonografica intravascolare (IVUS).

In particolare, il danno alla parete del vaso coronarico prodotto dal catetere a palloncino determina tre eventi principali: la distensione meccanica, la denudazione endoteliale e la formazione precoce di un trombo piastrinico (Chwartz *et al.*, 1995; Ross, 1993). La denudazione endoteliale, innesca una serie di eventi a cui contribuiscono in varie maniere ormoni vasoattivi (angiotensina II, serotonina, endotelina e bradichinina), fattori di crescita (VEGF, PDGF, EGF, TGF α - β , β FGF), cellule ematiche (leucociti, macrofagi, linfociti), lipidi (colesterolo, LDL-ossidate) (Speir *et al.*, 1994).

Tutti questi fattori determinano l'attivazione delle cellule muscolari lisce (SMCs) a cui segue l'espressione di vari oncogeni come *c-myc*, *c-fos*, *c-jun*, *H-ras* (Indolfi *et al.* 2000); le SMCs proliferano e migrano nella tonaca intima dove, accumulandosi, determinano la formazione di una nuova struttura denominata "neointima" (Clowes *et al.*, 1983; Kuntz *et al.*, 1993). Inoltre, sono state osservate delle correlazioni tra la

proliferazione neointimale e il grado dell'infiammazione nella zona dell'intervento.

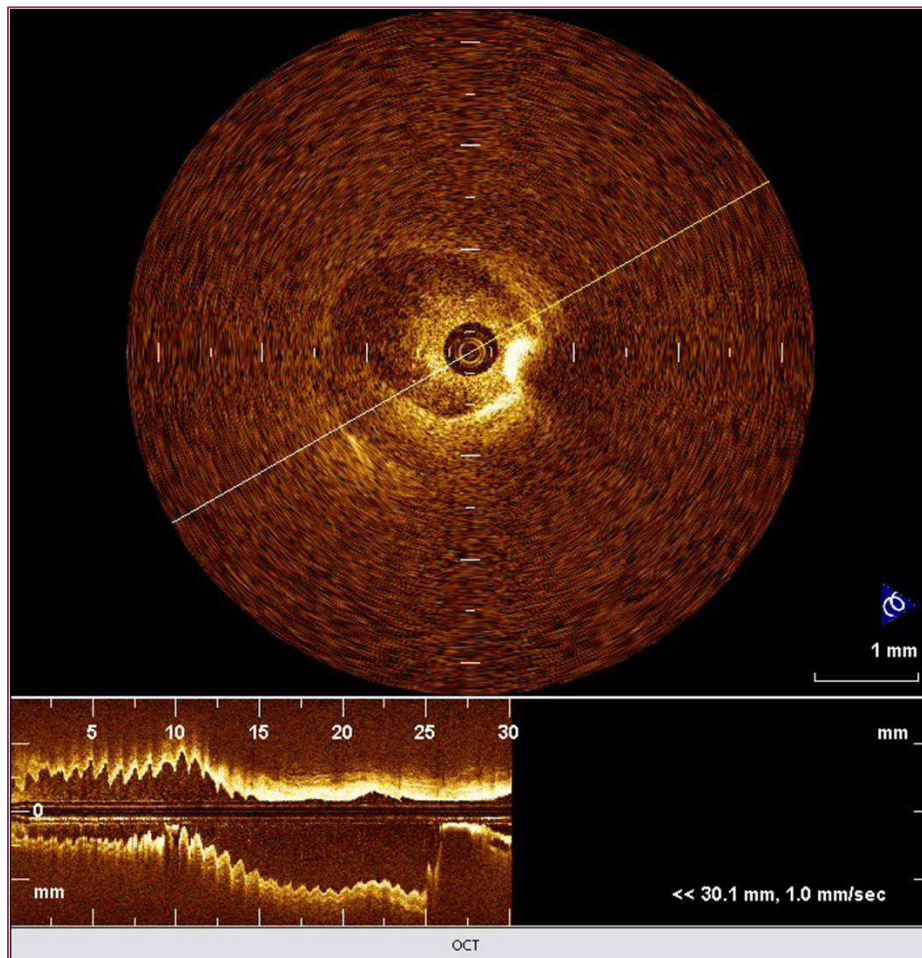


Figura 4 - Immagine Optical Coherence Tomography (OCT).

Negli ultimi anni, l'impiego nei laboratori di emodinamica degli stent, inizialmente dei Bare Metal Stent (BMS) e successivamente dei Drug Eluting Stent (DES), ha consentito di ridurre drasticamente le complicanze acute dell'angioplastica legate al *recoil* e alla chiusura acuta del vaso (Roubin et al., 1992; Indolfi et al., 1998; Fischman et al., 1994; Serruys et al., 1994); tuttavia, rimane ancora da risolvere il problema dell'iperplasia neointimale e quindi della proliferazione delle SMC le quali, rappresentano i principali responsabili della restenosi dopo impianto di stent (Kuntz et al., 1992; Gordon et al., 1993; Dussaillant et al., 1995; Hoffmann et al., 1996; Mintz et al., 1997).

Sebbene i meccanismi molecolari alla base della proliferazione delle cellule muscolari lisce non siano stati ancora completamente chiariti, è ormai noto che un'alterazione dei meccanismi coinvolti nella regolazione della crescita cellulare sia responsabile della proliferazione neointimale. Molte evidenze dimostrano che le fibrocellule muscolari lisce, presenti a livello intimale, costituiscono una distinta popolazione cellulare con alterate caratteristiche fenotipiche con un'aumentata propensione a proliferare, migrare ed elaborare una maggiore quantità di proteine della matrice extracellulare. Le SMCs mostrano un'alterata espressione di fattori di trascrizione, fattori di crescita, geni che regolano l'apoptosi, integrine, proteasi e proteine della matrice (*Ross, 1995; Schwartz et al., 1995; Dzau, 1994; Gibbons, 1994*).

La PTCA, pur essendo una tecnica importante utilizzata per il trattamento della malattia aterosclerotica, provoca lesioni dell'endotelio vascolare, denuda la parete arteriosa di questo importante strato cellulare, che è coinvolto nel controllo del processo proliferativo e chemiotattico delle cellule muscolari, oltre che nel controllo del tono vasomotorio e dei fenomeni coagulativi.

Si è osservato come le cellule endoteliali possono elaborare e rilasciare fattori, tra i quali il monossido di azoto (NO), capaci non solo di inibire la migrazione e la proliferazione di fibrocellule muscolari ma anche di controllare la formazione di trombi e la sintesi di proteine della matrice. L'insorgenza dell'iperplasia neointimale, al pari della lesione ateromasica, sembra essere, almeno in parte, determinata da cause di natura infiammatoria immunologica e l'interazione tra stimolo (inserzione dello stent o la dilatazione del palloncino) ed intensità della reazione individuale, in larga misura determinata geneticamente, gioca un ruolo determinante nella modulazione della risposta (ricrescita) neointimale (*Biasucci et al., 1999*).

Lo stimolo iniziale responsabile della ricrescita neointimale appare, per molti aspetti, non dissimile da quello che sta alla base di una reazione da corpo estraneo. Infatti, immediatamente dopo aver trattato un paziente con catetere a palloncino o dopo aver applicato uno stent coronarico è possibile osservare l'afflusso di numerosi elementi cellulari di tipo infiammatorio. L'effetto chemiotattico opsonizzante è determinato dalla produzione e liberazione locale da parte dei macrofagi attivati di molecole infiammatorie quali l'IL-1, l'IL-6 e numerosi fattori di crescita miocellulare. Recenti osservazioni sperimentali, suggeriscono che le cellule coinvolte nel fenomeno dell'iperplasia neointimale non sono necessariamente quelle "autoctone", già presenti a livello della parete coronarica, ma potrebbero avere un'origine "esogena" e raggiungere l'area coronaria per via ematica. Queste cellule avrebbero caratteristiche staminali (*vascular smooth muscle cell progenitor*) e vengono richiamate nella sede dell'impianto dalla produzione e liberazione di stimoli opsonizzanti e da svariati fattori di crescita cellulare. Negli ultimi 15 anni una serie di evidenze cliniche hanno permesso di identificare nell'infiammazione, un importante fattore di rischio in numerose patologie cardiovascolari.

Il ruolo svolto dall'infiammazione durante tali processi patologici viene confermato dal fatto che, in una larga percentuale di pazienti, lo stato infiammatorio sistemico è pre-esistente all'evento ischemico e non si manifesta dopo l'insorgenza di quest'ultimo (*Berliner, 1995; Davies, 1990; Biasucci et al., 2000*).

Si è osservato che l'induzione dell'espressione di mutanti di p21 *ras* o del gene *rb* è capace di inibire la proliferazione cellulare riducendo in tal modo la formazione di lesioni neointimali in sedi di danno vascolare (*Chang et al., 1995; Indolfi et al., 1995*); mentre l'impiego di farmaci citostatici come la rapamicina ha ridotto drasticamente la formazione di

neointima (*Gregory et al., 1995; Marx et al., 1995*) tanto da essere impiegati come farmaci nei DES.

L'uso degli stent medicati con farmaci anti-proliferativi è attualmente una realtà clinica capace di prevenire l'elevato grado di restenosi dopo l'angioplastica. A ciò possono certamente aggiungersi strategie terapeutiche sperimentali rivolte nei confronti di recettori di adesione come le β_3 integrine coinvolte nella formazione di trombi e nell'interazione delle cellule con proteine della matrice (*Topol, 1995*). Nonostante siano state tentate molte strategie farmacologiche, nessuna terapia è a tutt'oggi totalmente efficace per la prevenzione della restenosi in seguito ad angioplastica o impianto di stent.

2. PATOGENESI DELL'ATEROSCLEROSI

2.1 Disfunzione endoteliale ed alterazioni della muscolatura liscia vasale.

La normale funzione delle cellule endoteliali è fondamentale nel mantenimento dell'omeostasi del sistema vascolare. Nel corso degli ultimi 20 anni è apparso evidente che malattie come l'aterosclerosi sono manifestazioni della disfunzione endoteliale. L'endotelio è un tessuto strutturalmente semplice ma funzionalmente complesso; è in grado di secernere sostanze, modula il tono vascolare, contribuisce al mantenimento delle proprietà antitrombotiche del vaso regolando la coagulazione, la fibrinolisi e l'aggregazione piastrinica; esercita un effetto barriera contro il passaggio indiscriminato di costituenti del sangue all'interno della parete arteriosa; controlla la proliferazione delle cellule muscolari lisce. Svolge inoltre un ruolo determinante in molti processi fisiologici quali il mantenimento della fluidità del sangue, il trasporto di acqua e di soluti, la regolazione dei liquidi plasmatici e la partecipazione nelle reazioni infiammatorie ed immunoallergiche, controllando l'adesione e l'infiltrazione dei leucociti.

Per la sua strategica collocazione anatomica costituisce una interfaccia biologicamente rilevante tra il compartimento intra ed extravascolare. È noto come le cellule endoteliali producano sostanze responsabili sia del rilascio che della vasocostrizione.

Tra le sostanze vasodilatatrici di origine endoteliale l'ossido nitrico o monossido di azoto (NO) risulta essere il più importante; è sintetizzato a partire dalla L-arginina ad opera delle NO sintetasi. Oltre a determinare il rilascio vascolare, (contrastando l'azione della endotelina-1 e della angiotensina II), è un potente antiaggregante piastrinico, un inibitore della proliferazione e della migrazione delle SMC, dell'adesione dei monociti,

dell'espressione delle molecole di adesione e della sintesi dell'endotelina, tutti effetti coinvolti nella patogenesi della trombosi e dell'aterosclerosi. L'ossido nitrico è considerato un effettore paracrino efficace solo in prossimità della cellula che lo produce. Una ridotta produzione di NO si riscontra in patologie vascolari come diabete, aterosclerosi ed ipertensione arteriosa.

In condizioni fisiologiche l'endotelio produce l'endotelina (ET), potente sostanza vasocostrittrice. E' in grado di stimolare le cellule muscolari lisce a proliferare, facilita gli eventi trombotici o proaterosclerotici, induce attivazione delle piastrine e dei leucociti. Si conoscono tre isoforme di ET: l'ET-1, l'ET-2 e l'ET-3, ma solo l'ET-1 è prodotta dalle cellule endoteliali, oltre che dalle SMC. La produzione di ET può essere stimolata da condizioni come l'ipossia e da numerose sostanze come ox-LDL, arginina, vasopressina, insulina, angiotensina II e adrenalina. Un aumento della produzione di ET si riscontra in patologie come diabete ed aterosclerosi diffusa; inoltre evidenze sperimentali hanno dimostrato come lo stimolo meccanico dell'angioplastica aumenti la sintesi di ET1 e il sistema delle ET rimanga attivato, in seguito ad angioplastica, per diverse settimane (*Malatino, et al, 1993*).

Le cellule endoteliali, infatti, producono sostanze ad azione vasocostrittrice anche in presenza di patologie o di fattori di rischio cardiovascolare. Un altro vasodilatatore prodotto dall'endotelio è la prostaciclina; è una prostaglandina capace anche di inibire l'adesione e l'aggregazione piastrinica.

Le attività antitrombotiche sono assicurate dal NO, dalla prostaciclina, dalla trombomodulina, dagli eparan-solfato e dall'inaccessibilità alle piastrine delle proteine della matrice sottostante l'endotelio. Le attività pro-fibrinolitiche sono assicurate da t-PA e u-PA.

In condizioni patologiche, l'endotelio cambia le sue caratteristiche diventando suscettibile al danno, promuovendo infiammazione e trombosi, perdendo il controllo sulla permeabilità vascolare e sull'adesione e sull'infiltrazione dei leucociti circolanti (*primum movens del processo aterosclerotico*), inducendo molecole di adesione, producendo fattori di crescita e favorendo la vasocostrizione attraverso la produzione di sostanze definite EDCF (*endothelium derived contracting factors*) (Anderson, et al, 1995).

L'acquisizione di un fenotipo endoteliale patologico nell'uomo si verifica prima della manifestazione clinica della malattia e si associa alla presenza dei fattori di rischio cardiovascolari tradizionali come il fumo di sigaretta, l'ipercolesterolemia, l'ipertensione, il diabete mellito e agli altri fattori di rischio emergenti come l'obesità e l'iperomocisteinemia. Altri mediatori in grado di indurre un fenotipo "pro trombotico" nelle cellule endoteliali sono l'endotossina batterica e le citochine infiammatorie (attivano l'endotelio e lo spingono a produrre la tromboplastina, potente attivatore della coagulazione).

Perciò è evidente il ruolo della centralità dell'endotelio nella fisiopatologia di alcune patologie umane quali l'aterosclerosi vascolare, l'ipertensione arteriosa (ipertono/vasocostrizione), l'insufficienza cardiaca (l'endotelio endocardico é coinvolto nella modulazione della funzione ventricolare sinistra), il diabete (l'iperglicemia gioca un ruolo importante nella disfunzione endoteliale: micro e macroangiopatia) e la disfunzione erettile (Linseman, et al, 1995). Quindi l'endotelio è ben lungi dall'essere uno strato protettivo passivo.

Il cambiamento delle caratteristiche del tessuto é definito "attivazione endoteliale" ed il risultato è una risposta funzionale diversa se non assolutamente opposta a quella dell'endotelio sano; ciò è dimostrato dal comportamento al test dell'acetilcolina, la cui somministrazione induce

vasodilatazione in presenza di endotelio sano ed al contrario vasocostrizione in presenza di endotelio danneggiato.

La corretta vasomodulazione, l'inibizione dell'adesione piastrinica e monocitaria, la trombolisi locale, sono i meccanismi mediante i quali un'intatta superficie endoteliale esercita un costante effetto protettivo sulla circolazione coronarica.

Risulta, quindi, chiaro come una perdita di queste caratteristiche (alterazione del tono vasale ed incremento delle capacità adesive delle cellule endoteliali), in parte dovute ad alterata disponibilità di NO, rappresenti il primo passo verso lo sviluppo dell'aterosclerosi (*Cacheris, et al, 1991*).

Ad esempio, durante il processo aterosclerotico, le LDL contenute nella circolazione sistemica, s'infiltrano tra l'endotelio e lo strato sottostante. L'ipercolesterolemia e gli altri fattori di rischio provocano la disfunzione endoteliale, caratterizzata da una maggiore permeabilità alle lipoproteine e dall'espressione di specifiche glicoproteine di adesione di superficie.

Numerosi studi dimostrano che le LDL ossidate, accumulandosi all'interno della parete arteriosa, hanno un ruolo importante nel denudamento endoteliale, permettendo alle piastrine e ai monociti di venire in contatto con il collagene ed interagendo con uno specifico recettore delle piastrine (glicoproteina Ia) ne induce l'aggregazione; inoltre questa perdita o comunque danno delle cellule endoteliali ne abolisce localmente le attività anti-adesiva, anticoagulante e antiaggregante piastrinica.

Tutto ciò si traduce in adesione ed infiltrazione di monociti nell'intima, adesione ed aggregazione piastrinica, rilascio dall'endotelio rigenerante di fattori mitogeni (*Figura 5*).

Inoltre le ox-LDL up-regolano molecole di adesione endoteliale come VCAM-1 e ICAM-1 e inducono l'adesione dei monociti. Quindi l'attivazione flogogena dell'endotelio presente in vivo nell'

ipercolesterolemia è verosimilmente dovuta alle ox-LDL e ad altri prodotti intermedi dell'ossidazione.

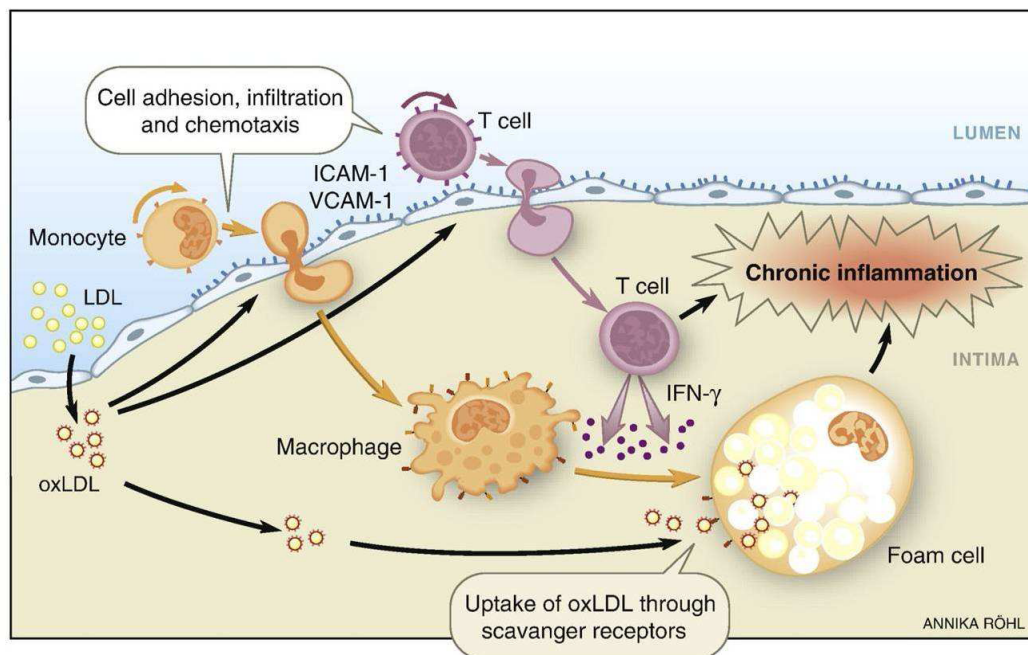


Figura 5 - Inizio del processo aterosclerotico - LDL infiltrano la parete delle arterie e subiscono modificazioni da reazioni ossidative ed enzimatiche. Le LDL modificate (ox-LDL) inducono l'espressione di molecole di adesione (VCAM-1 e ICAM-1) sulla superficie endoteliale. I monociti migrano all'interno del subendotelio e si differenziano in macrofagi che evolvono in "foam cells" dopo fagocitosi di ox-LDL. I linfociti T, allo stesso tempo, si attivano e producono mediatori come IFN- γ , che amplificano notevolmente la risposta infiammatoria e contribuiscono all'aterogenesi.

In aggiunta all'ipercolesterolemia, anche l'ipertrigliceridemia e la riduzione del colesterolo HDL potrebbero concorrere ad attivare l'endotelio in modo pro-aterogenico.

Le VLDL, infatti, sono in grado di attivare NF- κ B in cellule endoteliali e favoriscono l'adesione dei neutrofili alle cellule endoteliali vascolari, mentre le lipoproteine HDL sono in grado di inibire l'up-regolazione delle adesine indotta da varie citochine.

Tutti i fattori di rischio associati al processo ateromasico come il diabete (l'aumento dell'attività ossidativa potrebbe essere correlata con lo stress ossidativo indotto dai prodotti terminali di glicazione), l'iperlipidemia (patologia in cui si verifica la ritenzione e l'ossidazione di LDL in ox-LDL), l'ipertensione ed il fumo di sigaretta inducono una sorta di "stress

ossidativo" per la cellula endoteliale, effetto responsabile della alterazione di tali cellule (*Thibert, et al, 1992*).

Anche i fenomeni infiammatori potrebbero svolgere un ruolo importante nello sviluppo del processo aterosclerotico coronarico e contribuire, in particolare, alla formazione neointimale dopo danno endoteliali.

Studi recenti hanno dimostrato un coinvolgimento diretto del processo infiammatorio nella patogenesi delle SCA, in cui l'entità della reazione infiammatoria e la prognosi sembrano essere condizionate dall'intensità della risposta individuale a potenziali stimoli ambientali infiammatori.

Nelle placche aterosclerotiche dell'uomo sia precoci che avanzate sono stati identificati linfociti T capaci di secernere IFN- γ . Quest'ultimo nonostante abbia la capacità di ridurre l'espressione del recettore scavenger sui monociti e di inibire la proliferazione delle SMC, ha un'azione nel complesso pro-aterogena, poiché induce la produzione di citochine infiammatorie da parte dei macrofagi e l'espressione di antigeni di istocompatibilità di classe II (MHCII).

Altre componenti del sistema immunitario come immunoglobuline e fattori attivati del complemento sono presenti nelle lesioni aterosclerotiche. Tra le citochine prodotte dalle cellule associate all'ateroma un ruolo importante hanno IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, TNF, IFN- γ . L'IL-1 svolge un ruolo importante nella regolazione dei meccanismi immuno-infiammatori ed è in grado di regolare la mitogenesi delle cellule endoteliali e SMC, la produzione di matrice extracellulare, la risposta pro-trombotica delle cellule endoteliali, il processo di adesione dei leucociti e la permeabilità vascolare; pertanto, essa svolge un ruolo chiave nella cascata di mediatori che favoriscono la restenosi dopo PTCA.

Il suo antagonista recettoriale (IL-1Ra) è spesso misurato come un indice di severità del processo infiammatorio. IL-1Ra e IL-1 sono sicuramente

coinvolti nella regolazione del processo infiammatorio a livello della parete vasale.

Le cellule endoteliali partecipano attivamente allo sviluppo delle reazioni infiammatorie e si può affermare con certezza che l'infiammazione rappresenta uno dei meccanismi centrali nell'insorgenza e nella progressione dell'aterosclerosi e della cardiopatia ischemica (*Biasucci, et al, 1999*).

Fattori vasoattivi che promuovono l'ipertensione, come l'angiotensina II, inducono anche la sintesi dei ROS e le differenze nella risposta vascolare agli stress ossidativi potrebbero contribuire alla suscettibilità genetica dell'aterosclerosi (*Liao, et al, 1994*). L'alterazione dello stato ossidoreducitivo delle cellule endoteliali è accompagnato da un incremento delle capacità adesive di tali cellule, in quanto i ROS possono funzionare da mediatori endocellulari, capaci di mediare l'incremento dell'attività del fattore di trascrizione NF-κB.

L'aumento di tale attività, a sua volta, induce un coordinato fenomeno di up-regulation di recettori di adesione come VCAM-1 e di chemochine come MCP-1 (*Collins, et al, 1995*). Anche l'alterazione della capacità vasodilatatrice dell'endotelio riflette un aumento dei ROS capaci di aumentare il catabolismo del NO (EDRF). Tra l'altro, l'NO sembra essere capace di inibire la crescita e la migrazione delle fibrocellule muscolari lisce, l'attività di NF-κB e l'espressione di VCAM-1 e MPC-1.

Quindi, tale alterazione fornirebbe un legame tra l'iperlipidemia, la disfunzione endoteliale, il sistema immunitario e la formazione di lesioni aterosclerotiche. Nelle sedi di una disfunzione o rimozione endoteliale, le piastrine aderiscono alla parete, causando contrazione per il rilascio di trombossano II e serotonina e stimolano la proliferazione e la migrazione di cellule muscolari lisce, attraverso il rilascio di un fattore di crescita (PDGF). Indubbiamente, recenti studi suggeriscono che una riduzione nel

processo di morte programmata potrebbe essere implicata in processi patologici come l'aterosclerosi. Parecchie molecole, precedentemente identificate come "fattori di crescita" sembrano funzionare anche da fattori antiapoptotici (esempio: PDGF ed angiotensina II favoriscono la sopravvivenza di fibrocellule muscolari lisce oltre a stimolarne la crescita) (*Bennet, et al, 1995*).

Strategie terapeutiche che inducono l'espressione di fattori pro apoptotici o che inducano down-regulation dei fattori antiapoptotici potrebbero rappresentare un' ulteriore opportunità di trattamento nell' aterosclerosi. Tra i fattori di crescita coinvolti nella disfunzione endoteliale, notevole importanza sembra assumere il VEGF (*fattore di crescita dell'endotelio vascolare*), un potente fattore angiogenetico implicato sia nei fenomeni di rivascolarizzazione fisiologica (per esempio dopo un fenomeno ischemico) che in quelli di tipo patologico (per esempio il fenomeno della restenosi dopo PTCA).

2.2 Il recettore per le ox LDL come mediatore nella genesi del danno vascolare.

Dati sperimentali e clinici dimostrano oramai con certezza che elevate concentrazioni plasmatiche di colesterolo totale, colesterolo LDL, alterazioni del rapporto APO A1/APO B si associano ad alterazioni della funzione endoteliale indipendentemente dalla coesistenza di coronaropatia o altro danno vascolare. Alcune modificazioni nella struttura lipoproteica, quali l'ossidazione delle LDL, possono agire sinergicamente con l'ipercolesterolemia nel danneggiare la funzione dell'endotelio. Di contro, le lipoproteine ad alta densità (HDL) sono in grado di contrastare l'effetto inibitore delle LDL sulla vasodilatazione endotelio-mediata. Infine, oltre che sulle proprietà vasoattive dell'endotelio, l'ipercolesterolemia è attiva anche su altri meccanismi in

grado di favorire lo sviluppo e la progressione della malattia ateromasica, quali la stimolazione dell'adesione e la migrazione di monociti/macrofagi e linfociti, dell'aggregazione ed adesione piastrinica, della modificazione in cellule schiumose dei macrofagi e delle fibrocellule muscolari lisce. Inoltre l'ipercolesterolemia promuove il processo infiammatorio a livello della parete vasale ed aumenta la produzione locale di MMP e la degradazione del collagene a livello della placca causandone instabilità.

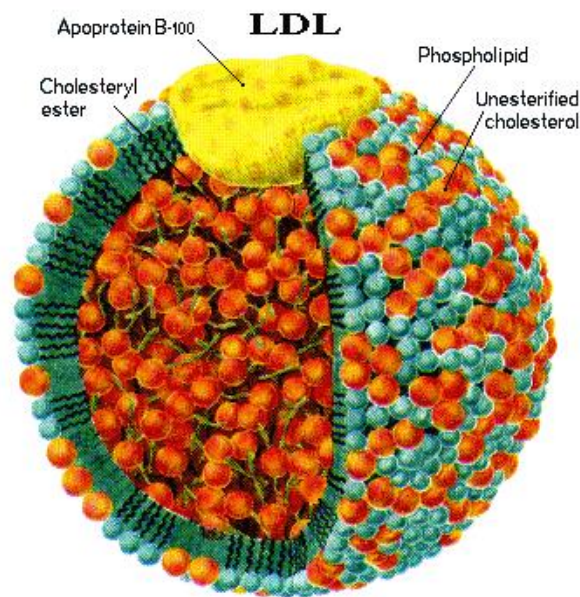


Figura 6 - LDL - La lipoproteina a bassa densità (LDL) è una grossa particella sferica, la cui parte centrale oleosa si compone di 1550 molecole di colesterolo. Ciascuna di queste molecole è unita ad un acido grasso a catena lunga mediante un legame estereo.

Esistono ulteriori riscontri circa il fatto che le LDL (*Figura 6*) debbono subire una qualche trasformazione prima di diventare patogene ed i dati provenienti dagli studi biochimici confermano fortemente l'ipotesi che le modificazioni subite dalle LDL, durante il processo di ossidazione, svolgono un ruolo cruciale nell'aterogenesi. Benché l'importanza dell'ipotesi ossidativa non sia stata completamente stabilita, si è dimostrato che le LDL sono in grado di ossidarsi *in vitro* ed *in vivo* (si sono scoperti nell'uomo autoanticorpi diretti contro le LDL ossidate),

anche se i meccanismi che regolano l'ossidazione delle LDL *in vivo* sono molto meno noti (Li et al 2003). È stato dimostrato che le LDL sono protette dall'ossidazione nel plasma da sostanze antiossidanti idrosolubili quali l'acido ascorbico, l'acido ureico o la bilirubina. È quindi probabile che, la maggior parte delle modificazioni ossidative delle LDL avviene sulla parete arteriosa, dove le LDL risultano ampiamente isolate dagli antiossidanti plasmatici.

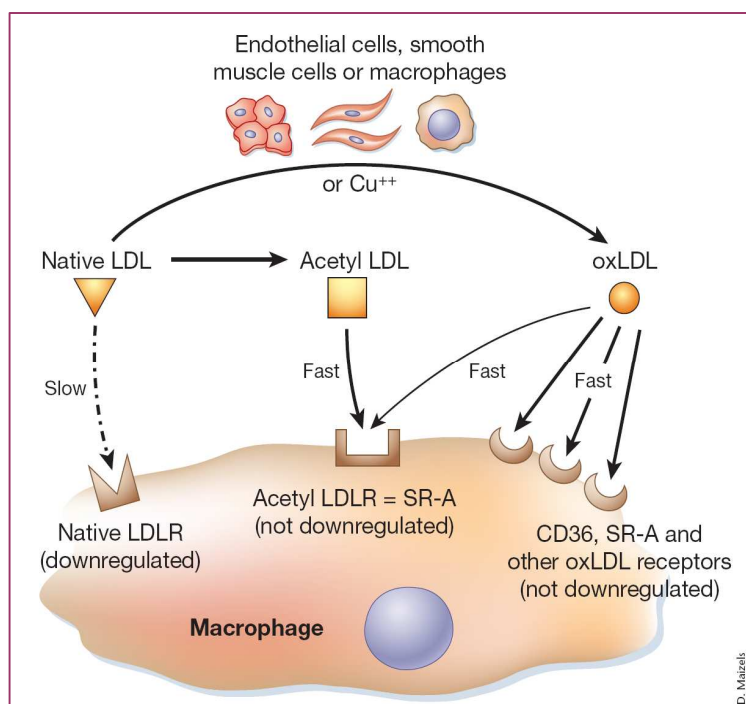


Figura 7 - Alterazioni lipoproteine low density (LDL) - Le LDL native non possono indurre la formazione di foam cells, perché l'assorbimento è lento e perché il suo recettore può legare solo un numero limitato di LDL. Le LDL acetilate o le oxLDL possono indurre la formazione di foam cells (accumulo di colesterolo nei macrofagi), poiché l'assorbimento è molto più rapido e i recettori scavenger non downregolano in risposta all'aumento del colesterolo cellulare. (Daniel Steinberg, Nature Medicine 2002).

L'ossidazione delle lipoproteine porta a numerose modificazioni strutturali e funzionali delle LDL che determinano due effetti importanti (Figura 7), in particolare, vengono generate molecole ad alto potenziale biologico comprendenti sostanze chemiotattiche per i monociti ed i linfociti, oppure citotossiche e in grado di alterare direttamente l'espressione genica delle cellule delle pareti arteriose. Le modificazioni

delle Apo-B portano a mutamenti nella specificità del recettore per la particella LDL aumentando la sua affinità per i cosiddetti recettori “scavenger” al contrario, le LDL inalterate si andranno a legare allo specifico recettore per le LDL. Poiché la presenza di questi recettori è regolata dal contenuto intracellulare di colesterolo libero, le cellule possono captare solo quantitativi limitati di LDL per cui la captazione di colesterolo viene ad essere limitata da meccanismi di tipo feed-back negativo; al contrario i recettori “scavenger”, una famiglia di proteine strutturalmente eterogenee, che si trovano sulla superficie delle cellule endoteliali, dei monociti e dei macrofagi, non sono regolate mediante feedback dal contenuto intracellulare di colesterolo. Mediante i recettori “scavenger”, le cellule possono captare le LDL in modo non regolato ed accumulare enormi quantitativi di colesterolo e di suoi esteri.

2.3 Struttura e funzione del recettore per le ox-LDL: LOX-1

Numerosi studi *in vivo ed in vitro* hanno dimostrato che, nel processo aterogenetico, le ox-LDL assumono un'importanza maggiore rispetto a quelle native non modificate. Questi dati sono rafforzati dal fatto che le ox-LDL inducendo una modificazione del fenotipo cellulare in senso pro-aterogenico di cellule come le cellule endoteliali, le cellule muscolari lisce, monociti/macrofagi, favoriscono il processo apoptotico.

Le cellule endoteliali sono in grado di internalizzare grandi quantità di LDL ossidate grazie alla presenza di recettori di membrana, appartenenti alla famiglia degli Scavenger Receptors (SRs) che in condizioni fisiologiche sono assenti o, se presenti, lo sono in minima quantità nelle cellule vascolari endoteliali, che rappresentano la prima linea cellulare influenzata dalle ox-LDL. Ox-LDL, attraverso una varietà di SRs, come SR-AI/II, CD36, SR-BI, viene captato dal sistema monocito-macrofagico e dalle cellule della muscolatura liscia esercitando i suoi effetti

proaterogenetici sulla parete vascolare. Inoltre le ox-LDL cambiano l'attività secretoria dell'endotelio, causandone l'inizio della sua disfunzione; inibendo l'espressione endoteliale di e-NOS induce l'espressione delle molecole di adesione sull'endotelio, e facilita l'adesione dei monociti allo strato intimale dei vasi sanguigni.

Nel 1997 è stato individuato (*Sawamura et al, 1997*) in cellule endoteliali aortiche bovine, il recettore maggiore per le ox-LDL denominato *Lectin-like ox-LDL receptor-1* (LOX-1), il quale è responsabile del legame, dell'internalizzazione e degradazione delle ox-LDL nelle cellule endoteliali. Successivamente è stato ritrovato anche sulla superficie delle SMC, sui monociti, sui macrofagi, sui fibroblasti, sulle piastrine, attualmente è ritenuto essere ubiquitario in quanto visto anche in cellule appartenenti al SNC. Oltre alle ox-LDL, LOX-1 è in grado di riconoscere e legare altri ligandi: le lipoproteine modificate (ox-LDL, LDL acetilate e lipoproteine ad alta densità ipocloritomodificate); i prodotti chimici polianionici (acidi poliinosinici e carraggenina); i fosfolipidi anionici (fosfatidilserina e fosfatidilinositolo); e i ligandi cellulari (cellule apoptotiche, piastrine attivate e batteri).

Queste osservazioni indicano che LOX-1 svolge un ruolo critico nella disfunzione endoteliale e nel danno che porta all'inizio e alla progressione dell'aterosclerosi. L'espressione di LOX-1 sembrerebbe essere non costitutiva ma regolata da vari stimoli proinfiammatori, come il TNF- α , insulti meccanici come lo *shear stress*, dalle ox-LDL e dell' Angiotensina II attraverso l'attivazione del suo recettore AT1R (*Figura 8*). È stato dimostrato (*Mehta and Romeo, 2000*) che l'espressione del LOX-1 risulta fortemente aumentata in condizioni proaterogeniche, dimostrando così l'importanza nella patogenesi dell'aterosclerosi. Recentemente si è avuta un' ulteriore conferma di quanto LOX-1 sia fondamentale nello sviluppo dell' aterosclerosi e nella disfunzione endoteliale, uno studio condotto su

topi resi knockout per il recettore LOX-1, e successivamente sottoposti sia a dieta ipercolesterolemica sia all'infusione di ox-LDL, si è visto che non svilupparono lesioni aterosclerotiche, si è inoltre osservata una riduzione dei markers infiammatori e dello stress ossidativo (Mehta et al, 2007).

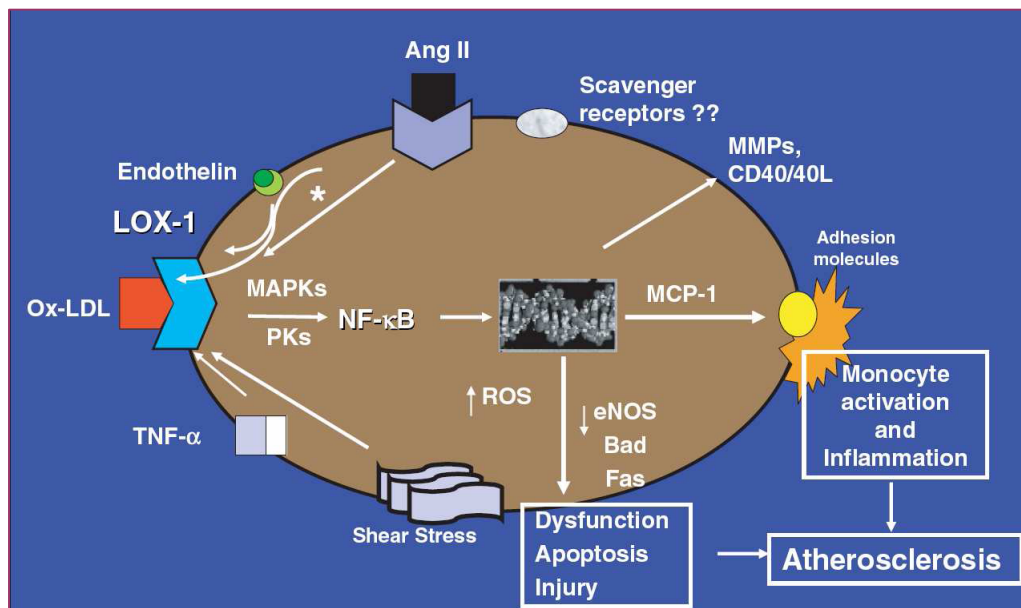


Figura 8 – Attivazione Lox-1 - Il Recettore Lox-1 viene attivato da stimoli quali ATII, stress di parete, stimoli infiammatori oltre che naturalmente dal legame con le Ox-LDL; ciò provoca un aumento di fattori di trascrizione come NF-κB che porteranno ad: aterosclerosi, apoptosi, aumento dell'infiammazione, disfunzione endoteliale, aumento dei radicali liberi. (Mehta JL et al, Cardiovascular Research 2006).

2.4 Effetti biologici delle LDL ossidate (ox-LDL)

Studi recenti hanno evidenziato come le ox-LDL presentano molti effetti biologici capaci di contribuire all'iniziazione e alla progressione della placca aterosclerotica. Inizialmente, durante il processo di ossidazione delle ox-LDL nello spazio sub-endoteliale si formano delle LDL leggermente modificate (MM-LDL o *minimal modify-LDL*), che sono i principali responsabili della perossidazione lipidica (Mehta and Li, 2000). Le MM-LDL inducono l'adesione dei leucociti all'endotelio, la secrezione della proteina-1 chemiotattica dei monociti (MCP-1) e del fattore macrofagico capace di stimolare la formazione di colonie (M-CSF

o macrophage colony stimulation factor); ciò porta al legame e al reclutamento dei monociti nell'endotelio e alla successiva migrazione nello spazio sub-endoteliale, dove il M-CSF promuove la differenziazione dei macrofagi tissutali; questi, a loro volta, possono modificare le MM-LDL in una forma a sua volta ancora più ossidata (*Mintz et al., 1997*). Le LDL che vengono ossidate non sono riconosciute dal recettore per le LDL; esse vengono invece catturate dal recettore "scavenger" dei monociti-macrofagi, evento questo che non è regolato dal contenuto di colesterolo intracellulare. Le ox-LDL possiedono una duplice funzione: da un lato, sono i principali fattori chemiotattici per i monociti e, dall'altro sono potenti inibitori della mobilità dei macrofagi determinando così la ritenzione dei macrofagi nella parete delle arterie. Tutto ciò ha dimostrato come livelli elevati di ox-LDL circolanti sono correlati con l'ispessimento del rapporto neointima-media, con la formazione della placca aterosclerotica sia nelle arterie carotidee che in quelle femorali, con elevati livelli di TNF α e di proteina C reattiva, fattori importanti nella patogenesi delle malattie cardiovascolari (*Pasternack and Pysnik, 1983*).

3. SISTEMA IMMUNITARIO ED ATEROSCLEROSI

L'aterosclerosi è un esempio specifico di risposta infiammatoria cronica associata a dislipidemia ed altri fattori di rischio cardiovascolare (*Ross, et al, 1999*). In accordo con questa definizione, la placca ateromastica presenta una componente cellulare immunitaria predominante, fatta di macrofagi, cellule dell'immunità adattativa, cellule muscolari lisce (SMC) e componenti della matrice, che determinano la progressione della patologia. Il sistema immunitario è riconosciuto come componente essenziale per il processo patologico. Questo è tuttavia diviso in due sottosistemi quello dell'immunità innata e quello dell'immunità adattativa.

Il sistema dell'immunità innata svolge un ruolo rilevante nell'inizio della risposta infiammatoria. Sono coinvolti in essa diverse cellule e mediatori. La risposta acuta delle cellule nel contesto aterosclerotico è centrata sui monociti-macrofagi. Altre cellule partecipano attivamente e possono svolgere lo stesso ruolo. Tra queste includiamo: le cellule natural killers (NK), le cellule dendritiche, le mast cells, e le cellule B1.

Le NK sono le tipiche cellule che agiscono nelle neoplasie, distruggendo le cellule tumorali, nelle infezioni virali e nell'eliminazione di tutti i patogeni riconosciuti e ricoperti di anticorpi. Tuttavia, esse secernono pure citochine, la più importante delle quali è l'IFN- γ che ha un ruolo principe nell'attivazione dei macrofagi (*Trinchieri, 1995*). La loro attività, inoltre, è promossa da numerose citochine come IL-2, IL-15 e IL-12.

Le cellule dendritiche hanno un ruolo importante nella presentazione dell'antigene alle cellule dell'immunità adattativa esprimendo alti livelli di recettori scavenger e del complesso maggiore di istocompatibilità di tipo II (MCH-II). Inoltre, possono esprimere molecole co-stimolatorie e co-inibitorie che agiscono nell'attivazione dei linfociti T, attraverso mediatori appartenenti alla famiglia B-7 o a quella del TNF. Le molecole

co-stimolatorie comprendono: CD80 (B7-1), CD86 (B7-2) e ICOS-L, mentre, le molecole co-inibitorie comprendono: PD-L1, PD-L2. Tra la famiglia dei TNF, le molecole co-stimolatorie comprendono: OX-40 e CD137-L.

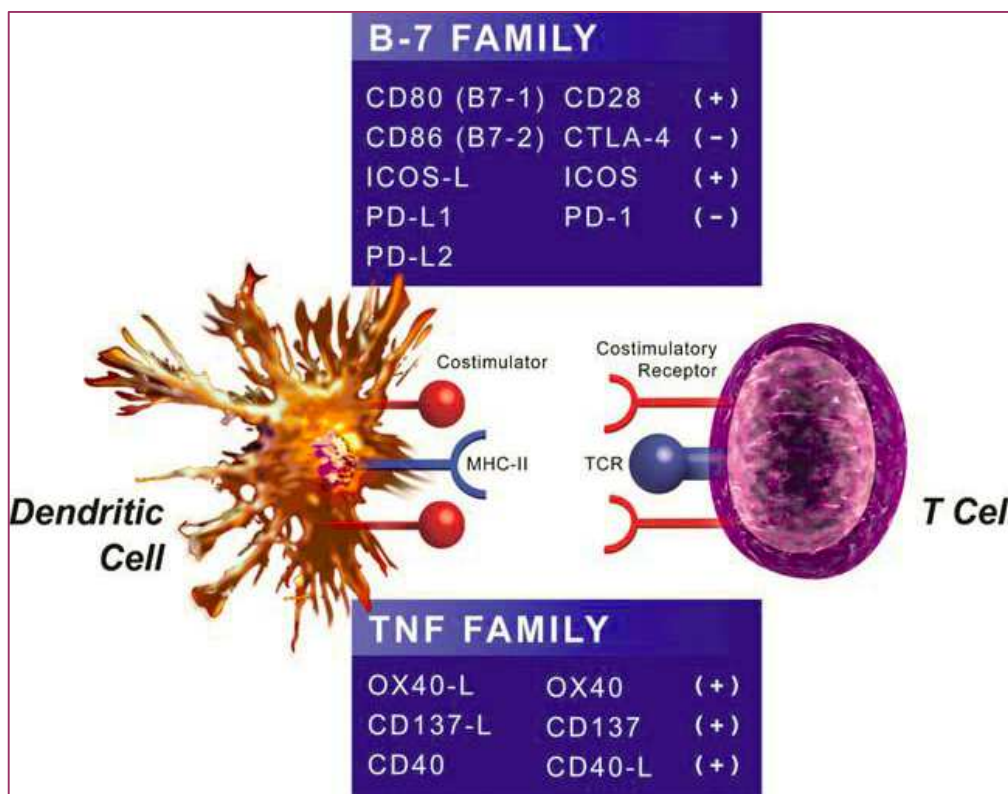


Figura 9 - Interazioni tra cellule dendritiche (ED) e linfociti T nel pattern citochinico di attivazione e regolazione degli stessi - (René and Packard et al - Innate and adaptive immunity in atherosclerosis 2009).

Le cellule T attivano anche a loro volta le cellule dendritiche attraverso il ligando per il CD40 che incrementa l'espressione da parte delle cellule dendritiche di CD80 e di CD86. Il CTLA-4, ovvero l'antigene citotossico dei linfociti T, ICOS, una molecola co-stimolatoria, e altre molecole, come il TNF e i PD-1, PD-L1 che programmano la morte cellulare (Figura 9).

Le mast cells attivate rilasciano istamina, leucotrieni, fattore attivante le piastrine (PAF-1) e citochine. L'insieme di queste cellule costituisce la risposta immunitaria innata che riguarda la prima parte della patologia. Insieme stimolano anche l'endotelio, attraverso l'IFN- γ , a esprimere

MCH-II, anche se la sua efficienza nella presentazione dell'antigene non è così forte così come nel caso dei macrofagi e delle cellule dendritiche.

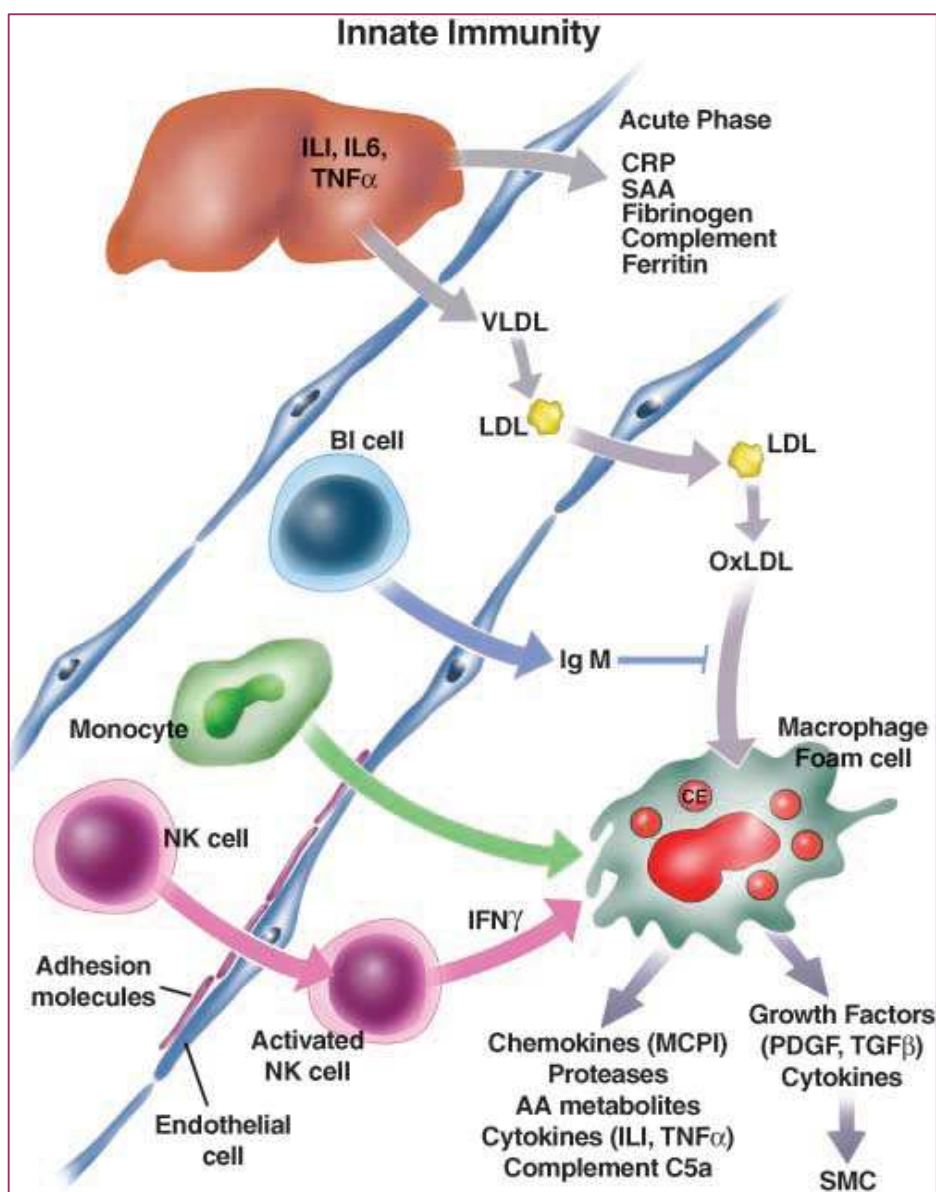


Figura 10 - Immunità innata - Il fegato è il più grande attore dell'aterogenesi producendo le VLDL che nel plasma verranno convertite in LDL, dando avvio al processo aterosclerotico. La progressione degli eventi porta all'attivazione di numerose cellule protagoniste dell'immunità innata con rilascio di citochine che interverranno nella progressione della patologia. (Getz, immune function in atherosclerosis, *J of lipid research* 2004).

Le cellule B1 sono un link tra l'immunità innata e adattativa. Sono responsabili della produzione di anticorpi IgM, molti dei quali reagiscono con i fosfolipidi ossidati. Questi anticorpi si sono dimostrati utili nel bloccare l'internalizzazione macrofagica di ox-LDL da parte dei recettori

scavenger. L'attivazione della risposta infiammatoria induce la sintesi e il rilascio di IL-1, TNF- α e IL-6, che sono responsabili della trascrizione epatica di proteine plasmatiche della fase acuta, come la PCR (proteina C reattiva), l'amiloide A sierica (SAA), il fibrinogeno e la ferritina, così come le proteine del sistema del complemento (*Figura 10*).

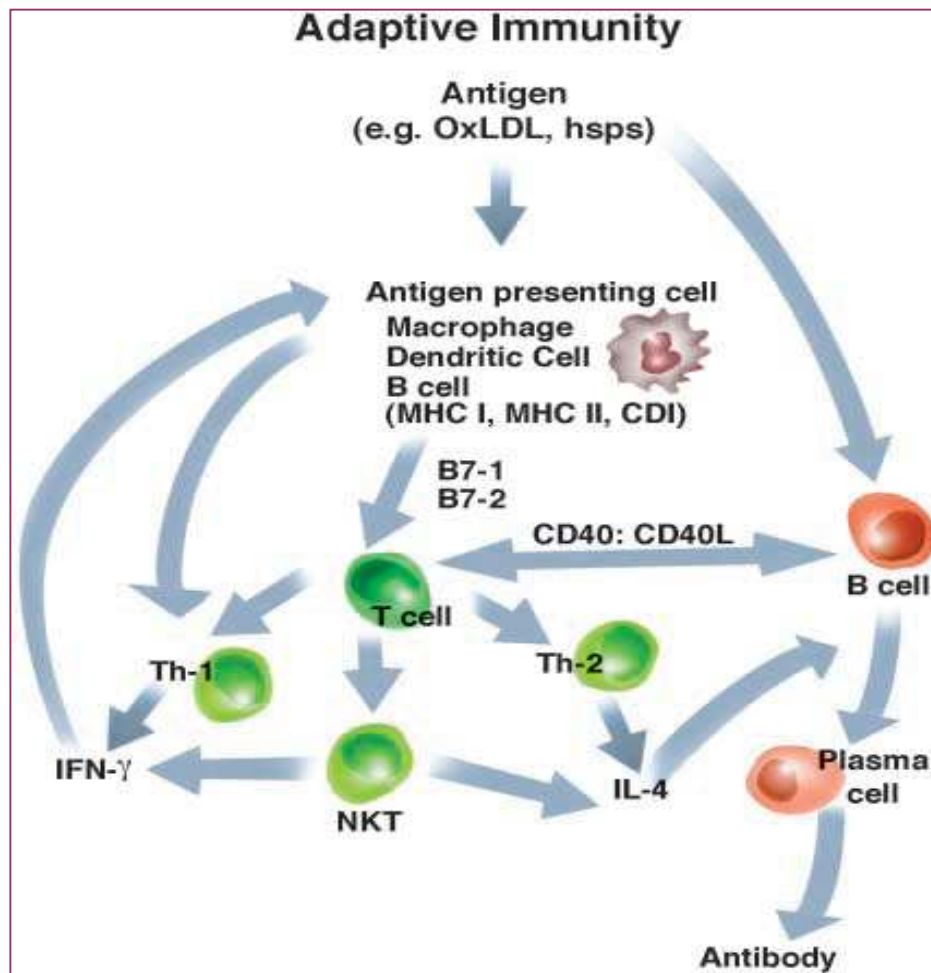


Figura 11 - Immunità adattativa - Il network di citochine prodotte dai differenti isotipi di linfociti T e di linfociti B attraverso cellule della immunità innata è scatenato dalla loro esposizione a neo antigeni come ox-LDL e heat shock proteins (hsps) o antigeni esogeni come ad esempio antigeni di microrganismi come la clamydia.

Il sistema immunitario adattativo (*Figura 11*) reagisce con neo antigeni endogeni (cellule apoptotiche o ox-LDL) o con quelli esogeni, e si esprime attraverso l'attivazione delle cellule B e cellule T. Alcuni dei neoantigeni sono anche dei target delle cellule dell'immunità innata.

Il sistema dell'immunità adattativa può influenzare l'aterosclerosi in uno di questi tre modi:

- 1) *Attraverso interazione cellula – cellula (tra l'antigene-APC, macrofagi, linfociti B, cellule dendritiche) e linfociti T;*
- 2) *Mediante la secrezione di citochine dai linfociti T attivati che mediano l'attivazione dei macrofagi, e, di altre cellule della placca aterosclerotica;*
- 3) *Con la produzione di anticorpi da parte dei linfociti B attraverso i linfociti T helper o in maniera indipendente. Alcuni di questi anticorpi, hanno la capacità di bloccare la fagocitosi di ox-LDL, e, quindi, i recettori scavenger.*

Le molecole antigeniche sono processate attraverso il sistema endosomiale delle cellule presentanti l'antigene (APC) e, sono presentati sulla loro superficie associati al complesso di istocompatibilità di tipo I (MCH-I) o a quello di tipo II (MCH-II). Alcuni epitopi antigenici, interagiscono con i TCRs (*T-cell-receptor*) sulla superficie delle cellule T, e, ciò corrisponde a una loro anergia o attivazione.

La decisione tra queste tipologie di risposte è largamente determinata dalla disponibilità di molecole co-stimolatorie (B7-1, B72) sulle APC che interagiscono con la molecola CD28 sui linfociti T.

Il pool di isotipi di questi recettori è vasto e si determina durante lo sviluppo dei linfociti T come risultato del riarrangiamento di diversi geni. I linfociti T si dividono in due sottoclassi: CD4+ e CD8+. La maggior parte dei linfociti T nella placca aterosclerotica è di tipo CD4+, sebbene una piccola parte di CD8+ è stata riconosciuta.

I CD4+ riconoscono gli antigeni esposti con MCH-II. I CD8+ invece riconoscono antigeni associati a MCH-I. Tra i CD4+ ci sono diversi sottogruppi che si distinguono in base alle citochine che producono.

I linfociti T CD4⁺ di tipo Th1 esprimono un pattern citochinico proinfiammatorio che comprende IFN- γ che attiva i macrofagi e facilita la produzione di anticorpi IgG1 da parte delle cellule B.

Le citochine secrete invece da linfociti T CD4⁺ di tipo Th2 sono prevalentemente antinfiammatorie e, comprendono, IL-4 e, IL-5.

C'è una cross regolazione tra queste due risposte, e, l'uno tende ad inibire l'altro. IFN- γ inibisce la risposta di tipo Th2, e, IL-4 inibisce la risposta Th1. IL-10 inibisce l' IFN- γ , e, IL-12 riduce la risposta Th2.

I linfociti B sono il gruppo principale di linfociti circolanti. Essi riconoscono l'antigene attraverso il recettore per antigene a loro associato, nel quale le IgM sulla loro superficie giocano un ruolo principe. Come i linfociti T, attraverso questi recettori, esprimono una specificità che deriva loro dal riarrangiamento del pattern citochinico.

Le cellule B mature sono le plasmacellule, e, secernono specifici anticorpi. L'interazione dei loro anticorpi con gli antigeni è mediata dai linfociti T helper. L'interazione tra cellule B e T è facilitata dal CD40 ligando (CD40L) espresso sulle cellule T e dal CD40 su quelle B. Il ruolo di questa interazione è ben conosciuto come implicato nell'aterosclerosi (*Lutgens, et al, 2002*).

Queste molecole sono membri della super famiglia dei TNF. Sebbene l'espressione di queste molecole si pensava fosse ristretta solo ai linfociti B, ai macrofagi, alle cellule dendritiche e ai linfociti T attivati, è oggi chiaro che sono espresse anche da cellule presenti nella placca aterosclerotica. Quando la loro assenza è combinata con quella dei recettori per le LDL, l'aterosclerosi è ridotta e le lesioni hanno pochi linfociti T, SMC e poco collagene (*Buono et al, 2009*). La loro azione è quindi proinfiammatoria (*Figura 12*).

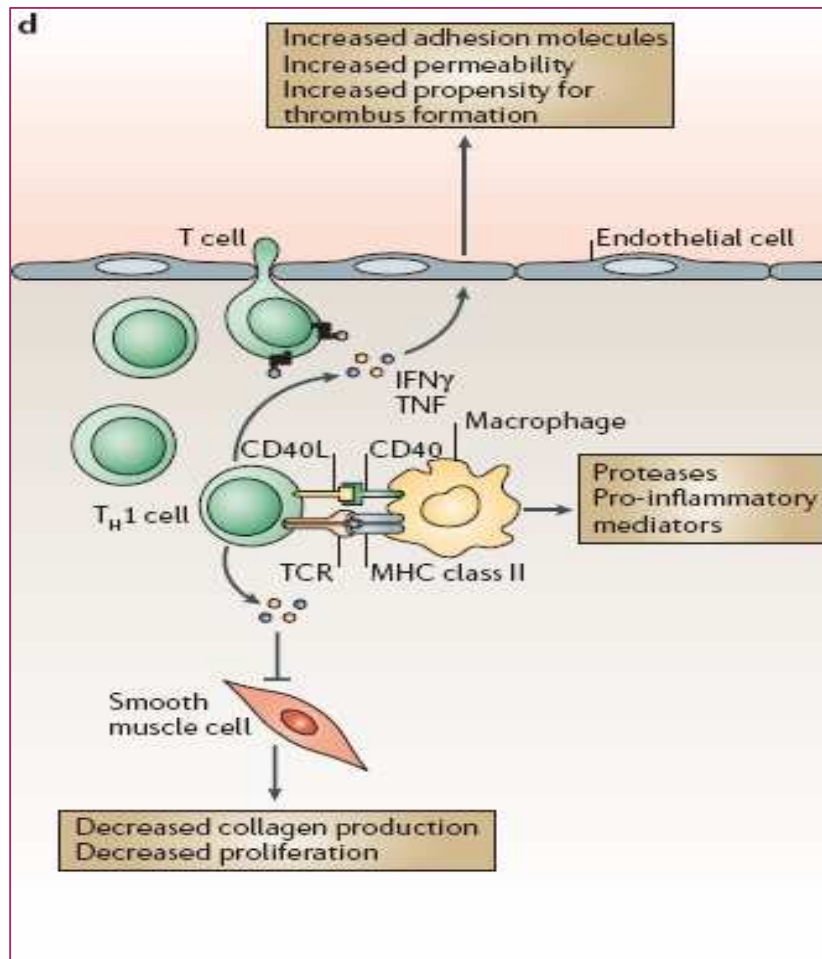


Figura 12 – Interazione immunità innata e adattativa - Attraverso interazioni tra linfociti T (CD40L) e cellule macrofagiche, NK, linfociti B (CD40) si ha un incremento di molecole proinfiammatorie e diminuzione della produzione di collagene e di proliferazione delle SMC. In questo modo la lesione progredisce verso una placca ateromastica complicata. (René, Packard *Innate and adaptive immunity in atherosclerosis*, 2009).

Le citochine giocano un ruolo importante nella modulazione dell'aterosclerosi. La dominanza della risposta Th1 e dei suoi prodotti secreti all'interno della placca come IFN- γ è bilanciato dalla presenza di molecole antinfiammatorie mediate dai linfociti Th2 nella placca.

L'IL-10 e il TGF- β hanno quindi un ruolo protettivo nei confronti dell'intero processo aterosclerotico. La loro funzione come citochine antinfiammatorie è data dal limitato reclutamento dei leucociti e dalla promozione della sintesi di collagene e di matrice extracellulare.

Uno squilibrio tra molecole proinfiammatorie e antinfiammatorie è molto importante perché alla base del processo che porta alle complicanze della

patologia aterosclerotica che consistono nella ulcerazione della placca e la successiva esposizione di materiale pro-trombotico all'interno del lume delle arterie con conseguente attivazione del processo di coagulazione che termina nella formazione di un trombo piastrinico con evidente occlusione del vaso e con conseguente patologia ischemica associata (Figura 13 – 14).

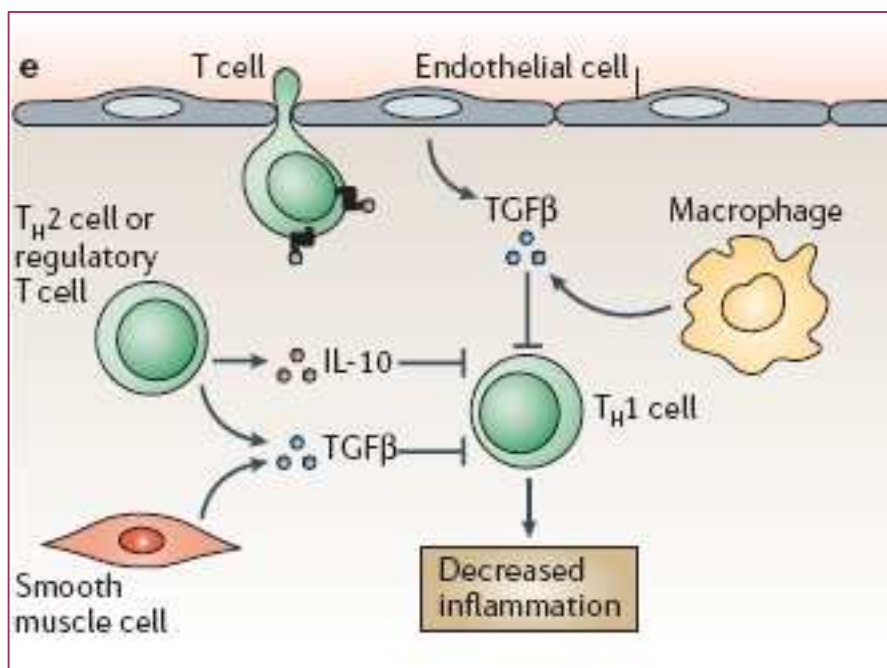


Figura 13 - Sbilancio tra azione proinfiammatoria e antinfiammatoria - L'innesco di una risposta infiammatoria di tipo Th1 è bilanciata fisiologicamente da una risposta antinfiammatoria di tipo Th2. Lo sbilanciamento in favore dell'azione Th1 nella placca aterosclerotica causa la sua ulcerazione con conseguente attivazione della cascata coagulativa e formazione di un trombo piastrinico che occlude il vaso. (René, Packard *Innate and adaptive immunity in atherosclerosis*, 2009).

Nuovi istotipi di linfociti Th CD4⁺ sono stati studiati all'interno della lesione ateromastica. Tra questi i Th9 e i Th17 (Park, et al, 2005). Non è ancora chiaro che tipo di ruolo abbiano durante l'aterogenesi, ma, la questione è in approfondimento, poiché è importante sapere che azione svolgono per poter agire sul loro differenziamento nel bilancio dell'azione pro- e antinfiammatoria.

Th17, ad esempio, elabora l'IL-17 e contribuisce alla difesa da agenti patogeni, microbici e fungini, così come promuove lesioni autoimmuni e,

promuove un danno parzialmente dovuto al coinvolgimento, all'attivazione e alla migrazione di neutrofili.

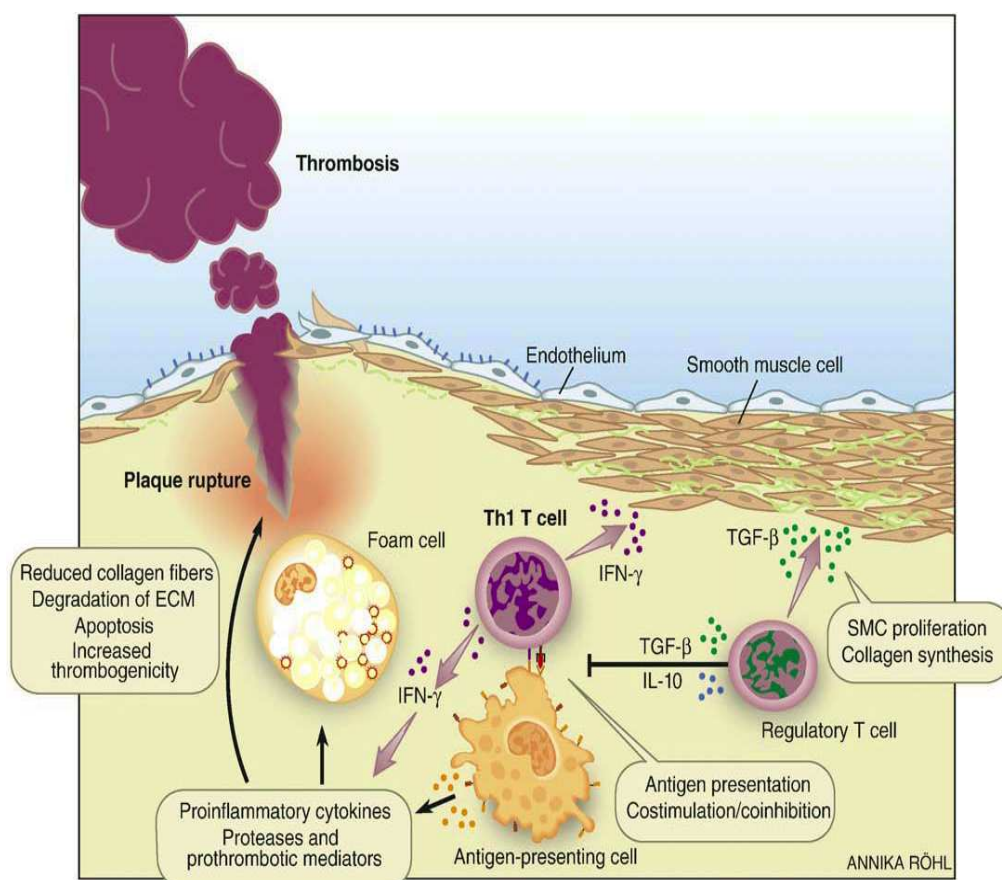


Figura 14 - Rottura di una placca ulcerata - Gli effetti delle cellule T sull'infiammazione della placca e la sua propensione alla rottura e la conseguente trombosi. La risposta Th1 sbilanciata rispetto a quella Th2 provoca una propagazione di citochine proinfiammatorie, proteasi e mediatori pro-trombotici che riducono le fibre collagene, degradano la matrice extracellulare, aumentano l'apoptosi. (Andersson, Hansson, Libby, *adaptive immunity and atherosclerosis*, Clin Immun, 2009).

Sia i Th9 che i Th17 richiedono TGF- β per la loro differenziazione insieme a IL-4, IL-6 rispettivamente. IL-17 sembra anche promuovere l'aterosclerosi quando la risposta Th1 si riduce (Pejnovic, et al, in press).

La sua intera funzione, tuttavia, rimane poco chiara. E' importante vedere come l'azione di citochine antinfiammatorie, come IL-10 e il TNF- β , ha un ruolo protettivo nei confronti dell'intero processo aterosclerotico, ed è stato dimostrato che pazienti con aterosclerosi hanno bassi livelli di queste citochine nel siero rispetto a pazienti con arterie normali.

I fattori di rischio aterosclerotici iniziano il processo infiammatorio. Le varie tipologie di cellule immunitarie coinvolte favoriscono la progressione della lesione attraverso una risposta Th1 e la portano verso un'evoluzione infiammatoria cronica.

Alcuni linfociti T sono aterogenici e proinfiammatori, altri aiutano i linfociti B a produrre anticorpi protettivi nei confronti della progressione del danno, altri ancora hanno potenti capacità regolatorie (*Groyer, Caligiuri et al 2006*).

Quindi, l'utilizzo di cellule T modificate potrebbe essere un valido goal terapeutico nella prevenzione delle complicanze di questa patologia. Dovrebbe esserci una modulazione tra i linfociti Th1 responsabili di un'azione pro-aterogenica e al tempo stesso una risposta Th2 capace di contrastarla. Tuttavia, per arrivare a ciò, si deve capire esattamente il loro ruolo e la loro azione durante la fisiopatogenesi della placca (*Hansson, et al, 2009*).

4. SINDROMI CORONARICHE ACUTE

La prevalenza delle sindromi coronariche acute è in continuo aumento tanto da costituire un'epidemia sanitaria mondiale. Nel mondo il 30% di tutte le morti è attribuibile a malattie cardiovascolari ed in futuro si prevede una ulteriore crescita, in relazione ai cambiamenti dello stile di vita nei Paesi in via di sviluppo (*The American Heart Association, 1999; ISTAT, 2006*).

Sindrome coronarica acuta (SCA) è un termine unificante, usato per rappresentare un comune risultato finale che è l'ischemia miocardica acuta, dovuta ad un momento patogenetico noto come trombosi coronarica. Essa può essere definita come la condizione che si instaura allorchè il flusso ematico di un distretto tissutale scende al di sotto del livello in grado di garantire l'apporto di ossigeno e di sostanze nutritive, adeguati alle necessità metaboliche del tessuto stesso (*Giuliani, et al, 2008*).

La definizione di SCA comprende sia l'infarto miocardico acuto (*IMA*), classificato come IMA con sopraslivellamento del tratto ST (*STEMI*) e IMA senza sopraslivellamento del tratto ST (*NSTEMI*), sia la cosiddetta angina instabile (*UA*) (*Antman, et al, 2004*).

Le SCA hanno caratteristiche fisiopatologiche simili, ma gravità diversa nella loro presentazione a seconda che la trombosi sia occlusiva o non occlusiva, intermittente o persistente.

Un'altra manifestazione della cardiopatia ischemica è la morte cardiaca improvvisa. Con questo termine si intende il decesso per cause naturali di origine cardiaca che consegue ad una improvvisa perdita di coscienza, entro un'ora dall'esordio dei sintomi. I soggetti possono essere cardiopatici noti, ma la modalità e il momento dell'insorgenza della perdita di coscienza devono essere inattesi. Nonostante il decremento della malattia coronarica e un più efficace trattamento della stessa negli

ultimi anni, la morte cardiaca improvvisa rappresenta tutt'ora un problema medico e sociale di vastissime proporzioni. Tale tipo di decesso rimane la causa di morte più frequente per soggetti di età tra i 20 e 65 anni, in particolare di sesso maschile nei paesi industrializzati.

Negli Stati Uniti la morte cardiaca improvvisa è all'origine di oltre 300.000 decessi per anno. I dati epidemiologici indicano che le alterazioni strutturali delle coronarie costituiscono l'80% delle cause di morte improvvisa.

La stesura delle linee guida delle SCA si basa delle evidenze condivise da tutte le società scientifiche internazionali (*ACC American College of Cardiology, AHA-American Heart Association, ESC-European Society of Cardiology, ERC European Resuscitation Council*).

In conformità con tali indicazioni la diagnosi di SCA (*Braunwald, et al, 2009*) prevede la presenza di almeno due dei seguenti criteri:

- 1) *Il dolore precordiale di tipo ischemico;*
- 2) *Le modificazioni dell'ECG in tracciati seriati;*
- 3) *L'incremento dei markers enzimatici di necrosi delle cellule miocardiche.*

I pazienti con SCA possono essere divisi in due grandi categorie:

- 1) *Pazienti con persistente sopraslivellamento del tratto ST e con BBS insorto durante angor; generalmente ad evoluzione verso un infarto con onde Q, raramente verso una necrosi senza onde Q;*
- 2) *Pazienti senza sopraslivellamento del tratto ST ma con segmento ST sottoslivellato o con modificazioni dell'onda T o con caduta di ampiezza dell'onda R.*

E' definita NSTEMI o UA quella condizione accompagnata rispettivamente da aumento o meno dei marcatori di danno miocardico.

L'UA è una sindrome a collocazione intermedia tra l'angina stabile cronica e l'infarto miocardico e deriva in genere dalla rottura di una

placca aterosclerotica, dalla successiva formazione di un trombo e dalla parziale o totale occlusione transitoria del flusso di un'arteria coronarica. E' diagnosticata sulla base del dolore toracico, sull'assenza dei segni ECG-grafici e delle alterazioni degli indici bioumorali tipici dell'infarto, che valutano la necrosi cardiaca.

La classificazione dell'UA secondo Braunwald, basata sulla gravità dei sintomi, sul loro contesto clinico e sull'intensità del trattamento medico, è stata validata coronarograficamente, clinicamente ed attualmente aggiornata al fine di includere i livelli di troponina.

L'Agency for Health Care Policy and Research (*AHCPR*) ha pubblicato nelle linee guida le caratteristiche che valutano le probabilità di segni e di sintomi suggestivi di SCA, verosimilmente dovuta a malattia coronaria e la Canadian Cardiovascular Society (*CCS*) ha adottato una classificazione per stadare i sintomi dell'angina. NSTEMI clinicamente è simile all'UA ma l'ischemia è talmente grave da provocare una necrosi miocardica, evidenziata da diversi marker cardiaci, senza sovraslivellamento del tratto ST all'ECG. Generalmente evolve in un infarto miocardico senza onda Q, raramente come un infarto con onda Q.

Poiché la fisiopatologia dello STEMI richiede un intervento di riperfusion, farmacologica ed interventistica, quanto più precoce possibile, tale condizione è oggetto di linee guida distinte, mentre NSTEMI e UA sono unificate nella dizione di SCA senza sovraslivellamento del tratto ST.

Per i pazienti con NSTEMI ed angina instabile le linee guida europee e americane concordano sull'utilità di procedere alla valutazione diagnostica, clinica, ECG-grafica e dei biomarker e contemporaneamente alla stima del rischio di morte e di infarto miocardico a breve termine, al fine di indirizzare al meglio la strategia terapeutica. E' necessario iniziare la terapia con eparina (UFH o LMWH), ASA e Clopidogrel mentre gli

inibitori GP IIb/IIIa sono consigliati per i pazienti ad alto rischio. La triplice associazione ASA + Clopidogrel + GP IIb/IIIa non è condivisa all'unanimità e non risulta scevra da complicanze emorragiche.

Alcuni pazienti con NSTEMI hanno una prognosi peggiore a breve e lungo termine e sono candidati, pertanto, ad una procedura di tipo interventistico. Un aspetto per molto tempo dibattuto nel trattamento delle SCA–NSTEMI riguarda la scelta tra una strategia invasiva, con ricorso sistematico e precoce alla coronarografia e alla rivascolarizzazione miocardica e una strategia conservativa.

I risultati di alcune metanalisi (*Metha, et al, 2005*) e di una rassegna della Cochrane Collaboration hanno dimostrato in determinate categorie di pazienti la superiorità di un approccio aggressivo rispetto a quello conservativo nel migliorare la prognosi a medio e lungo termine; recentemente, però, lo studio ICTUS non ha dimostrato differenze significative in termine di morte tra un approccio invasivo precoce di routine ed un approccio selettivo, limitato cioè a ricorrenza di angina o alterazioni dinamiche di ST.

Alla luce di questi risultati le Società di Cardiologia hanno diffuso ultimamente un aggiornamento delle linee guida nelle quali il trattamento aggressivo viene indicato come trattamento di scelta in tutti i pazienti con caratteristiche di rischio elevato, mentre viene fortemente sconsigliato in quelli a basso rischio. La scelta della strategia invasiva o conservativa si basa sulla valutazione del profilo di rischio, sia ischemico che emorragico del paziente. Per i pazienti a rischio intermedio o elevato è previsto il ricorso alla coronarografia precoce, entro le 72 ore per le linee guida ESC o a tempo non definito per quelle ACC/AHA, con indicazione ad una procedura d'urgenza per i pazienti con manifestazioni cliniche più gravi, quali angina refrattaria o ricorrente nonostante la terapia farmacologica, scompenso cardiaco o aritmie potenzialmente fatali.

L'applicazione rigorosa di queste linee guida richiede che tra i centri periferici e i centri terziari si realizzi un'ampia collaborazione, nel contesto di una rete cardiologica per l'emergenza, che preveda il rapido trasferimento dei pazienti a più alto rischio, secondo protocolli condivisi. Nello STEMI la scelta della migliore opzione terapeutica sarà guidata dalla stratificazione del rischio. Ci sono due metodiche che consentono l'apertura della coronaria occlusa, l'una farmacologica, la trombolisi e l'altra meccanica, cioè l'angioplastica con stent, che ha soppiantato quella mediante palloncino.

Le controindicazioni assolute per la terapia fibrinolitica sono rappresentate dalle seguenti condizioni: precedenti emorragie intracraniche, sanguinamento attivo e recente stroke, episodio traumatico o intervento chirurgico, neoplasie intracraniche. Le controindicazioni relative comprendono l'ipertensione arteriosa severa, una storia di pregressa patologia cardiovascolare, una pregressa emorragia gastrointestinale, lo strato gravidico, una rianimazione cardiopolmonare prolungata e una TAO con INR > 2. Nei pazienti con controindicazioni relative alla terapia fibrinolitica è consigliabile eseguire un'angioplastica primaria come terapia di riperfusione.

La rivascularizzazione del vaso mediante angioplastica presenta grandi vantaggi, ma è limitata dagli alti costi e dalla necessità di disporre di un laboratorio di emodinamica; di conseguenza, nell'ambito di una grande struttura ospedaliera con un team di esperti di cateterismo cardiaco l'intervento di angioplastica rappresenta la strategia terapeutica ottimale. Il campo di applicazione dell'angioplastica si è ampliato anche a causa delle controindicazioni correlate alla terapia fibrinolitica; inoltre in particolari condizioni, quali lo shock cardiogeno ed un pregresso intervento di by-pass chirurgico, la PTCA risulta essere nettamente superiore alla terapia medica.

Generalmente si preferisce ricorrere alla PTCA se il tempo di esordio dell'evento acuto è superiore alle tre ore e se il ritardo prevedibile della PTCA, rispetto alla somministrazione della terapia fibrinolitica, non è superiore all'ora.

La trombolisi è indicata se il paziente non è ad alto rischio o qualora non sia possibile praticare la PTCA entro novanta minuti. Dagli studi attualmente disponibili l'angioplastica primaria vanta nei confronti della trombolisi percentuali di successo superiori, in termini di ricanalizzazione del vaso e di miglior flusso coronarico. In caso di insuccesso della terapia trombolitica si ricorrerà alla PTCA rescue o di salvataggio. Alla terapia ripercussiva, PTCA o trombolisi, è sempre necessario accompagnare una terapia in grado di favorire la ripercussione, di prevenire la rilocclusione (ASA, eparina) e di migliorare la risposta miocardica all'ischemia (β -bloccanti, nitrati, Ace-inibitori).

5. INTERVENTO CORONARICO PERCUTANEO

Negli ultimi dieci anni si è assistito ad una crescita esponenziale delle procedure di rivascularizzazione percutanea, da quando nel 1977 Andreas Gruentzig eseguì la prima procedura di angioplastica, dilatando una stenosi critica dell'arteria discendente anteriore. Nel 1986 Jacques Puel e Ulrich Sigwart inserirono i primi stent metallici in una coronaria umana. (Dotter, et al, 1964). Oggi la PTCA con oltre 3 milioni di interventi ogni anno rappresenta il principale intervento terapeutico maggiore (Figura 15).

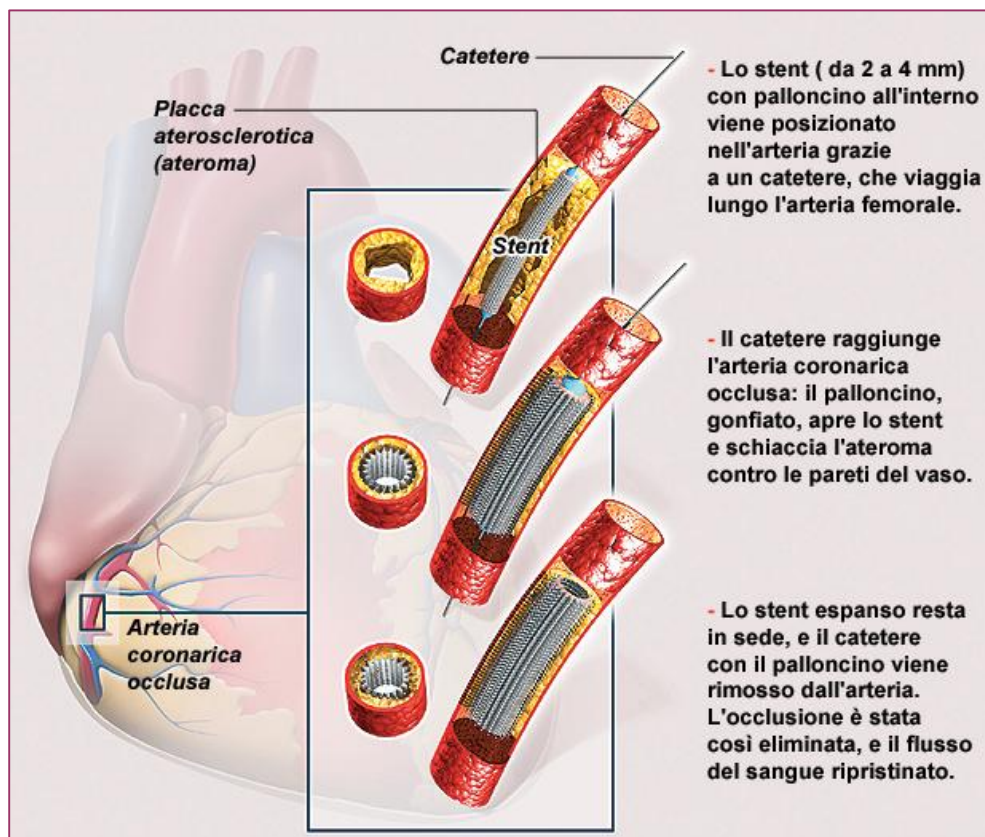


Figura 15 - Intervento coronarico percutaneo (PCI).

Tutti gli interventi coronarici tramite catetere sono derivati del cateterismo cardiaco diagnostico, manovra in cui i cateteri, introdotti nella circolazione arteriosa con la puntura di un vaso, sono fatti avanzare nel cuore. Le procedure interventistiche differiscono da quelle diagnostiche per il fatto che il catetere posto nell'ostio dell'arteria

coronaria stenosata ha un diametro leggermente maggiore e il suo lume è utilizzato per convogliare una guida direzionale flessibile. La guida funge da binario su cui il palloncino per angioplastica e gli altri presidi terapeutici sono fatti passare per dilatare il segmento stenosato della coronaria. Le procedure di rivascolarizzazione prevedono un accesso vascolare generalmente femorale o radiale, più raramente brachiale, attraverso cui vengono introdotti i materiali necessari all'intervento, eseguito sotto guida fluoroscopica.

Le indicazioni cliniche sono: sindrome coronarica acuta, angina pectoris stabile, equivalente anginoso, segni di stenosi alla Tomografia computerizzata, segni obiettivi di ischemia reversibile (ECG, ecocardiografia da sforzo, scintigrafia miocardica, RM, PET).

Le controindicazioni cliniche sono: shock cardiogeno prolungato dopo IMA (insufficienza multiorgano), cardiopatie o altre malattie rapidamente terminali (l'angina non controllabile è un'eccezione).

Le indicazioni angiografiche sono: da una a quattro lesioni idonee per la PCI, occlusione di una lesione per almeno un minuto, reputata non minacciosa per la vita e lesioni sottese a miocardio funzionante e vitale.

Le controindicazioni angiografiche sono: stenosi del tronco comune (con eccezione delle lesioni suscettibili di trattamento, inoperabilità del paziente, protezione da graft o vasi collaterali), equivalenti stenotici del tronco principale dell'arteria coronaria sinistra (con alcune eccezioni), pazienti trivasali (con alcune eccezioni) e lesioni caratteristiche (occlusione totale cronica, bypass coronarico occluso con vena safena di vecchia data e arterie coronarie di piccolo calibro diffusamente interessate).

I limiti sono: mortalità in circa l'1% dei casi, bassa percentuale di successo nelle occlusioni coronariche totali di vecchia data, complicanze

ischemiche acute e tardive in circa il 2,5% dei casi e restenosi clinicamente significative entro i primi mesi, nel 10% dei casi.

I vantaggi sono: elevata percentuale di successo, ripetibilità e bassa incidenza di complicanze dopo le prime 24 ore o di recidive dopo 12 mesi.

Le complicanze degli interventi di PTCA, rare ma possibili, sono: dissezione ed occlusione acuta trombotica del vaso trattato, perforazione coronarica, aritmie cardiache minacciose, embolia nel rene, cervello, intestino (a causa di frammenti di placche aterosclerotiche e piccoli coaguli), insufficienza renale, reazioni allergiche e complicanze di natura vascolare locale come ematoma, trombosi, sanguinamenti delle arterie degli arti (1-5%).

Dagli anni novanta in poi con l'avvento degli stent la situazione si è evoluta sensibilmente, passando da un utilizzo limitato alle sole emergenze, ad un largo impiego pari all'80% delle procedure di rivascolarizzazione percutanea. Lo stent ha rivoluzionato la cardiologia interventistica ed ha definitivamente sostituito l'angioplastica con palloncino nei confronti della quale presenta indubbi vantaggi, come il minor impatto in termini di sollecitudine al rimodellamento vasale, al ritorno elastico e alla restenosi. Infatti le sue principali caratteristiche sono quelle di opporre la massima resistenza al collasso e di distribuire il carico lungo i suoi supporti.

6. IPERPLASIA NEOINTIMALE NELLA RESTENOSI

Nonostante i grandi entusiasmi verso la PTCA e l'affinamento di altre procedure come l'aterectomia direzionale e rotazionale, la brachiterapia, il cutting balloon, lo stenting intrastent, un limite importante resta la restenosi, tanto da parlare ancora di restenosi intrastent come complicanza principale a medio e lungo termine.

Le percentuali di restenosi dopo utilizzo dello stent sono del 30-40% più basse rispetto a quelle dopo angioplastica semplice e sono presenti in circa il 25% dei pazienti. Si riscontrano particolarmente nei pazienti diabetici e con insufficienza renale cronica, in corrispondenza dei vasi di piccolo calibro, lesioni lunghe ed occlusioni croniche (*Kuntz, et al, 1999*). Le possibilità di prevederla con sufficiente sicurezza sono basse, però la relazione inversa tra restenosi e diametro luminale finale, "big is better", è ben supportata ed inoltre è noto che tipi differenti di restenosi, valutati angiograficamente, si correlano a prognosi differenti. I mezzi che permettono di valutarla sono la sintomatologia clinica cioè l'angina, che a volte può mancare (restenosi silente), i test provocativi di ischemia, la scintigrafia, la coro-TC e la coronarografia.

La restenosi è un fenomeno progressivo che inizia nelle primissime ore dopo l'intervento, si completa nei tre-sei mesi successivi ed è dovuta ad un variabile intrecciarsi di meccanismi patogenetici quali il ritorno elastico precoce (recoil), il rimodellamento avventiziale e la proliferazione neointimale.

L'impianto di stent endocoronarici è in grado di eliminare le due componenti meccaniche del processo (recoil e rimodellamento) ma non la proliferazione intimale, che a sua volta rappresenta la reazione infiammatoria della parete vasale indotta dall'impianto dello stent.

La lesione che si verifica dopo PTCA è indotta a livello del rivestimento endoteliale dell'intima. In particolare, l'elevato barotrauma prodotto dal

palloncino determina la distensione meccanica, la denudazione endoteliale e la formazione precoce di un trombo piastrinico.

La denudazione endoteliale innesca una cascata di eventi a cui contribuiscono ormoni vasoattivi (angiotensina II, serotonina, endotelina), fattori di crescita (VEGF, PDGF, EGF, TGF α -b, bFGF), cellule ematiche (leucociti, macrofagi, linfociti), lipidi (colesterolo, ox-LDL).

Tutti questi fattori concorrono all'attivazione delle cellule muscolari lisce (SMC) a cui segue l'espressione di vari oncogeni come *c-jun*, *H-ras*, *c-myc*, *c-fos*. Queste proliferano e migrano nella tonaca intima dove, accumulandosi, determinano la formazione di una struttura denominata "neointima", cioè una ricrescita cellulare lenta ma diffusa su tutta la superficie danneggiata.

Sono state osservate delle correlazioni tra la proliferazione neointimale ed il grado dell'infiammazione nella zona dell'intervento; infatti numerose evidenze sperimentali hanno dimostrato come la grave lacerazione del vaso causi un'infiammazione acuta e un rilascio di citochine che, insieme ai fattori di crescita liberati dai macrofagi e dalle piastrine, risultano responsabili della iperplasia neointimale.

Sebbene i meccanismi molecolari alla base della proliferazione delle SMC non siano ancora completamente conosciuti, è ormai accettato che ad essere coinvolto nella proliferazione neointimale sia una modificazione dei meccanismi che regolano la crescita cellulare. Infatti, vari fattori di crescita liberati dalle cellule circolanti e dalle cellule endoteliali, legandosi a determinati recettori, attivano una cascata di eventi intracellulari con trasduzione del segnale mitogeno dalla membrana citoplasmatica al nucleo, il che conduce, in seguito, alla proliferazione delle SMC.

Evidenze scientifiche indicano che le SMC presenti a livello intimale costituiscono una popolazione cellulare distinta con alterate

caratteristiche, come un' aumentata propensione a proliferare, migrare ed elaborare una maggiore quantità di proteine della matrice extracellulare. Le cellule muscolari intimali mostrano, infatti, un' alterata espressione di fattori di trascrizione, integrine, proteasi, proteine della matrice, fattori di crescita e geni che regolano l'apoptosi (*Ross, et al, 1995*). L'endotelio è coinvolto nella regolazione del processo proliferativo e chemiotattico delle SMC, oltre che nel controllo del tono vasomotorio e dei fenomeni coagulativi.

L'insorgenza della restenosi dovuta all'iperplasia neointimale sembra essere determinata, almeno parzialmente, da cause di natura immunologica ed infiammatoria, ma l'interazione tra lo stimolo (stent o palloncino) e l'intensità della reazione individuale, in gran parte determinata geneticamente, gioca sicuramente un ruolo fondamentale nella modulazione della risposta neointimale (*Biasucci, et al, 1999*). Infatti è stato osservato che un polimorfismo delle glicoproteine IIIa e un aumento dei livelli plasmatici dell'enzima di conversione dell'angiotensina (ACE) sarebbero associati ad una maggiore incidenza di restenosi. Lo stimolo iniziale, responsabile della ricrescita intimale, appare non molto differente da quello che sta alla base di una reazione da corpo estraneo, come dimostra l'afflusso di numerosi elementi cellulari di tipo infiammatorio, immediatamente dopo aver trattato un paziente con catetere a palloncino o dopo aver applicato uno stent. L'effetto chemiotattico è determinato dalla produzione e liberazione locale da parte dei macrofagi attivati di molecole infiammatorie, quali IL-6, IL-1 e numerosi fattori di crescita miocellulare. Recenti osservazioni sperimentali suggeriscono che le cellule coinvolte nel fenomeno dell'iperplasia non sono necessariamente quelle "autoctone", già presenti a livello della parete coronarica, ma potrebbero avere un'origine "esogena" e raggiungere l'area coronarica per via ematica. Queste cellule

avrebbero caratteristiche staminali (*vascular smooth muscle cell progenitor*) e sono richiamate nella sede dell'impianto dalla produzione e liberazione di stimoli opsonizzanti e da svariati fattori di crescita cellulare.

Anche i radicali dell'ossigeno (ROS), che sono coinvolti nella patogenesi dell'aterosclerosi, molto probabilmente sono importanti mediatori delle risposte proliferative, ipertrofiche e fibrotiche che frequentemente si verificano nelle arterie dopo PTCA e provocano un restringimento o una restenosi del lume. Infatti l'aumentata produzione di superossidi nei vasi dopo angioplastica ha portato a verificare l'ipotesi che gli antiossidanti possano inibire la restenosi.

Essendo la restenosi, nei pazienti trattati con stent, interamente attribuibile a crescita neointimale e considerata l'impossibilità di limitarla con la sola terapia farmacologica per via sistemica, si è andati verso la creazione degli stent medicati (DES). I DES sono stent le cui superfici sono rivestite da farmaci che impediscono l'eccessiva proliferazione intimale. Data la notevole riduzione della restenosi osservata nei numerosi studi clinici pubblicati, si è assistito ad un ampio e rapido utilizzo dei DES negli Stati Uniti e in Europa ed a un loro uso "off label". Tuttavia i dati pubblicati suggeriscono un cauto utilizzo dei DES nella pratica clinica; essi dovrebbero essere usati solo in quei sottogruppi di pazienti, come i diabetici, che con uno stent tradizionale andrebbero incontro ad una maggiore incidenza di restenosi e di occlusione tardiva, nonché ad un'aumentata mortalità. Tra le maggiori limitazioni degli stent medicati ci sono infatti i costi troppo elevati per la sola riduzione di restenosi.

7. OBIETTIVI DELLA TESI

Scopo della tesi è stato quello di valutare il ruolo della modulazione del sistema immunitario in seguito alla rottura della placca aterosclerotica durante infarto STEMI di alcuni pazienti che sono stati sottoposti ad intervento di angioplastica coronarica primaria presso il Laboratorio di Emodinamica della Divisione di Cardiologia del Policlinico di Tor Vergata di Roma.

Sono stati valutati i principali mediatori del sistema immunitario e più specificamente, la nostra attenzione si è concentrata sulla rilevazione e determinazione quantitativa delle varie interleuchine (INF- γ , IL-17, IL-21, IL-6, IL-10) coinvolte sia durante le fasi dell'immunità innata che di quella adattativa. Si è cercato altresì di capire quali sono i mediatori chimico umorali coinvolti nella fase di instabilizzazione della placca aterosclerotica.

7.1 Materiali, metodi e arruolamento pazienti

Tutti i pazienti sono stati arruolati previo consenso informato scritto ed orale e sono stati informati sullo scopo dello studio, pianificato in accordo con i principi dettati dalle linee guida. Dodici pazienti, tutti di sesso maschile, con età media $58,6 \pm 10$ anni, sono stati sottoposti all'impianto di uno o più stent su coronarie native in seguito al riscontro ECG-grafico di sopraslivellamento del tratto ST-T (STEMI).

La diagnosi d'infarto miocardio veniva posta sulla base dei seguenti criteri:

- 1) Dolore toracico tipico della durata superiore a 30 minuti e resistente alla somministrazione di nitroderivati;*
- 2) Presenza di sopralivellamento del tratto ST $>0,2mV$ in 2 derivazioni contigue dell'ECG a 12 derivazioni;*

- 3) *Incremento dei livelli sierici della creatina chinasi (CPK) maggiori di tre volte rispetto ai livelli basali;*

I criteri d'inclusione allo studio erano i seguenti:

- 1) *Trattamento entro 3 ore dalla sindrome coronarica acuta;*
- 2) *Arteria coronarica responsabile dell'evento infartuale di buon calibro (diametro di riferimento maggiore di 2.5-3 mm).*

Sono stati esclusi dallo studio:

- 1) *Pazienti con allergia a mezzi di contrasto, eparina, aspirina e clopidogrel;*
- 2) *Frazione di eiezione < 25%;*
- 3) *Stroke e TIA da meno di 60 giorni;*
- 4) *Valori di CK > a 3 volte il valore normale;*
- 5) *Creatinina > a 2 mg/dl;*
- 6) *Eccessiva calcificazione o tortuosità del vaso;*
- 7) *Recente sanguinamento;*
- 8) *Infezioni sistemiche in atto;*
- 9) *Arteria coronarica di calibro < a 2 mm;*
- 10) *Shock cardiogeno classe Killip IV.*

Dopo la procedura tutti i pazienti sono stati trattati per un anno con una terapia farmacologica che comprendeva ASA 100 mg, Clopidogrel 75 mg ed Atorvastatina 40 mg. Sono stati impiantati in totale 34 stent.

Non sono stati utilizzati sistemi di protezione distale durante la procedura. Durante la procedura ove possibile e' stata effettuata la trombo aspirazione; e' stato inoltre prelevato un campione ematico dalla coronaria culprit, dalla coronaria non culprit e da un'arteria periferica per la determinazione dei valori delle interleuchine.

I dati clinici, gli ECG seriati ed il dosaggio degli enzimi cardiaci: Troponina I, CPK, CK-MB e Mioglobina sono stati eseguiti prima della procedura, a 6 ore, a 12 ed a 24 ore dopo l'intervento.

In tutti i pazienti è stato effettuato un follow-up clinico mediante visita ambulatoriale con ECG dopo 1, 3 e 6 mesi dalla procedura, è stato inoltre effettuato un follow-up telefonico mensile. Dopo 12 mesi dalla procedura i pazienti sono stati sottoposti a prelievi ematici per la rideterminazione dei valori di IL-6 ed IL-10.

7.2 Coronarografia e PTCA

Le Coronarografia e le PTCA sono state eseguite presso il Laboratorio di Emodinamica del Policlinico di Roma Tor Vergata. Previa sedazione locale con Lidocaina al 10% è stato introdotto un catetere diagnostico in arteria radiale o in arteria femorale. I pazienti che sono stati arruolati presentavano tutti infarti STEMI insorto da meno di tre ore.

7.3 Sistema di tromboaspirazione

Il Percusurge Guardwire Occlusion and Aspiration System (*Medtronic, Santa Rosa, CA, USA*) e' un device di trombectomia costituito da tre principali componenti: il GuardWire Temporary Occlusion Catheter, il Microseal Adapter e l'Export Aspiration Catheter.

PercuSurge GuardWire consiste in una guida d'angioplastica 0.014" inch contenente un lume centrale che comunica all'estremità distale con un palloncino elastomerico di 3-6 mm. Il basso profilo del pallone riduce il rischio d'embolizzazione distale nell'attraversamento della lesione. Il pallone viene gonfiato con mezzo di contrasto diluito distalmente alla lesione "target". Il MicroSeal Adapter consente grazie ad una valvola prossimale al filo guida di controllare il gonfiaggio del pallone, e soprattutto di mantenerlo gonfiato durante la procedura, nonostante la disconnessione del sistema di gonfiaggio. Il completamento della procedura può essere eseguito "over the wire" con device 0.014"

compatibili. In base alla visualizzazione angiografica del trombo o all'entità della stenosi, poteva essere eseguita una predilatazione con pallone d'angioplastica o tromboaspirazione con Export Aspiration Catheter, in casi selezionati si procedeva alla stenting diretto. I campioni ematici sono stati prelevati tramite il catetere di tromboaspirazione ed inviati presso i nostri laboratori dove sono stati processati entro sessanta minuti dal prelievo senza mai superare la temperatura di 4°C, utilizzando il metodo della citofluorimetria a flusso.

7.4 Citofluorimetro

La valutazione dei sottotipi cellulari presenti nel sangue prelevato è stata effettuata con citofluorimetria (*sistema BD FACSCalibur™*), tecnica che permette la misurazione e la caratterizzazione di cellule sospese in un mezzo fluido. La CFM permette lo studio del sistema immunitario grazie all'utilizzo di anticorpi monoclonali marcati con fluorocromi. Pertanto è stato possibile individuare l'espressione delle interleuchine nelle diverse subpopolazioni in base all'interazione con lo specifico anticorpo. L'elaborazione dei dati è stata eseguita grazie al computer collegato allo strumento, che tramite specifici software provvede a tradurre i segnali in grafici e alla loro rappresentazione su display video in tempo reale.

7.5 Analisi statistica

I dati sono stati presentati come media \pm errore standard (*SEM*). Le analisi statistiche tra i diversi gruppi sono state effettuate con analisi della varianza (*ANOVA*) utilizzando un programma *Systat*. Quando si identificava un effetto significativo, veniva applicato un *test di Tukey* per paragonare ogni valore medio. Venivano considerate significative variazioni di $p < 0,05$.

8. RISULTATI

I risultati preliminari ottenuti dal nostro gruppo ed i dati pubblicati sulle riviste internazionali allo stato dell'arte sottolineano il fondamentale ruolo dell'immunità innata e di quella adattativa nell' aterosclerosi, nelle sue fasi iniziali, nella progressione e nelle complicazioni dovute all'instabilizzazione della placca, alla rottura del cappuccio fibroso ed all'occlusione dell'arteria coronaria provocando una necrosi a valle del vaso ostruito. Il nostro lavoro si è prefisso tra gli obiettivi principali quello di chiarire dei passaggi fondamentali che tutt'oggi *in vivo* sull'uomo risultano ancora poco chiari. Il nostro obiettivo è stato infine quello di studiare e caratterizzare il ruolo svolto dai più importanti biomarkers implicati nella destabilizzazione della placca, ciò sarebbe di cruciale importanza non solo per la stratificazione del profilo di rischio del paziente ma anche per la nascita di nuove terapia immunogenetiche.

I nostri dati preliminari hanno evidenziato una maggiore espressione di INF- γ , IL-21 ed IL-17 da parte delle popolazioni linfocitarie esistenti nel sangue prelevato dalla coronaria culprit rispetto ai prelievi effettuati nella coronaria non culprit e nel sangue arterioso periferico (*Figura 16 - 17 - 18 - 19 - 20*).

Questo pattern citochinico di tipo Th1 sembra essere coinvolto nei meccanismi difensivi contro vari tipi di infezioni in particolar modo di batteri extracellulari, funghi e nella patogenesi di modo disordini autoimmunitari. Negli ultimi due anni sono stati fatti numerosi progressi nella caratterizzazione di nuove linee linfocitarie, particolare interesse viene destato dai linfociti Th17, i quali sembrano produrre un pattern citochinico proinfiammatorio che comprende IL-17 ed IL-21.

Evidenze sperimentali sottolineano una relazione d'interdipendenza esistente tra IL-17 ed IL-21. Recenti studi sui Th17 hanno evidenziato come IL-17 sembra favorire la produzione di IL-21, che a sua volta

stimola la proliferazione linfocitaria. I nostri dati preliminari indicano una aumentata concentrazione di queste interleuchine a livello del sangue prelevato dalla coronaria culprit, con una differenza significativa nella loro espressione a livello del sangue prelevato dalla coronaria sana e dal circolo arterioso periferico. E' inoltre interessante notare, come nel nostro campione non vi siano differenze significative in termini quantitativi per quel che riguarda le popolazioni cellulari coinvolte nel processo infiammatorio, che risultano ugualmente ridistribuite nella coronaria culprit, nella coronaria sana e nel sangue periferico.

Ciò che cambia fondamentale nei tre diversi campioni prelevati è l'attivazione cellulare e l'espressione d'interleuchine infiammatorie, il che sottolinea la differente modulazione immunitaria a livello della placca aterosclerotica responsabile della sindrome coronaria acuta.

Inoltre i nostri studi si sono rivolti al ruolo svolto dall'IL-6 e dall'IL-10 in quanto recenti studi (*Lukasz K et al, 2008*) hanno dimostrato che il territorio cardiaco che subisce un evento ischemico va spesso incontro ad un fenomeno noto con il nome di "rimodellamento" a causa di fenomeni infiammatori ed immunologici che causano la sostituzione del tessuto necrotico con il tessuto cicatriziale. E' stato inoltre dimostrato che i processi infiammatori svolgono un importante ruolo nei cambiamenti bioumorali che avvengono nell'area non sottoposta ad insulto ischemico come un aumento di volume delle camere cardiache ed un cambiamento della massa muscolare del ventricolo sinistro, questo processo è appunto noto con il nome di "rimodellamento cardiaco postinfartuale".

Si presume che l'aumento e l'attivazione persistente di fattori proinfiammatori, tra cui IL-6, possano aumentare il danno a carico del miocardio fino ad arrivare inesorabilmente fino alle fasi terminali dello scompenso cardiaco. Al contrario, fattori antinfiammatori, in particolare IL-10, esercitano un'azione protettiva attraverso l'inibizione di eccessiva

attivazione. L'obiettivo dello studio è stato quindi quello di valutare i livelli sierici di fattori proinfiammatori, e antinfiammatori nelle fasi acute ed a distanza di 12 mesi dopo l'evento coronario.

I nostri dati preliminari suggeriscono che nella fase acuta dello STEMI livelli sierici dei fattori proinfiammatori come IL-6 e antinfiammatori come IL-10 sono aumentati; ma l'aumento di IL-6 e di IL-10 indica un aumento del rapporto a livello prevalentemente nell'attivazione di fattori proinfiammatori. Si è in seguito osservata una notevole e significativa diminuzione del livello dei fattori proinfiammatori, suggerendo il ripristino naturale che avviene a distanza di qualche mese tra l'attivazione dei processi pro e anti infiammatori (*Figura 21 – 22*).

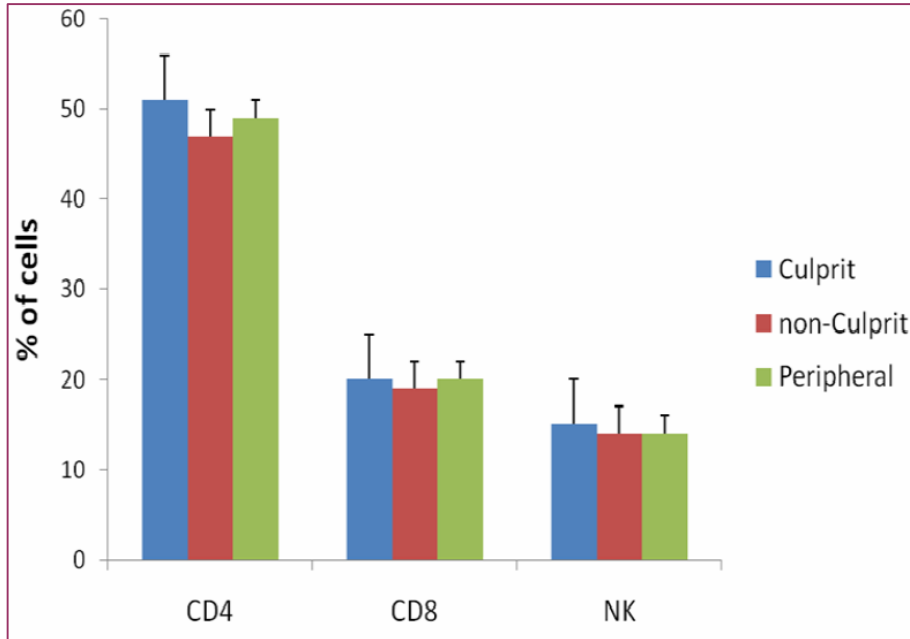


Figura 16 - Percentuale di cellule (CD4+, CD8+, NK).

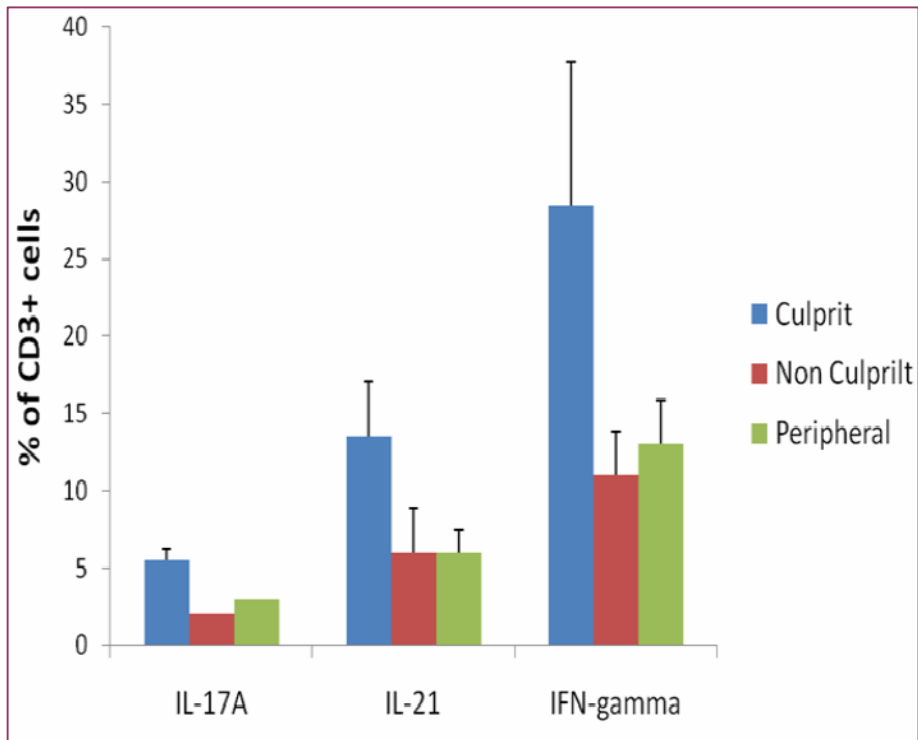


Figura 17 - Percentuale di cellule CD3+ che esprimono (IL-17A - IL-21 - IFN- γ).

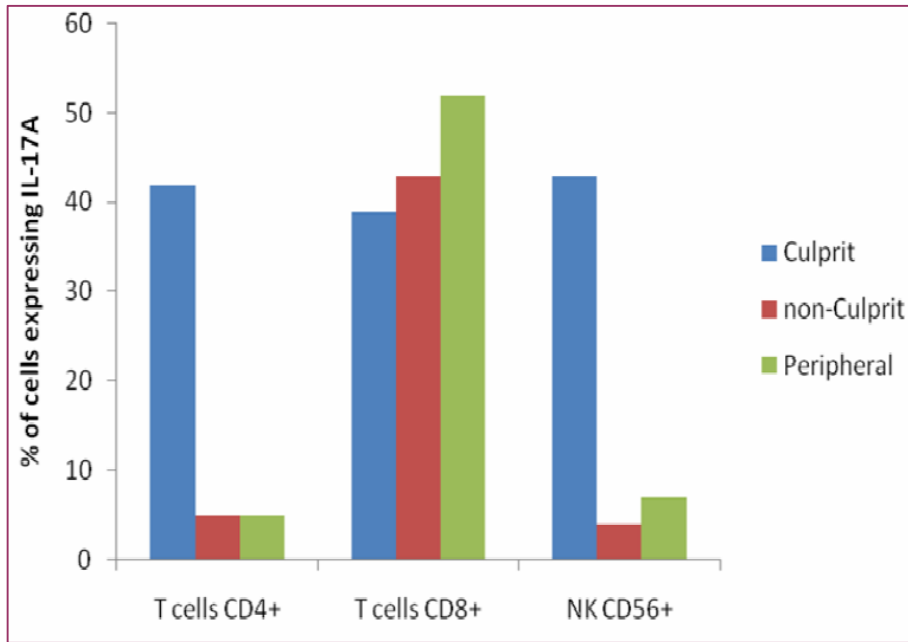


Figura 18 - Percentuale di cellule (CD4+, CD8+, NK) che esprimono IL-17A.

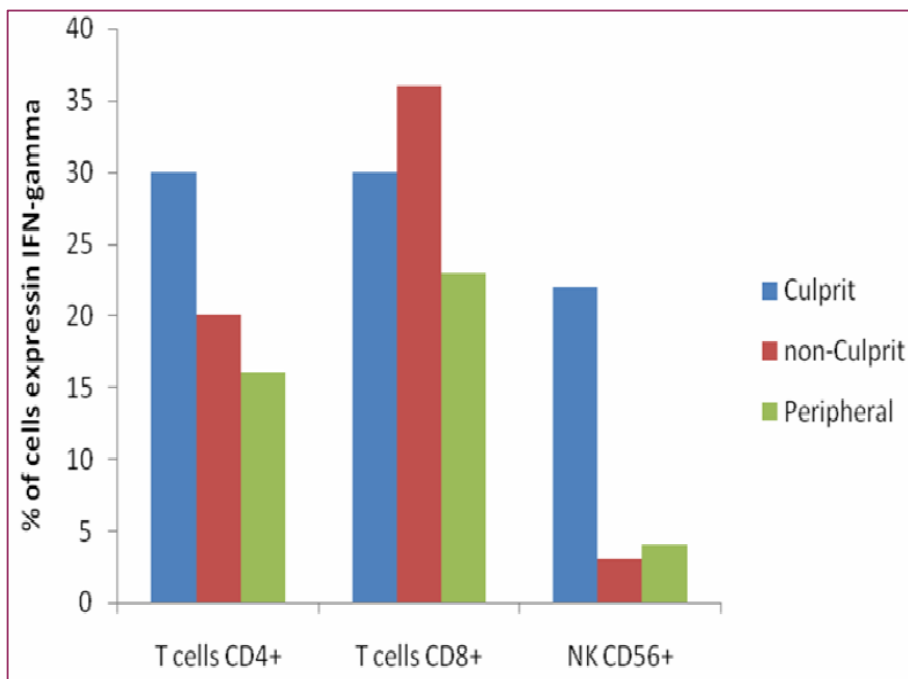


Figura 19 - Percentuale di cellule (CD4+, CD8+, NK) che esprimono IFN- γ .

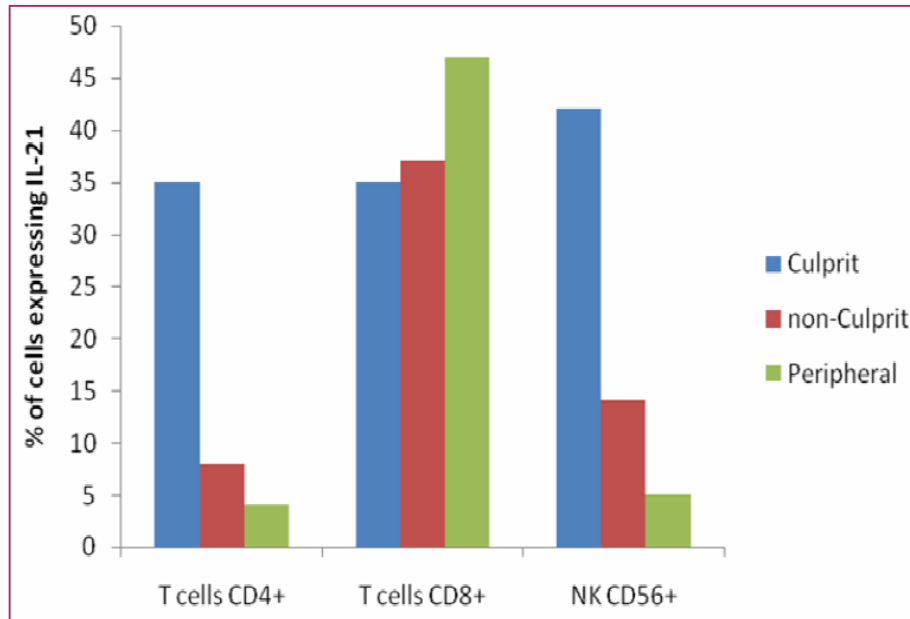


Figura 20 - Percentuale di cellule (CD4+, CD8+, NK) che esprimono IL-21.

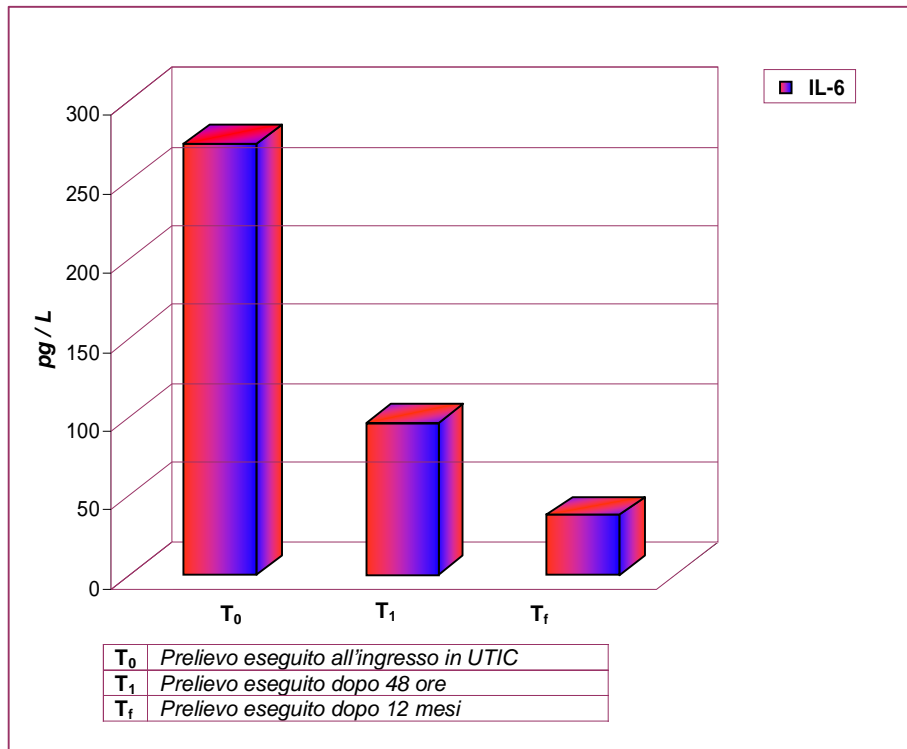


Figura 21 - Variazioni delle concentrazioni sieriche di IL-6 in seguito all'IMA

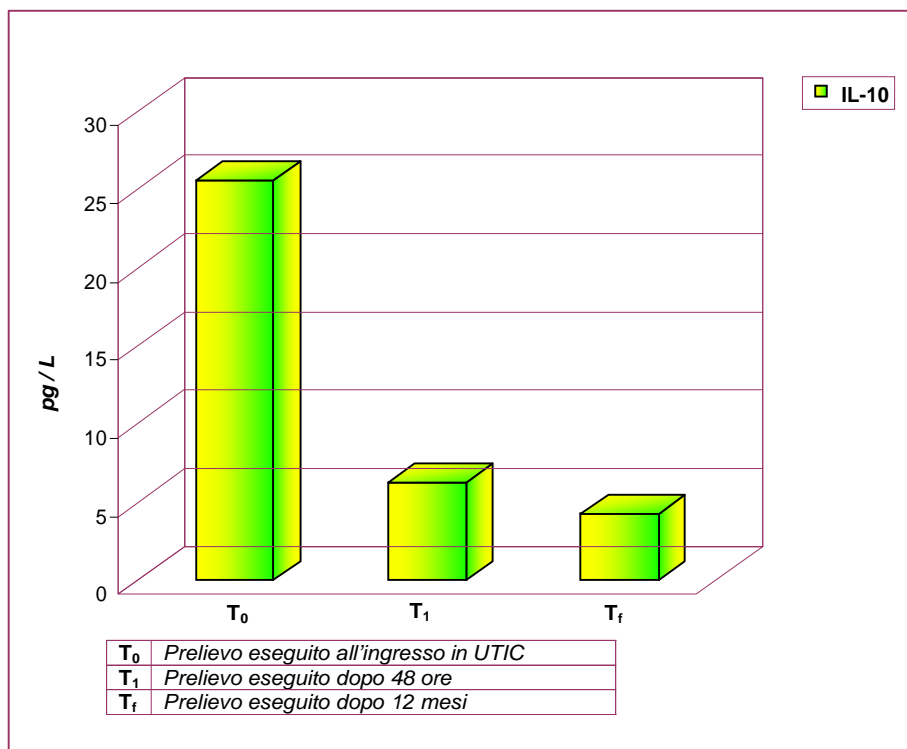


Figura 22 - Variazioni delle concentrazioni sieriche di IL-10 in seguito all'IMA

9. DISCUSSIONE

L'aterosclerosi, a lungo considerata una patologia essenzialmente legata all'accumulo di lipidi all'interno della tonaca intima, oggi è riconosciuta come un processo degenerativo infiammatorio cronico ad etiologia multifattoriale che pur manifestandosi clinicamente nell'adulto, trova prodromi sin dalla giovane età. Il coinvolgimento dell'immunità innata e adattativa è un'evidenza scientifica, in base al rilevamento di cellule infiammatorie che mediano la progressione ateromasica sino alla sua complicanza trombotica in base a un network citochino raffinato e ben integrato e a un bilancio non ben modulato tra risposta infiammatoria proaterogena e antiaterogena studiata in modelli animali, in topi knockout per geni codificanti recettore per LDL (LDLR) e per le Apo E. Ciò suppone sempre più a favore di una risposta immuno-infiammatoria che coinvolge prevalentemente molecole secrete da linfociti Th1 e Th2, oltre che da linfociti B e da altre cellule tipiche della modulazione della risposta cellulare, come ad esempio i recenti Th17, nati da una modifica dello sviluppo dei linfociti T. Il processo di aterogenosi, quindi, ha essenzialmente una base di predisposizione genetica individuale che conquista sempre più una valenza scientifica attraverso le nuove scoperte sui polimorfismi genici, sui loro riarrangiamenti nel diversificare le tipologie cellulari dell'immunità, i recettori per le LDL, le ox-LDL (LOX-1 e la sua variante LOXINA). Attraverso il nostro studio condotto sui pazienti arruolati, è stato valutato il ruolo della modulazione del sistema immunitario in seguito alla rottura della placca aterosclerotica durante infarto STEMI di alcuni pazienti sottoposti a intervento di angioplastica coronarica primaria presso il Laboratorio di Emodinamica della Divisione di Cardiologia del Policlinico di Tor Vergata di Roma. Sono stati valutati i principali mediatori del sistema immunitario e, nello specifico, la quantità e la varietà di interleuchine coinvolte sia durante la

fase di immunità innata che adattativa. Inoltre, si è cercato di rilevare i mediatori coinvolti nella fase di instabilizzazione della placca. Nonostante l'esiguità del numero dei pazienti in uno studio ancora in corso, i dati preliminari che giungono alla nostra osservazione hanno evidenziato una presenza massiva dell' IFN- γ , dell'IL-17 e dell'IL- 21 nelle coronarie affette dalla lesione rispetto a quelle esenti e rispetto alle arterie periferiche. Inoltre, si è notato che non è aumentato il numero delle cellule leucocitarie presenti nelle arterie culprit rispetto alle non culprit e a quelle periferiche, bensì l'attivazione cellulare delle stesse e l'espressione del loro pattern citochinico. E' stato osservato il comportamento di due citochine come l'IL-6 e IL-10 che svolgono un'azione importante nel rimodellamento cardiaco di tessuto miocardico che, dopo essere stato sottoposto a un insulto ischemico, va incontro a trasformazione di tessuto necrotico in cicatriziale. I nostri dati, benché preliminari, verificano un aumento di citochine proinfiammatorie nell'evento acuto e una diminuzione degli stessi a distanza di qualche mese in base a un intervento operato anche da fattori antinfiammatori. Quindi, si rileva che il bilancio tra questi fattori è rilevante ai fini della progressione della lesione e dello sviluppo di complicanze associate a patologie acute come l'infarto STEMI. E' fondamentale cercare di trovare il corretto assetto immuno-modulatorio per sviluppare una terapia preventiva per affrontare una delle più importanti patologie cliniche che al giorno d'oggi miete il più alto numero di vittime in tutto il mondo occidentale.

Ringraziamenti

Desidero ringraziare il Prof. Francesco Romeo per avermi dato l'opportunità di frequentare il reparto di Cardiologia della Facoltà di Medicina dell'Università degli Studi di Roma "Tor Vergata" e per avermi sostenuto e incoraggiato nel mio percorso universitario.

Un ringraziamento particolare va al Prof. Claudio Cortese per il suo sostegno scientifico.

In ultimo ma non per ultimi, vorrei ringraziare il Dr. Saverio Muscoli per l'aiuto nella realizzazione di questa tesi, ed i miei genitori e i miei amici per avermi dato l'affetto e il coraggio di portare a termine questo percorso.

Bibliografia

Abdelmeguid AE, Topol EJ, Whitlow PL, et al. Significance of mild transient release of CK-MB fraction after PCIs. Circulation 1996;94:1528-1536.

Annuario Statistico Italiano. ISTAT, 2006.

Ahmed WH, Bittl JA, Braunwald E. Relation between clinical presentation and angiographic findings in unstable angina pectoris, and comparison with that in stable angina. Am J Cardiol 1993;72:544-550.

Anderson TJ, Uehata A, Gerhard MD. Close relation of endothelial function in the human coronary and peripheral circulations. J Am Coll Cardiol.; 26: 1235-41; 1995.

Anderson TJ, Gerhard M, Meredith I. Systemic nature of endothelial dysfunction in atherosclerosis. Am J Cardiol; 75:71B-74B; 1995. Anderson JL, Adams CD, Antman EM, et al. ACC/AHA 2007

Guidelines for the management of patients with unstable angina /non-ST-elevation myocardial infarction: a report for the ACC/AHA Task Force on Practice Guidelines. Circulation 2007;116:e148-304.

Andres V, Fisher S, Wearsch P, Walsh K. Regulation of Gbx homeobox gene transcription by a combination of positive factors including myocyte-specific enhancer factor 2. Proc Natl Acad Sci U S A.; 92(4): 1137-41; 1995.

Angioli P, Ducci K, Falsini G, Grotti S, Liistro F, Bolognese. Unità Operativa Malattie Cardiovascolari, Ospedale “ San Donato”, Arezzo. Antman EM, Anbe DT; Armstrong PW, et al. ACC/AHA guidelines for the management of patients with ST-elevation myocardial infarction: a report of the ACC/AHA Task Force on Practice Guidelines. J Am Coll Cardiol 2004 ;44:e1-211.

Akira S, Uematsu S, Takeuchi O, Pathogen recognition and innate immunity, J Infect Chemother. 2008 Apr;14(2):86-92. Epub 2008 Apr 30.

Bavry AA, Kumbhani DJ, Rassi AN, et al. Benefit of early invasive therapy in acute coronary syndromes : a meta-analysis of contemporary randomized clinical trials. J Am Coll Cardiol 2006;48:1319-1325.

Betriu A, Masotti M, Serra A, et al. Randomized comparison of coronary stent implantation and balloon angioplasty in the treatment of the novo coronary artery lesions (START): a four –year follow-up. J Am Coll Cardiol 1999;34:1498-1509.

Biasucci LM, Liuzzo G, Buffon A, Maseri A. The variable role of inflammation in acute coronary syndromes and in restenosis. Semin Intervent Cardiol; 4: 105-10; 1999.

Bobryshev Y.V, Dendritic cells in atherosclerosis: current status of the problem and clinical relevance, Eur. Heart J. 26 (2005) 1700–1704.

Boring L, Gosling J, Cleary M, Charo I.F, Decreased lesion formation in CCR2^{-/-} mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis, *Nature* 394 (1998) 894–897. Braunwald E. Unstable angina: A classification. *Circulation* 1989;80:410-414.

Braunwald E. Unstable Angina: An etiologic Approach to management (editorial). *Circulation* 1998;98:2219-2222.

Braunwald E, Antman EM, Beasley JW, et al. ACC/aha 2002 guideline update for the management of patients with unstable angina and non-ST-segment elevation myocardial infarction –summary article: a report of the ACC/AHA Task Force on Practice Guidelines(Committee on the Management of Patients With Unstable Angina). *J Am Coll Cardiol*2002;40:1366-1374.

Braunwald E, Antman EM, Beasley JW, et al. ACC/AHA Guideline for the management of patients with unstable angina and non-ST-segment elevation myocardial infarction. A report of the American College of Cardiology/American heart Association Task Force on Practice guidelines (Committee on the Management of Patients with Unstable Angina). *J Am Coll Cardiol* 2002;40:1366-1374.

Breslow J.L, Mouse models of atherosclerosis, *Science* 272 (1996) 685–688.

Bresnhan DR, Davis JL, Holmes DR Jr, et al: Angiographic occurrence and clinical correlates of intraluminal coronary thrombus: role of unstable angina. *J Am Coll Cardiol* 6:285-289,1985.

Cacheris PM, Nichols WC, Ginsburg D. Molecular characterization of a unique von Willebrand disease variant. A novel mutation affecting von Willebrand factor/factor VIII interaction. *J Biol Chem.*; 266(21): 13499-502; 1991.

Collins T, Read MA, Neish AS, Whitley MZ, Thanos D, Maniatis T. Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF-kappa B and cytokine-inducible enhancers *FASEB J.* 9(10):899-909; 1995.

Curcio A, Torella D, Chiariello M, Indolfi C, et al. Coated stents: a novel approach to prevent in-stent restenosis. *Ital Heart J* 2002;3(Suppl 4):16s-19s.

Cybulsky M.I, Iiyama K, Li H, Zhu S, Chen M, Iiyama M, Davis V, J.C. Gutierrez Ramos, P.W. Connelly, D.S. Milstone, A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis, *J. Clin. Invest.* 107 (2001) 1255–1262.

Dai G., M.R. Kaazempur-Mofrad, S. Natarajan, Y. Zhang, S. Vaughn, B.R. Blackman, R.D. Kamm, G. Garcia-Cardena, M.A. Gimbrone, Distinct endothelial phenotypes evoked by arterial waveforms derived from atherosclerosis-susceptible and-resistant regions of human vasculature, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101 (2004) 14871–14876.

Davies MJ, Richardson PJ, Woolf N, Katz DR, Mann J. Risk of thrombosis in human atherosclerotic plaques: role of extracellular lipid, macrophage, and smooth muscle cell content. Davies MJ, Thomas AC: Plaque fissuring—the cause of acute myocardial infarction, sudden ischaemic death, and crescendo angina. *Br Heart J* 53:363-373,1985

Davies MJ, Thomas A : Thrombosis and acute coronary-artery lesions in sudden cardiac ischemic death. *N Engl J Med* 310:1137-1140,1984.

Dzau VJ. Pathobiology of atherosclerosis and plaque complications. *Am Heart J* 128 (6 Pt 2):1300-4; 1994.

Division of Cardiovascular, Respiratory, and Neurology Devices Interventional Cardiology Device Branch. Guidance for the Submission of Research and Marketing Application for Interventional Cardiology Device: PTCA Catheters, Atherectomy Catheters, Lasers, and Intravascular Stents. Food and Drug Administration, Center for Devices and Radiological Health, US Dept of Health and Human Services; 1995. May.

De Jaegere P, Serruys PW, Van Es GA, et al. Recoil following Wiktor stent implantation for restenotic lesions of coronary arteries. *Cathet Cardiovasc Diagn* 1994;32:147-156.

De Scheerder I, Wang K, Zhou XR, Verbeken E, Ping Qb, Yanning H, Jianhua H, Szilerd M, Van de Werf F. Neointimal hyperplasia and late pathologic remodelling in a porcine coronary stent model. *J Invasive Cardiol* 1999;11(1):9-12.

Dotter CT, Judkins MP. Transluminal treatment of arteriosclerotic obstruction: description of a new technique a preliminary report of its application. *Circulation* 1964; 3: 654-670.

Edfeldt K., Swedenborg J., Hansson G.K., Yan Z.Q., Expression of toll-like receptors in human atherosclerotic lesions: a possible pathway for plaque activation, *Circulation* 105 (2002)1158–1161.

Erbel R, Haude M, Hopp HW, et al. restenosis (REST) study: randomized trial comparing stent and balloon angioplasty for treatment of restenosis after balloon angioplasty (abstr) *J Am Coll Cardiol* 1996;27 (Suppl A):139A.

Ferguson RD, Ferguson JG, Lee LI. Endovascular revascularization therapy in cerebral athero-occlusive disease. Angioplasty and stents, systemic and local thrombolysis. *Neurosurg Clin N Am.*; 5(3): 511-27; 1994.

Fischmann DL, Leon MB, Baim DS, et al. A randomized comparison of coronary stent placement and balloon angioplasty in the treatment of coronary artery disease. *N Engl J Med* 1994;331:496-501.

Federazione Italiana di Cardiologia. Struttura e organizzazione funzionale della cardiologia. *Ital Heart J Suppl* 200;4:881-930.

Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes. Part 1. N Engl J Med 1992;326:242-250.

Geng YJ, Libby P. Evidence for apoptosis in advanced human atheroma. Colocalization with interleukin-1 beta-converting enzyme. Am J Pathol; 147(2):251-66; Comment:147(2):229-34;1995

George J, Afek A, Gilburd B, Blank M, Levy V, Aron-Maor V, Levkovitz H, Shaish M, Goldberg I, Kopolovic J, Harats D, Shoenfeld Y, Induction of early atherosclerosis in LDLreceptordeficient mice immunized with beta2-glycoprotein I, Circulation 98 (1998) 1108–1115.

George J, Harats D, Gilburd B, Afek A, Levy Y, Schneiderman J, Barshack I, Kopolovic J, Shoenfeld Y, Immunolocalization of beta2-glycoprotein I (apolipoprotein H) to human herosclerotic plaques: potential implications for lesion progression, Circulation 99 (1999) 2227–2230.

Giuliani R, Gersh J, McGoon D, Hayes L, Schaff V. Mayo clinic, La Pratica della Cardiologia 1039.

Gorlin R. Fuster V. Ambrose JA :Anatomic-physiologic links between acute coronary syndromes (editorial).Circulation 74:6-9,1986.

Gulizia M, Martelli E, Milazzo D, et al. Impatto dello stent medicato nella pratica clinica. Ital Heart J Suppl 200;5(8):630-638.

Groyer E., Caligiuri G., Laschet-Khallou J., Nicoletti A.,Aspect immunologiques de l'atherome. Presse Med. 2006; 35:475-86 (2006).

Hansson GK, Libby P (2006) The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. Nat Rev Immunol6:508–519. doi:10.1038/nri1882.

Hansson G.K, Holm J, Jonasson L, Detection of activated T lymphocytes in the human atherosclerotic plaque, Am. J. Pathol. 135 (1989) 169–175.

Hansson G.K, Hellstrand M, Rymo L, Rubbia L, Gabbiani G, Interferon gamma inhibits both proliferation and expression of differentiation-specific alpha-smooth muscle actin in arterial smooth muscle cells, J. Exp. Med. 170 (1989) 1595–1608.

Hamm CW, Braunwald E. A classification of unstable angina revisited. Circulation 200;101:118-122.

Harvey E.J, Ramji D.P, Interferon-gamma and atherosclerosis:pro- or anti-atherogenic? Cardiovasc. Res. 67 (2005) 11–20.

Hoebe K., Georgel P, Rutschmann, S., Du X., Mudd S, Crozat K., Sovath S., Shamel, T., Hartung L., Zahringer U, Beutler B., CD36 is a sensor of diacylglycerides, *Nature* 433(2005) 523–527.

Hoening MR , Doust JA, Aroney CN, et al. Early invasive versus conservative strategies for unstable angina and non-STelevation myocardial infarction in the stent era . *Cochrane Database Syst rev* 2006;3: CD004815.

Hirsch A, Windhausen F,Tijssen JGP, et al. for the ICTUS Investigators. Longterm outcome after an early invasive vs selective invasive treatment strategy in patients with non-STelevation acute coronary syndrome and elevated cardiac troponin T (the ICTUS trial): a follow-up study. *Lancet* 2007;369:827-835.

Hoffmann R, Mintz GS, Dussaillant GR, et al. Patterns and mechanisms of in-stent restenosis. A serial intravascular ultrasound study. *Circulation* 1996;94:1247-1254.

Jawien A, Bowen-Pope DF, Lindner V, Schwartz SM, Clowes AW. Platelet-derived growth factor promotes smooth muscle migration and intimal thickening in a rat model of balloon angioplasty. *J Clin Invest.*; 89: 465-473; 1992.

Jonasson L, Holm Skalli J O, Gabbiani G , Hansson G K, Expression of class II transplantation antigen on vascular smooth muscle cells in human atherosclerosis, *J. Clin. Invest.* 76 (1985) 125–131.

Kaluski E, Tsai S, Klaphoz M. Coronary stenting with MGuard: From conception to Human trials *Cardiovasc Revasc Med* 2008;9:88-94.

Kalusky E, Hauptmann KE, Muller R, Tsai S, Klapholz M, Grube E. Coronary Stenting with MGuard : First-in-man trial. *J Invasive Caediol* 2008;20:511-515. Links.

Kawashima A, Ueda K, Nishida Y,et al. Quantitative angiographic analysis of restenosis of primary stenting using Wiktor Stent for acute myocardial infarction-results from a multicenter randomized PRISAM study. *Circulation* 1999;100(Suppl 1):1-856.

Keeley EC, Boura JA, Grines CL. Primary angioplasty versus intravenous thrombolytic therapy for acute myocardial infarction : a quantitative review of 23randomised trials. *Lancet* 2003;361:13-20.

Kini A, Marmur JD, Kini S, et al. Ck-MB elevation after coronary intervention correlates with diffuse atherosclerosis,and low-to-medium level elevation has a benign clinical course: implications for early discharge after coronary intervention. *J Am Coll Cardiol* 1999;34:663-671.

Kume N, Cybulsky M.I, Gimbrone M.A, Jr., Lysophosphatidylcholine, a component of atherogenic lipoproteins, induces mononuclear leukocyte adhesion

molecules in cultured human and rabbit arterial endothelial cells, *J. Clin. Invest.* 90 (1992) 1138-1144.)

Kuntz RE, Gibson CM, Nobuyoshi M, Baim DS. Generalized model of restenosis after conventional balloon angioplasty, stenting, and directional atherectomy. *J Am Coll Cardiol.*; 21: 15-25; 1993.

Kuntz RE, Safian RD, Carrozza JP, Fishmann RF, Mansour M, Baim DS. The importance of acute luminal diameter in determining restenosis after coronary atherectomy or stenting. *Circulation* 1992;86:1827-1835.

Kuntz RE, Gibson MC, Nobuyoshi M, Baim S. A generalized model of restenosis after conventional balloon angioplasty stenting and atherectomy. *J Am Coll Cardiol* 1993;21:15-25.

Indolfi C, Avvedimento EV, Rapacciuolo A, Di Lorenzo E, Esposito G, Stabile E, Feliciello A, Mele E, Giuliano P, Condorelli GL, Chiariello M. Inhibition of cellular ras prevents smooth muscle cell proliferation after vascular injury in vivo. *Nat. Med.*; 6: 541-545; 1995.

Indolfi C, Di Lorenzo E, Rapacciuolo A, Stingone AM, Stabile E, Torella D, Caputo R, Chiariello F, Tortora G, Chiariello M. 8-Chloro-cAMP inhibits smooth muscle cell proliferation in vitro and neointima formation induced by balloon injury in vivo. *J. Am. Coll. Cardiol.*; 36: 288-93; 2000.

Invasive compared With non-invasive treatment in unstable coronary-artery disease: FRISC II prospective randomised multicentre study. Fragmin and Fast Revascularization during Instability in Coronary Artery Disease Investigators. *Lancet* 1999;354:708-715.

Leon M.L, Zuckerman S.H, Gamma interferon: a central mediator in atherosclerosis, *Inflamm. Res.* 54 (2005) 395-411.

Li D, Mehta J.L. Antisense to LOX-1 inhibits oxidized LDL-mediated upregulation of monocyte chemoattractant protein-1 and monocyte adhesion to human coronary artery endothelial cells. *Circulation.* 101(25), 2889-2895; 2000.

Li D, Williams V, Chen H, Sawamura T, Romeo F, and Mehta J.L. Expression of lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptors during ischemia-reperfusion and its role in determination of apoptosis and left ventricular dysfunction. *J. Am. Coll. Cardiol.* 41(6), 1048-55; 2003.

Liao F, Andalibi A, Qiao JH, Allayee H, Fogelman AM, Lusis AJ. Genetic evidence for a common pathway mediating oxidative stress, inflammatory gene induction, and aortic fatty streak formation in mice. *J Clin Invest.* 94(2): 877-84; 1994.

Liao JK and Laufs U Pleiotropic effects of statins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2005; 45: 89-118.

Libby P Current concepts of the pathogenesis of the acute coronary syndromes. *Circulation* 2001; 104: 365-72.

Linseman DA, Benjamin CW, Jones DA. Convergence of angiotensin II and platelet-derived growth factor receptor signaling cascades in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.*; 270(21): 12563-8; 1995.

Lundberg A.M., Hansson G.K., Innate immune signals in atherosclerosis, *Clin.Immunol* 20:1-11 (2009). **Malatino LS, Grassi R, Stroncanelli B, Polizzi G, Leonardi C, Tamburino C, tamburino G.** Release of immunoreactive endothelin from the heart during percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Am.Hearth J.* 126:700-702 1993

Mango R, Biocca S, Del Vecchio F, Clementi F, Sangiuolo F, Amati F, Filareto A, Grelli S, Spitalieri P, Filesi I, Favalli C, Lauro R, Mehta JL, Romeo F and Novelli G. In Vivo and in Vitro studies support that a new splicing isoform OLR1 gene is protective against acute myocardial infarction. *Circ.Res*; 97:152-158.2005.

Marui N, Offermann MK, Swerlick R, Kunsch C, Rosen CA, Ahmad M, Alexander RW, Medford RM. Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) gene transcription and expression are regulated through an antioxidant-sensitive mechanism in human vascular endothelial cells. *J Clin Invest.* 92(4): 1866-74; 1993.

Metha JL, Romeo F. Inflammation, infection and atherosclerosis: do antibacterials have a role in the therapy of coronary artery disease? *Drugs.* 59 (2): 159-70; 2000.

Mehta JL, Chen J, Hermonat P, Romeo F, Novelli G. Lectin –like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (LOX-1): a critical player in the development of atherosclerosis and related disorders. *Cardiov.Research* 69: 36-45.2006.

Metha SR, Cannon CP, Fox KA, et al. Routine vs selective invasive strategies in patients with acute coronary syndromes: a collaborative meta-analysis of randomized trials. *JAMA* 2005;293:2908-17.

Methe H., Kim J.O, Kofler S., Weis M., Nabauer M., Koglin J, Expansion of circulating Toll-like receptor 4-positive monocytes in patients with acute coronary syndrome, *Circulation* 111 (2005) 2654–2661.

Mintz GS, Kent KM, Pichard AD, Satler LF, Popma JJ, Leon MB. Contribution of inadequate arterial remodeling to the development of focal 95: 1791-1798; 1997.

Myocardial infarction redefined – A consensus document of the Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for redefinition of Myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2000;36:959-969.

Moussa I, Moses J, Di Mario C, et al. Stenting after Optimal Lesion Debulking (SOLD) registry : angiographic and clinical outcome . *Circulation* 1998;98:1604-1609.

Mullick A.E., Soldau K., Kiosses W.B., Bell T., A III, Tobias P.S., Curtiss P.S., Increased endothelial expression of Toll-like receptor 2 at sites of disturbed blood flow exacerbates early atherogenic events, *J. Exp. Med.* 205 (2008) 373–383. Munger TM, Oh JK :Unstable angina . *Mayo Clin.Proc* 65:384-406,1990.

Muscoli C, Sacco I, Alecce W, Palma E, Nistico R, Costa N, Clementi F, Rotiroti D, Romeo F, Salvemini D, Mehta JL, Mollace V. The protective effect of superoxide dismutase mimetic M40401 on balloon injury-related neointima formation: role of the lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1. *Pharmacol Exp Ther.*; 311(1): 44-50; 2004.

Nagase M, Abe J, Takahashi K, Ando J, Hirose S, and Fujita T. Genomic organization and regulation of expression of the lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor (LOX-1) gene. *J. Biol. Chem.* 273, 33702–33707; 1998.

Nagase M, Ando K, Nagase T, Kaname S, Sawamura T, Fujita T. Redox-sensitive regulation of lox-1 gene expression in vascular endothelium. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 281, 720-725; 2001.

Nakashima, Raines E.W., Plump A.S., Breslow J.L., Ross, R Upregulation of VCAM-1 and ICAM-1 at atherosclerosis-prone sites on the endothelium in the ApoE-deficient mouse, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 18 (1998) 842–851.

National Cooperative Study Group: Unstable angina pectoris . I. Report of protocol and patient population. *Am J Cardiol* 37:896-902,1976.

Nordmann AJ, Hengstler P, Harr T, et al. Clinical outcomes of primary stenting versus balloon angioplasty in patients with myocardial infarction: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Med* 2004;116:253-262. *Notizie dal GISE. Attività dei laboratori di emodinamica* 1999. *Emodinamica* 2000;20:10-20.

Ostos M.A., Recalde D., Zakin M.M., Scott-Algara D, Implication of natural killer T cells in atherosclerosis development during a LPS-induced chronic inflammation, *FEBS Lett.* 519 (2002) 23–29.

Otsuin K., Inoue N, S. Kobayashi, R. Shiraki, T. Honjo, M. Takahashi, K. Hirata, S. Kawashima, M. Yokoyama, Enhanced expression of TLR4 in smooth muscle cells in human atherosclerotic coronary arteries, *Heart Vessels* 22 (2007) 416–422.

Packard RR, Lichtman AH and Libby P Innate and adaptive immunity in atherosclerosis. *Semin Immunopathol* 2009 Jun; 31(1): 5–22.

Palinski W, Witztum J.L, Immune responses to oxidative neopeptides on LDL and phospholipids modulate the development of atherosclerosis, *J. Intern. Med.* 247 (2000) 371–380.

Park H, Li Z, Yang X.O, Chang S.H, Nurieva R, Wang Y.H, Wang Y, Hood L, Zhu Z, Tian Q, Dong C, A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17, Nat. Immunol. 6 (2005) 1133–1141.

Peters RJ, Kok WE, Di Mario C, et al. Prediction of restenosis after coronary ballon angioplasty: results of PICTURE (Post-IntraCoronary Treatment Ultrasound Result evaluation) : a prospective multicenter intracoronary ultra sound imaging study Circulation 1997;95:2254-2261.

Powell JS. Inhibitors of angiotensin-converting enzyme prevent proliferative disorders: Sense and antisense. Nat Med. 2: 634-635; 1996.

Puma JA, Sketch MH Jr, Tchong JE, et al. Percutaneous revascularization of chronic coronary occlusions: an overview. J Am Coll cardiol 1995;26:1-11.

Ridker PM, Rifai N, Pfeffer NA, Sacks F and Braunwald E Long-term effects of pravastatin on plasma concentration of CReactin Protein. The Cholesterol and Recurrents Events (CARE) Investigators. Circulation 1999;100: 230-35.

Ross R. Growth regulatory mechanisms and formation of the lesions of atherosclerosis. Ann N Y Acad Sci. 748: 1-4; 1995. Ross R. The patogenesis of atherosclerosis: a prospective for 1990. Nature 362: 801-809; 1993.

Sarkar K, Romeo F, Mehta LJ, et al. Coronary artery restenosis : casula biology and emerging therapeutic strategies. Expert Rev. Cardiovasc. (2006).

Savage MP, Douglas JS, Fishman DL, et al. Stent placement compared with ballon angioplasty for obstructed coronary bypass grafts. Saphenous Vein The Novo Trial Investigators. N Engl J Med 1997;337:740-747.

Sawamura T, Kume N, Aoyama T, Moriwaki H, Hoshikawa H, Aiba Y, Tanaka T, Miwa S, Katsura Y, Kita T, and Masaki T. An endothelial receptor for oxidized lowdensity lipoprotein. Nature 386, 73–77; 19

Scirica BM , Cannon CP , McCabe CH, et al. Prognosis in the Thrombolysis in Myocardial Ischemia registry according to the Braunwald unstable angina pectoris classification . Am J Cardiol 2002;90:821-826.

Serruys PW, Luijten HE, Beatt KJ, et al. Incidence of restenosis after successful angioplasty: a time related phenomenon. A quantitative angiographic study in 342 consecutive patients at 1,2,3 and 4 months. Circulation 1988;77:361-371.

Serruys PW, Kiemeeneij F, Macaja C, et al. A comparison of ballon expandable-stent implantation with ballon angioplasty in patients with coronary artery disease. BENESTENT Study Group. N Eng J Med 1994;331:701-6.

Sherman CT, Litwack F, Grundfest W, et al: Coronary angioscopy in patients with unstable angina pectoris. N Engl J Med 315:913-919,1986.

Tellides G, Tereb D.A, Kirkiles-Smith N.C, Kim R.W, Wilson J.H, Schechner J.S, Lorber M.I, Pober J.S, Interferon-gamma elicits arteriosclerosis in the absence of leukocytes, Nature 403 (2000) 207–211.

The American Heart Association. 1999 Heart and Stroke Statistical Update. Dallas: American Heart Association, 1999 Theroux P, Fuster V. Acute coronary syndromes: Unstable angina and non-Q-wave myocardial infarction. Circulation 1998;97:1195-1206.

Thibert V, Bellucci S, Edelman L, Tandon NN, Legrand C. Quantitation of platelet glycoprotein IV (CD36) in healthy subjects and in patients with essential thrombocythemia using an immunocapture assay. Thromb Haemost.; 68(5): 600-5; Shoenfeld Y, Gerli R, Doria A, Matsuura E et al. Accelerated atherosclerosis in autoimmune rheumatic diseases. Circulation 2005 Nov 22; 112(21): 3337-47.

Skalen K, Gustafsson M, Rydberg E.K, Hulten L.M, Wiklund O, Innerarity T.L, J. Boren, Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis, Nature 417(2002) 750–754.

Smith J.D, E. Trogan, M. Ginsberg, C. Grigaux, J. Tian, M. Miyata, Decreased atherosclerosis in mice deficient in both macrophage colony-stimulating factor (op) and apolipoprotein E, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 92 (1995) 8264–8268.

Stemme V, Faber B, Holm J , Wiklund O, Witztum J.L, Hansson G.K , T lymphocytes from human atherosclerotic plaque recognize oxidized low density lipoprotein, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 92 (1995) 3893–3897.

Vollmar B, Bay W, Ozbek C, Heib KD, Menger MD, Schieffer HJ. Experimental intracoronary stenting: comprehensive experience in a porcine model. Lab Anim 1998;32(2):191-199.

Wu R, Nityanand S, Berglund L, Lithell H, Holm G, Lefvert A.K, Antibodies against cardiolipin and oxidatively modified LDL in 50-year-old men predict myocardial infarction, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 17 (1997) 3159–3163.

Xu X.H, Shah P.K, Faure , E, Equils O, Thomas L, M.C.Fishbein, Luthringer, X.P. Xu, T.B. Rajavashisth, J. Yano, S.Kaul, M. Arditi, Toll-like receptor-4 is expressed by macrophages in murine and human lipid-rich atherosclerotic plaques and upregulated by oxidized LDL, Circulation 104 (2001) 3103–3108.

Zeitler EJ, Schmidtke J, Schoop W. Die Perkutane behandlung von Arteriellen Durchblutungsstörungen der Extremitäten mit Katheter. Vasa 1973; 2:401-404.