

III GIORNATA DI STUDIO

Milano 4 ottobre 2003

IL RISCHIO CARDIOVASCOLARE GLOBALE: RUOLO DELLA SINDROME METABOLICA

**Dipartimento di Scienze Farmacologiche
Università degli Studi di Milano
Via Balzaretti, 9 Milano
AULA MAGNA**



P.za Bernini, 6 20133 Milano
Tel. 02 26681313
Fax. 02 26681107

S.I.S.A. Sezione Regionale Lombarda

PROGRAMMA SCIENTIFICO

ore 9.00 - 9.15	Apertura dei Lavori	A. L. Catapano
ore 9.15 - 9.45	GLI ACIDI BILIARI: DA SEMPLICI DETERGENTI A IMPORTANTI REGOLATORI DEL METABOLISMO LIPIDICO	M. Crestani
ore 9.45 - 10.15	IL RISCHIO CARDIOVASCOLARE GLOBALE UN APPROCCIO FATTIBILE	A. Poli
ore 10.15 - 10.45	LA SINDROME METABOLICA, UN FATTORE DI RISCHIO CARDIOVASCOLARE	E. Manzato
ore 10.45 - 11.15	Pausa Caffè	
ore 11.15 - 12.30	TAVOLA ROTONDA: <i>"Il Rischio cardiovascolare globale: dalla epidemiologia alla pratica clinica"</i>	
	Moderatori:	A. L. Catapano - Presidente SISA Sez. Lombarda O. Brignoli - Vice Presidente SIMG
	Intervengono:	M. Amigoni - Sanità Regione Lombardia G. Bettoncelli - SIMG Lombardia A. Filippi - Area Cardiovascolare SIMG C. Schweiger - A. O. Salvini-Rho Cardiologia F. Lombardi - A. O. S.Paolo-MI Cardiologia A. Poli - Centro Studi dell'Alimentazione NFI
ore 12.30 - 13.30	Pausa Pranzo	
ore 13.30 - 16.00	PRESENTAZIONI COMUNICAZIONI ORALI Sessione A Aula B Sessione B aula C	
ore 16.00 - 16.15	CERIMONIA DI CONFERIMENTO DEL PREMIO PER LA RICERCA "Giovanni Galli" presiede Marzia Galli Kienle	
ore 16.15 - 17.00	PREMIAZIONE "GIOVANI RICERCATORI"	
ore 17.00	ASSEMBLEA SOCI	

ELENCO MODERATORI E RELATORI

III^A GIORNATA DI STUDIO

"Il Rischio Cardiovascolare Globale: Ruolo della Sindrome Metabolica"

Milano 4 ottobre 2003

MODERATORE

Alberico L. CATAPANO

Presidente
S.I.S.A. Società Italiana per lo Studio dell'Aterosclerosi
Sez. Regionale Lombarda
Professore Universitario
Università degli Studi di Milano
Dipartimento di Scienze Farmacologiche
Via Balzaretti, 9 - 20133- Milano

RELATORI

Maurizio CRESTANI

Ricercatore Universitario
Università degli Studi di Milano
Dipartimento di Scienze Farmacologiche
Via Balzaretti, 9 - 20133- Milano

Andrea POLI

Direttore Scientifico
NFI – Centro Studi dell'Alimentazione
Via S. Pietro all'Orto, 17
20100 Milano

Enzo MANZATO

Professore Universitario
Università di Padova
Istituto di Medicina Interna - Clinica Medica I
Via Giustiniani 2
35128 Padova

PRESENTAZIONI ORALI

SESSIONE A - Aula B
ore 13.30 – 16.00

Moderatori: M. Crestani, F. M. Maggi

RIMODELLAMENTO DEL COLLAGENE MEDIATO DA CELLULE MUSCOLARI LISCE UMANE: RUOLO CHIAVE DEL FATTORE DI TRASCRIZIONE NF- κ B

Nicola Ferri, Elaine W. Raines.

Pag. 1

MECCANISMI MOLECOLARI COINVOLTI NELLA MODULAZIONE DELLA ESPRESSIONE DI COX-2 DA PARTE DELLE HDL IN CELLULE ENDOTELIALI UMANE

Callegari E, Norata GD, Inoue H, Catapano A. L.

Pag. 2

LA SOMMINISTRAZIONE CRONICA DI ANGIOTENSINA II STIMOLA L' ESPRESSIONE DELL' mRNA DI PAI-1 NELLE CELLULE MUSCOLARI LISCE DELL' AORTA DI RATTO *IN VIVO*

G. Castoldi, S. Redaelli, C.R.T. di Gioia, A. Stella.

Pag. 3

STUDIO DI MECCANISMI MOLECOLARI DI REGOLAZIONE DELLA GLUCONEOGENESI E DEL CATABOLISMO DEL COLESTEROLO QUALI BERSAGLI DI NUOVE TERAPIE PER IL DIABETE E L' IPERCOLESTEROLEMIA

N. Mitro, E. De Fabiani, D. Caruso, F. Gilardi, A. Vigil Chacòn, C. Godio, M. Crestani e G. Galli

Pag. 4

RUOLO DI ALCUNE ISOFORME DI PKC NELLA MODULAZIONE DELL'ANGIOGENESI INDOTTA DA INSULINA ED ENDOTELINA: STUDI IN VITRO.

Alice Reduzzi, Fabio Pellegatta, Claudia Brambilla, Marta Bragheri, A.L. Catapano

Pag. 5

RUOLO PROTETTIVO DELLE HDL SULL'ESPRESSIONE DELLE MOLECOLE DI ADESIONE INDOTTA DA TNF- α IN CELLULE ENDOTELIALI UMANE

Maria Rosaria Scorca, Angela Pirillo, Alberico L. Catapano.

Pag. 6

IDENTIFICAZIONE DI UN NUOVO LIGANDO DEI RECETTORI PPAR α E γ , POTENZIALE CAPOSTIPITE DI MOLECOLE PER LA TERAPIA DEL DIABETE E DELL'OBESITA'.

C. Godio, A. Pinelli, N. Mitro, F. Loiodice A. Lavecchia, J.C. Fruchart e M. Crestani.

Pag. 7

LA REGOLAZIONE DELLA NO SINTETASI INDUCIBILE DA PARTE DEGLI ESTROGENI E' ALTERATA IN CELLULE MUSCOLARI AORTICHE DI RATTO DIABETICO

Minici C, Cignarella A, Brusadelli A, Bolego C, Maggi A, Puglisi L.

Pag. 8

LA SINTESI DEGLI ACIDI GRASSI POLIINSATURI E' INIBITA IN VIVO, IN CONIGLI IPERCOLESTEROLEMICI, ED IN VITRO DAGLI OSSISTEROLI.

Risé P., Camera M., Caruso D., Ghezzi S. e Galli C.

Pag. 9

IL METABOLISMO DEL COLESTEROLO BILIARE NON E' DIVERSO NEI TOPI A-IMilano E A-IWild-Type K-in NONOSTANTE RISPOSTE MARCATAMENTE DIFFERENTI A DIETE AD ELEVATO CONTENUTO DI COLESTEROLO

Silvia Caligari, Giulia Chiesa, Cinzia Parolini, Donatella Gilio, Miriam M. Cortese.

Pag. 10

PROPRIETA' ANTI-ATEROTROMBOTICHE DELLA ROSUVASTATINA IN TOPI APO E-DEFICIENTI

Monica Canavesi, Mara Monetti, Marina Camera, Roberto Bonzi, Elena Tremoli, Alberto Corsini, Stefano Bellosta.

Pag. 11

EFFETTO DI DIETE A BASE DI PROTEINE DELLA SOJA SULLA PROGRESSIONE DEL TUMORE MAMMARIO IN UN MODELLO TRANSGENICO MURINO

Elena Rigamonti, Giulia Chiesa, Emanuela Disconzi, Sabina Soldati, Mariagrazia Sacco, Maria Rosa Lovati, Cesare R. Sirtori

Pag. 12

PRESENTAZIONI ORALI

SESSIONE B - Aula C
ore 13.30 – 16.00

Moderatori: A. Bossi, D. Sommariva

DISTRIBUZIONE DEI FATTORI DI RISCHIO CARDIOVASCOLARI IN UN CAMPIONE DELLA POPOLAZIONE ITALIANA: DATI PRELIMINARI DELLO STUDIO CHECK

E. Tragni, A. Poli, O. Brignoli, A. Filippi, A. L. Catapano. Pag. 13

VALUTAZIONE DELLA QUALITA' DI VITA NELLA POPOLAZIONE ITALIANA: LO STUDIO CHECK

Lorenzo G. Mantovani, Paola Perelli Cippo, Luciana Scalone, Elena Tragni, Alberico L. Catapano. Pag. 14

LO SPESSORE MEDIO – INTIMALE DELLA CAROTIDE COMUNE E' MODULATO IN MODO INDIPENDENTE DAI LIVELLI PLASMATICI DI COLESTEROLO HDL

Sara Raselli, Franco M. Maggi, Liliana Grigore, Simona Fantappiè, Alessandra Pissarelli, Laura Redaelli, Alberico L. Catapano. Pag. 15

INTIMA - MEDIA THICKNESS (IMT) E SINDROME PLURIMETABOLICA IN UNA POPOLAZIONE ITALIANA

Liliana Grigore, Sara Raselli, Franco M. Maggi, Simona Fantappiè, ²Alessandra Pissarelli,²Laura Redaelli,^{1,2}Alberico L. Catapano. Pag. 16

IL MALESSERE DEL BENESSERE: PREVALENZA DI FATTORI DI RISCHIO CARDIOVASCOLARE IN PAZIENTI DIABETICI DI TIPO 2 DELLA PIANURA BERGAMASCA.

D. Berzi, B. Cremonesi, G. Meregalli, A. Balini, A.M. Sapone e A. C. Bossi. Pag. 17

PREVALENZA DELLA SINDROME METABOLICA IN PAZIENTI CON ECCEDENZIA PONDERALE. EFFETTI DELLA DIETA IPOCALORICA

E. Colombo, F. Muzio, C. Colombo, E. Passaro, D. Ferri, G. Ubezio, C. Nalini, A. Soriani, M. Bottoli, C. Berra, A. Torri, D. Sommariva, A. Branchi. Pag. 18

LA MUTAZIONE S447X DELLA LIPASI LIPOPROTEICA E ATROSCLEROSI CAROTIDEA

S. Fantappiè, S. Raselli, F. M. Maggi, L. Grigore, L. Redaelli e A. L. Catapano. Pag. 19

LE VITAMINE ANTIOSSIDANTI RIDUCONO LO STRESS OSSIDATIVO E IL RIMODELLAMENTO VENTRICOLARE NEI PAZIENTI CON INFARTO MIocardico ACUTO

Donatella Gritti, Chiara Gasparetto Angela Malinverno e Giovanni Ricevuti. Pag. 20

RUOLO PROTETTIVO DI HDL SINTETICHE NEL DANNO DA ISCHEMIA E RIPERFUSIONE: EVIDENZE EX VIVO ED IN VIVO

Marta Marchesi, Erin A. Booth, Cesare R. Sirtori, Charles L. Bisgaier, Benedict R. Lucchesi. Pag. 21

EFFETTO CARDIOPROTETTIVO DELLE HDL SINTETICHE NEL DANNO DA ISCHEMIA E RIPERFUSIONE

Monica Gomaraschi, Giuseppe Rossoni, Cesare R. Sirtori, Guido Franceschini e Laura Calabresi. Pag. 22

LE STATINE SONO PIU' ATTIVE NELL'AUMENTARE LA SINTESI DI ACIDI GRASSI POLIINSATURI A LUNGA CATENA DA PRECURSORI CHE NELL'INIBIRE LA SINTESI DEL COLESTEROLO, IN CELLULE IN COLTURA

Risé P., Ghezzi S. e Galli C. Pag. 23

RIMODELLAMENTO DEL COLLAGENE MEDIATO DA CELLULE MUSCOLARI LISCE UMANE: RUOLO CHIAVE DEL FATTORE DI TRASCRIZIONE NF- κ B

Nicola Ferri¹, Elaine W. Raines.

¹Dipartimento di Scienze Farmacologiche. Università degli Studi di Milano.

Il fattore di trascrizione NF- κ B gioca un ruolo importante nelle prime fasi di sviluppo delle lesioni aterosclerotiche attraverso la regolazione dell'espressione di molecole di adesione da parte di cellule endoteliali, implicate nella diapedesi leucocitaria, e dell'espressione di numerose citochine da parte dei macrofagi infiltratesi nella parete vasale, coinvolte nell'attivazione delle cellule muscolari lisce (CML). E' importante però notare che, studi di immunostochimica, hanno evidenziato l'attivazione di NF- κ B anche in CML all'interno di placche aterosclerotiche umane, ma il significato funzionale ed i fattori che ne determinano lo stato di attivazione non sono ancora del tutto chiari. Studi condotti in fibroblasti umani in coltura hanno però identificato il collagene polimerico di tipo I quale uno dei fattori in grado di attivare NF- κ B. L'accumulo dello stesso collagene rappresenta un evento importante durante lo sviluppo di lesioni aterosclerotiche. Partendo da queste osservazioni, il nostro studio è stato rivolto, dapprima a confermare quanto precedentemente osservato in fibroblasti, in CML in coltura su collagene polimerico, e quindi utilizzare lo stesso modello in vitro al fine di identificare potenziali prodotti genici regolati da NF- κ B coinvolti nel rimodellamento e nella degradazione della matrice extracellulare. I risultati ottenuti attraverso l'analisi della mobilità elettroforetica, dell'attività trascrizionale, e di Western blot per l'inibitore di NF- κ B, I κ B α , hanno permesso di dimostrare che il collagene polimerico di tipo I, ma non quello monomero, è in grado di indurre l'attivazione specifica del fattore di trascrizione NF- κ B, attraverso la fosforilazione e la degradazione di I κ B α . Inoltre, contemporaneamente all'attivazione di NF- κ B, si osserva l'aumentata espressione della metalloproteinasi 1 (MMP1), della MMP2, e del recettore per il collagene l'integrina α 2. Tuttavia, l'inibizione specifica di NF- κ B, attraverso la sovra-espressione retrovirale di I κ B α o del suo mutante stabilizzato non fosforilabile, I κ B α ^{Ser/Ala32,36}, determina il blocco dell'aumento dell'espressione della MMP1 e dell'integrina α 2 in risposta al collagene polimerico, ma non della MMP2. Alla ridotta espressione della MMP1 e dell'integrina α 2 si accompagna la perdita da parte delle CML sia di contrarre che di degradare il collagene, ma l'espressione forzata dell'integrina α 2 o della MMP1 in CML aventi il fattore di trascrizione NF- κ B bloccato da I κ B α ^{Ser/Ala32,36}, determina il completo recupero di tali attività. Il nostro studio ha quindi permesso di caratterizzare un'importante meccanismo di regolazione mediato da NF- κ B coinvolto nel rimodellamento e nella degradazione del collagene attraverso l'espressione sia della MMP1 sia dell'integrina α 2. Quindi, l'accumulo di collagene durante lo sviluppo di lesioni aterosclerotiche potrebbe rappresentare un fattore determinante ai fini dell'attivazione di NF- κ B in CML e dell'espressione di geni, come la MMP1 e l'integrina α 2, implicati nel rimodellamento della parete vasale e potenzialmente nella stabilizzazione della placca aterosclerotica.

MECCANISMI MOLECOLARI COINVOLTI NELLA MODULAZIONE DELLA ESPRESSIONE DI COX-2 DA PARTE DELLE HDL IN CELLULE ENDOTELIALI UMANE

Callegari E*, Norata GD*, Inoue H[§], Catapano AL*.

**Dipartimento di Scienze Farmacologiche, Università di Milano, Italia - §Department of Pharmacology, National Cardiovascular Center Research Institute, Osaka, Japan.*

Numerosi studi epidemiologici hanno correlato alti valori di HDL plasmatiche con una minore insorgenza di patologie cardiovascolari. Il trasporto inverso del colesterolo dai tessuti periferici verso il fegato rappresenta il principale meccanismo ateroprotettivo HDL mediato; tuttavia, sono state evidenziate nuove proprietà antiaterogene associate a questa classe di lipoproteine plasmatiche. In particolare a livello della parete vasale le HDL sono in grado di promuovere il rilascio di PGI-2, prostaciclina ad azione vasorilassante che inibisce l'attivazione piastrinica e leucocitaria. Le HDL, infatti, sono in grado di fornire alle cellule endoteliali acido arachidonico (AA), substrato necessario alla sintesi di PGI-2. La ciclossigenasi (Cox) rappresenta il fattore limitante per la conversione di AA in PGI-2. Esistono due isoforme della ciclossigenasi codificate da geni distinti, Cox-1 e Cox-2. A livello vasale la PGI-2 è prodotta prevalentemente da Cox-2, la cui espressione è modulata dalla cascata intracellulare delle MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase). Nel seguente studio sono stati investigati i meccanismi molecolari coinvolti nell'espressione di Cox-2 mediati da HDL₃ in cellule endoteliali umane.

Metodi e risultati: Cellule endoteliali umane (HUVEC) sono state incubate con HDL₃ (30µg/ml) da 2 a 18 ore. La Cox-2 è indotta in modo tempo dipendente, localizzando attorno alla membrana perinucleare. Le HDL₃ sono in grado di attivare ERK1/2, p38MAPK e CREB. Il promotore della Cox-2 è stato studiato tramite esperimenti di trasfezione transiente ed è stata evidenziata l'importanza del CRE per l'induzione trascrizionale di Cox-2 indotta da HDL₃. Utilizzando inibitori specifici di ERK1/2 e di p38MAPK è stato dimostrato che l'attivazione di p38MAPK, da parte delle HDL₃, è importante sia nella trascrizione di Cox-2 sia nella stabilizzazione del mRNA. La sintesi di PGI-2 aumenta in seguito ad incubazione con HDL₃ (da 73.1 ± 6.8 a 115.4 ± 2.5 pg/mg di proteine cellulari), mentre non si osservano cambiamenti nella sintesi di TXA₂ e PGE₂. L'incubazione con indometacina eptil estere, inibitore selettivo per la Cox-2, riporta il rilascio di prostaciclina in condizioni basali (78.0 ± 10.2 pg/mg di proteine cellulari).

Conclusioni: In cellule endoteliali umane le HDL₃ attivano p38MAPK che regola sia la trascrizione di Cox-2 sia la stabilizzazione del mRNA aumentando il rilascio di PGI-2. Questi dati in conclusione evidenziano un nuovo meccanismo ateroprotettivo esercitato dalle HDL₃.

LA SOMMINISTRAZIONE CRONICA DI ANGIOTENSINA II STIMOLA L' ESPRESSIONE DELL' mRNA DI PAI-1 NELLE CELLULE MUSCOLARI LISCE DELL' AORTA DI RATTO *IN VIVO*

G. Castoldi¹, S. Redaelli¹, C.R.T. di Gioia², A. Stella¹

¹Clinica Nefrologica, Univ. Milano-Bicocca, Osp. San Gerardo, Monza ²Istituto di Anat. Patologica. Univ. La Sapienza, Roma.

Obiettivo: E' noto che l' angiotensina II (Ang II) interviene nei processi di rimodellamento extracellulare e nella fibrinolisi. Il PAI-1, il principale inibitore della fibrinolisi, svolge un ruolo anche nei processi di turnover della matrice extracellulare.

Scopo di questo studio e' valutare *in vivo*: 1) l' effetto della somministrazione cronica di Ang II sull' espressione dell' mRNA di PAI-1 in cellule muscolari lisce di aorta di ratto; 2) la presenza di alterazioni istologiche a livello vascolare.

Metodi: Ratti Sprague-Dawley sono stati stabulati individualmente per 5 settimane. La pressione arteriosa sistolica (SBP) è stata misurata con la tecnica del tail cuff. Dopo la prima settimana (controllo), ai ratti si somministrava Ang II (200 ng/Kg/min; n=7) o veicolo (n=6) per 4 settimane, tramite una minipompa osmotica impiantata sottocute. Al termine del trattamento, i ratti sono stati sacrificati e si prelevava un campione di plasma per misurare l'attività plasmatica della renina (PRA) con dosaggio radioimmunologico. Dalla tonaca media delle aorte si estraeva l' RNA totale, e l'espressione dell' mRNA di PAI-1 e' stata misurata con RT-PCR semiquantitativa. Le aorte sono state sottoposte ad analisi istologica e la quantità di collagene e' stata valutata nella tunica media con la colorazione del rosso Sirio e quantificata usando un programma di analisi computerizzata (Deltasistemi, Roma).

Risultati: I valori misurati dopo le 4 settimane di trattamento sono riportati nella tabella.

	Ang II	veicolo	p
SBP mmHg	221.4 ± 4.9	140.9 ± 7.2	0.0001
PRA AI ng/ml/h	0.02 ± 0.01	2.41 ± 0.4	0.0001
mRNA PAI-1/GAPDH	0.819 ± 0.20	0.056 ± 0.02	0.005
collagene %	0.15 ± 0.02	0.18 ± 0.02	0.16

Conclusioni: I nostri dati dimostrano che *in vivo* la somministrazione cronica di Ang II aumenta l' espressione dell' mRNA di PAI-1 nell' aorta di ratto, prima che si sviluppino alterazioni istologiche a carico della parete vasale.

STUDIO DI MECCANISMI MOLECOLARI DI REGOLAZIONE DELLA GLUCONEOGENESI E DEL CATABOLISMO DEL COLESTEROLO QUALI BERSAGLI DI NUOVE TERAPIE PER IL DIABETE E L' IPERCOLESTEROLEMIA

N. Mitro, E. De Fabiani, D. Caruso, F. Gilardi, A. Vigil Chacòn*, C. Godio, M. Crestani e G.Galli.
*Dipartimento di Scienze Farmacologiche, Università degli Studi di Milano, via Balzaretti 9, 20133 Milano, Italia; * Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Granada, Spain.*

La rimozione del colesterolo dall'organismo avviene attraverso la sua conversione ad acidi biliari. Questa via biosintetica costituisce la tappa finale del "trasporto inverso del colesterolo" dai tessuti periferici al fegato e di conseguenza rappresenta un importante bersaglio farmacologico per lo sviluppo di nuove terapie per la prevenzione del rischio cardiovascolare in soggetti ipercolesterolemici.

La colesterolo 7 α -idrossilasi (CYP7A1), un citocromo P450 localizzato nel reticolo endoplasmico liscio, è l'enzima limitante la via classica di biosintesi degli acidi biliari ed è regolata a livello trascrizionale. Abbiamo dimostrato che gli acidi biliari inibiscono la trascrizione di CYP7A1 reprimendo la capacità di transattivazione di Hepatocyte Nuclear Factor-4 (HNF-4) tramite una via indipendente da Farnesoid X Receptor (FXR), il recettore fisiologico degli acidi biliari. Per comprendere come gli acidi biliari inibiscono la trascrizione di CYP7A1 abbiamo valutato il ruolo di Peroxisome Proliferator Activator Receptor γ Coactivator-1 (PGC-1) e CREB Binding Protein (CBP), due coattivatori che interagiscono fisicamente con HNF-4. In saggi di trasfezione transiente e mediante co-immunoprecipitazione abbiamo dimostrato che gli acidi biliari perturbano l'interazione fra HNF-4 ed i coattivatori considerati.

Poiché il recettore HNF4 è un importante regolatore della trascrizione del gene codificante la fosfoenolpiruvato-carbossichinasi (PEPCK), l'enzima limitante nella gluconeogenesi, abbiamo inoltre valutato il ruolo degli acidi biliari sulla trascrizione di questo gene. Anche in questo caso gli acidi biliari inibiscono la trascrizione del gene della PEPCK e l'effetto inibitorio viene annullato con la sovraespressione dei coattivatori PGC-1 e CBP. La determinazione dei livelli di mRNA di CYP7A1 in colture di cellule HepG2 trattate con un analogo stabile del cAMP, un induttore di PGC-1, ha dimostrato l'aumento dell'mRNA di questo gene e parallelamente della PEPCK. Inoltre, gli stessi risultati sono stati ottenuti in animali sottoposti a dieta ricca in acido colico ed in animali sottoposti a digiuno. La definizione delle vie di trasduzione del segnale che sottendono l'inibizione dei geni PEPCK e CYP7A1 da parte degli acidi biliari apre nuove prospettive per il disegno e lo sviluppo di nuovi farmaci per il trattamento dell'iperlipidemia e del diabete.

RUOLO DI ALCUNE ISOFORME DI PKC NELLA MODULAZIONE DELL'ANGIOGENESI INDOTTA DA INSULINA ED ENDOTELINA: STUDI IN VITRO

*Alice Reduzzi, Fabio Pellegatta, Claudia Brambilla, Marta Bragheri, A.L.Catapano.
Dipartimento di Scienze Farmacologiche, Università di Milano.*

OBIETTIVI. A livello vasale l'insulina modula importanti funzioni quali proliferazione, apoptosi, differenziamento cellulare ed angiogenesi. Condizioni di insulino-resistenza sono spesso caratterizzate da incrementati livelli plasmatici di endotelina. Quest'ultima, è in grado di interferire con l'attività insulinica attraverso l'attivazione di alcune protein chinasi C. Scopo del nostro lavoro è stato quello di valutare, in cellule endoteliali umane, l'azione dell'endotelina sull'attività angiogenetica dell'insulina. Si è valutata quindi l'attività di due protein chinasi importanti nell'angiogenesi quali Akt ed ERK1/2 e per studiare l'angiogenesi in vitro sono stati utilizzati i modelli del Matrigel e delle co-culture endotelio-fibroblasti. Si è infine indagato il ruolo che le diverse isoforme di protein chinasi C svolgono in tali processi angiogenetici. **METODI E RISULTATI.** Sia insulina (100nM) che endotelina (10mg/ml) inducono la fosforilazione di Akt ed di ERK1/2 in maniera rispettivamente PI-3K e MAPK dipendente. L'endotelina non interferisce con l'attivazione insulinica di Akt ed ERK1/2. La stimolazione con gli esteri del forbole (PMA 10-9M) inibisce la fosforilazione di Akt indotta da insulina ed endotelina mentre incrementa quella di ERK1/2. Il trattamento con H89 30 μ M e con Rottlerin 1 μ M (inibitori rispettivamente della PKC μ e δ) riduce la fosforilazione di Akt indotta da insulina ed endotelina e aumenta quella di ERK1/2.

In esperimenti di angiogenesi in vitro su matrigel, l'endotelina e l'insulina facilitano la formazione di anelli angiogenetici. La stimolazione con PMA ritarda significativamente la formazione di tali anelli mentre il trattamento con Go6976 1 μ M (inibitore della PKC α) annulla tale inibizione. L'aggiunta di H89 30 μ M e di Rottlerin 1 μ M riduce la formazione di anelli indotta da insulina ed endotelina.

In esperimenti di co-cultura, sia insulina che endotelina inducono la formazione di microtubuli e tale azione è inibita in maniera differente da H89 30 μ M e Rottlerin 1 μ M.

CONCLUSIONI. Alle concentrazioni ed ai tempi usati l'endotelina facilita i processi angiogenetici e non inibisce quelli stimolati dall'insulina. Abbiamo confermato l'importante ruolo che Akt svolge nelle fasi iniziali dell'angiogenesi mentre l'attività di ERK1/2 risulta essere importante nel mediare i fenomeni proliferativi che caratterizzano le fasi successive. I nostri studi hanno altresì individuato l'importante e differente ruolo che alcune isoforme di protein chinasi C rivestono nel modulare il processo angiogenetico. Le isoforme diacilglicerolo-dipendenti, in particolare la PKC α , sono in grado di modulare negativamente le fasi iniziali dell'angiogenesi attraverso l'inibizione di Akt, ma ne influenzano positivamente il proseguimento, grazie all'attivazione di ERK1/2, mentre le isoforme δ e μ esercitano invece azioni permissive parzialmente differenti sul processo angiogenetico, grazie alla loro attività di stimolo sull'attività di Akt e di inibizione su quella di ERK1/2.

RUOLO PROTETTIVO DELLE HDL SULL'ESPRESSIONE DELLE MOLECOLE DI ADESIONE INDOTTA DA TNF- α IN CELLULE ENDOTELIALI UMANE

Maria Rosaria Scorca, Angela Pirillo, Alberico L. Catapano.

Dipartimento di Scienze Farmacologiche, Università degli Studi di Milano

Alti livelli di HDL nel plasma proteggono dallo sviluppo dell'aterosclerosi. Uno dei possibili meccanismi attraverso i quali questo effetto si esplica può essere correlato alle proprietà anti-infiammatorie delle HDL, in particolare alla dimostrazione che le HDL possono inibire l'espressione delle molecole di adesione indotta da citochine, nelle cellule endoteliali, un evento precoce nella genesi dell'aterosclerosi. Si è dimostrato, mediante FACS, che le HDL₃ a basse concentrazioni (10-25-50 $\mu\text{g/ml}$) sono in grado di inibire l'espressione di ICAM-1 indotta da TNF- α in HUVEC (16,35% eventi positivi con TNF- α (5 ng/ml), 4,09% in cellule preincubate con le HDL₃ (50 $\mu\text{g/ml}$)). Non vi è perdita apprezzabile di inibizione se le lipoproteine sono rimosse dal medium di coltura dopo 1h di preincubazione (23,79% eventi positivi con TNF- α (5 ng/ml), 4% in cellule preincubate con le HDL₃ (50 $\mu\text{g/ml}$)). Quest'ultima osservazione escluderebbe che l'effetto inibitorio sia attribuibile ad una capacità di legare il TNF- α , ma piuttosto sia legato all'abilità delle lipoproteine di modificare stati metabolici cellulari. Infatti le HDL sono in grado di ridurre lo stress ossidativo indotto da TNF- α (67,49% eventi positivi con TNF- α (5 ng/ml), 40% in cellule preincubate con le HDL₃ (50 $\mu\text{g/ml}$)) e dalle LDL ossidate (62,67% eventi positivi con LDL ossidate, 19,08% in cellule preincubate con le HDL₃ (50 $\mu\text{g/ml}$)); l'effetto anche in questo caso è visibile in maniera più o meno marcata fino a due ore dopo dalla rimozione delle lipoproteine dal medium di coltura (72,57% eventi positivi con TNF- α , 0,21% in cellule preincubate con le HDL₃ (50 $\mu\text{g/ml}$) subito dopo la rimozione delle lipoproteine, 17,62% dopo 1h dalla rimozione e 29,15% dopo 2h dalla rimozione delle HDL). Infine, in seguito alla preincubazione con le HDL, si assiste all'attivazione di ERK1/2, si riscontra una diminuzione dell'attivazione di p38 ed una marcata diminuzione della fosforilazione di I κ B- α , con una conseguente minore attivazione della traslocazione nucleare di NF- κ B e trascrizione di geni coinvolti nel sostenere processi infiammatori. L'elevata efficacia delle HDL, anche a basse concentrazioni, nell'inibire l'espressione delle molecole di adesione indotta da citochine può contribuire agli effetti protettivi di questa classe di lipoproteine nei confronti dell'aterosclerosi.

IDENTIFICAZIONE DI UN NUOVO LIGANDO DEI RECETTORI PPAR α E γ , POTENZIALE CAPOSTIPITE DI MOLECOLE PER LA TERAPIA DEL DIABETE E DELL'OBESITA'

C. Godio, A. Pinelli, N. Mitro, F. Loiodice¹, A. Lavecchia², J.C. Fruchart³ e M. Crestani.
Dipartimento di Scienze Farmacologiche, Università degli Studi di Milano; ¹ Università degli Studi di Bari, ² Università degli Studi di Napoli, ³ Istituto Pasteur di Lille, Francia.

I Peroxisome Proliferator Activated Receptors (α, β, γ) sono recettori nucleari coinvolti nella regolazione di importanti e numerosi processi fisiologici, quali il metabolismo lipidico e glucidico, il differenziamento cellulare, la risposta infiammatoria e rilevanti processi patologici quali diabete di tipo 2, aterosclerosi, obesità e tumori.

Pertanto, vista l'importanza del coinvolgimento di PPARs in tutti questi processi, scopo di questa ricerca è stato lo studio di molecole sintetiche attive sia su PPAR α che su PPAR γ , che possano quindi combinare gli effetti benefici sul metabolismo lipidico e glucidico. In saggi di trasfezione transiente MS39, un analogo chirale dell'acido clofibrico, attiva PPAR α in modo paragonabile ad un composto sintetico di riferimento Wy 14,643 e PPAR γ anche se con potenza ed efficacia inferiori rispetto al rosiglitazone, un noto agonista di questo isotipo recettoriale. In analoghi saggi in cui le cellule trasfettate sono state trattate con combinazioni di MS39 e rosiglitazone, MS39 si è rivelato un agonista parziale di PPAR γ . Per valutare se l'effetto di MS39 fosse mediato da un'interazione diretta con il recettore PPAR γ , abbiamo utilizzato un saggio di protezione dalla proteolisi, in cui MS39 induce un profilo di digestione qualitativamente simile, ma quantitativamente diverso rispetto al rosiglitazone. Ciò è stato confermato con studi computazionali di docking di questa molecola sulla struttura ai raggi X dei recettori PPAR α e γ .

Infine per valutare le proprietà biologiche di MS39, abbiamo utilizzato un saggio di differenziamento fibroblasti murini ad adipociti. MS39 è in grado di indurre un modesto cambiamento di morfologia, decisamente meno marcato rispetto al rosiglitazone, confermando una minor capacità di attivare PPAR γ .

I risultati ottenuti nei nostri saggi *in vitro* indicano che MS39 è un ligando di PPAR α e γ che può essere considerato capostipite di una serie di molecole che combinano effetti positivi sul metabolismo lipidico e glucidico. Inoltre essendo un agonista parziale di PPAR γ potrebbe agire su alcuni meccanismi mediati da tale recettore, quali la sensibilizzazione all'insulina, ma solo in modo marginale su altri, quali ad esempio l'adipogenesi. Tale molecola ed i suoi derivati potrebbero quindi essere utilizzati in patologie caratterizzate da complesse alterazioni del quadro metabolico.

LA REGOLAZIONE DELLA NO SINTETASI INDUCIBILE DA PARTE DEGLI ESTROGENI E' ALTERATA IN CELLULE MUSCOLARI AORTICHE DI RATTO DIABETICO

Minici C, Cignarella A, Brusadelli A, Bolego C, Maggi A, Puglisi L.

Dipartimento di Scienze Farmacologiche, Università di Milano, Via Balzaretti 9, 20133 Milano

In questo studio abbiamo valutato l'espressione e l'attività dell'enzima NO sintetasi inducibile (iNOS) in cellule muscolari lisce (SMC) ottenute dalle aorte di ratti sani e diabetici e la regolazione di questo processo da parte del 17β -estradiolo (E_2).

La cinetica di espressione e l'attività della iNOS in seguito a stimolazione con citochine sono risultate rallentate in SMC diabetiche rispetto alle SMC controllo. I livelli di mRNA e l'attività della iNOS sono diminuiti in seguito al trattamento per 24 ore con concentrazioni crescenti di E_2 (10^{-11} - 10^{-9} M) in SMC controllo ma sono aumentati in SMC diabetiche. Il medesimo trattamento ha ridotto l'espressione della proteina iNOS, misurata con Western blotting, dopo 24 ore di stimolazione in SMC controllo, ma solo dopo 48 ore in SMC diabetiche.

Valutando l'espressione dei recettori degli estrogeni (ER), si è osservato che i livelli di mRNA e di proteina di $ER\alpha$ e $ER\beta$ erano maggiori nelle SMC diabetiche rispetto alle SMC controllo e calavano in entrambi i tipi cellulari dopo la stimolazione con citochine. Il trattamento con E_2 ha regolato positivamente i valori di mRNA e di proteina di $ER\alpha$ in entrambi i tipi cellulari, mentre ha provocato un abbassamento dei livelli di $ER\beta$, che rimanevano comunque significativamente superiori nelle SMC diabetiche.

Inoltre, abbiamo osservato che le due isoforme di ER regolano in modo opposto la iNOS: infatti, mentre il 2,3-bis-(4-idrossifenil)-propionitrile (DPN), un agonista selettivo per $ER\beta$, ha aumentato l'espressione dell'enzima in entrambi i gruppi, il 1,3,5-(4-idrossifenil)-4-propil-1H-pirazolo (PPT), un agonista selettivo per $ER\alpha$, ha diminuito l'espressione della iNOS in SMC controllo senza modificarla nelle SMC diabetiche.

In conclusione, la regolazione negativa della iNOS da parte dell' E_2 nelle SMC appare mediata da $ER\alpha$.

Tale effetto protettivo è attenuato nelle SMC diabetiche a causa di un'alterata espressione funzionale delle due isoforme di ER, la quale può rappresentare un nuovo aspetto della disfunzione vascolare del diabete.

LA SINTESI DEGLI ACIDI GRASSI POLIINSATURI E' INIBITA IN VIVO, IN CONIGLI IPERCOLESTEROLEMICI, ED IN VITRO DAGLI OSSISTEROLI

Risé P., Camera M., Caruso D., Ghezzi S. e Galli C.

Dipartimento di Scienze Farmacologiche, Università degli Studi di Milano

L'ipercolesterolemia indotta nel coniglio con la dieta – generalmente 0.5-2% in peso di colesterolo nella dieta – è un modello ampiamente usato per lo studio dell'aterogenesi. E' inoltre noto che la dieta occidentale contiene colesterolo in forma ossidata (sino all'1%) e che, tra i prodotti di ossidazione non enzimatica del colesterolo, gli ossisteroli sono considerati promotori nello sviluppo dell'aterosclerosi. Questi pertanto possono svolgere un ruolo importante nell'inizio o progressione dell'aterosclerosi oltre che nel coniglio a dieta aterogena anche nell'uomo. Infatti la concentrazione plasmatica del 7β idrossicolesterolo è stata positivamente correlata con l'aumentato rischio di aterosclerosi nell'uomo.

L'effetto degli ossisteroli su altri aspetti del metabolismo lipidico, in particolare quello degli acidi grassi poliinsaturi, non è stato studiato e questo costituisce lo scopo della nostra ricerca.

16 conigli del ceppo New Zealand sono stati divisi in due gruppi: un gruppo controllo (C) – alimentato con dieta standard – ed un gruppo alimentato con la stessa dieta addizionata di 2% colesterolo (HC). Dopo 8 settimane nei conigli HC si è registrato un aumento di lipidi totali plasmatici, colesterolo totale (sia libero che esterificato) e ossisteroli (in particolare 7β idrossicolesterolo e 7 chetocolesterolo) rispetto ai conigli C. Accanto a queste già note variazioni, si è osservato che nei conigli HC vs C i livelli di acido linoleico (18:2 n-6) ed α -linolenico (18:3 n-3) sono aumentati, mentre quelli dei loro derivati più insaturi ed a più lunga catena (AA e DHA) sono diminuiti. In vitro, in cellule THP-1, si è osservato che il 7β idrossicolesterolo 5-10 μ M (cioè concentrazioni inferiori a quelle misurate in vivo nei conigli HC) ma non il colesterolo, inibisce la conversione di 18:2 n-6 e di 18:3 n-3 dopo 48 ore di incubazione. L'inibizione avviene sulle tappe di desaturazione degli acidi grassi; in particolare, il trattamento con 7β idrossicolesterolo determina la riduzione dell'espressione dell'enzima $\Delta 5$ desaturasi già a partire dalle 6 ore.

In conclusione, gli ossisteroli interferiscono con la produzione di acidi grassi poliinsaturi, composti ad attività protettiva a livello cardiovascolare, a partire dai loro precursori sia nei conigli ipercolesterolemici che nelle cellule in coltura.

IL METABOLISMO DEL COLESTEROLO BILIARE NON E' DIVERSO NEI TOPI A-I_{Milano} E A-I_{Wild-Type} K-in NONOSTANTE RISPOSTE MARCATAMENTE DIFFERENTI A DIETE AD ELEVATO CONTENUTO DI COLESTEROLO

Silvia Caligari^a, Giulia Chiesa^a, Cinzia Parolini^a, Donatella Gilio^a, Miriam M. Cortese^a, Edward M. Rubin^b, Cesare R. Sirtori^a

^aDipartimento di Scienze Farmacologiche, Università di Milano, via Balzaretti 9, 20133 Milano, Italia

^bGenome Sciences Department, Lawrence Berkeley National Laboratory, Berkeley, CA 94720, USA

L'apolipoproteina A-I_{Milano} (apoA-I_M), una mutante dell'apoA-I, è clinicamente associata a ridotti livelli di colesterolo HDL, ma è anche in grado di conferire ai portatori una maggiore protezione contro le malattie cardiovascolari. Recentemente, sfruttando il principio della ricombinazione omologa, sono stati generati modelli *knock-in* per l'apoA-I_{Wild-Type} (apoA-I_{WT}) e per l'apoA-I_M. Il modello esprimente l'apoA-I_M ha confermato l'ipoalfalipoproteinemia, attribuibile, almeno in parte, ad una ridotta secrezione epatica della variante. Evidenze cliniche e sperimentali hanno dimostrato la capacità di liposomi contenenti apoA-I_M di rimuovere direttamente il colesterolo dalle arterie. Di conseguenza, è stato esaminato il metabolismo degli steroli biliari nella linea transgenica apoA-I_M *k-in* rispetto a quello della linea apoA-I_{WT} *k-in*. In seguito a trattamento dietetico ad elevato contenuto di colesterolo e acidi grassi saturi, i topi apoA-I_M *k-in* hanno mostrato un aumento dei lipidi e in particolare del colesterolo HDL, suggerendo una maggiore sensibilità allo stimolo dietetico. Inoltre, la secrezione di steroli e di acidi biliari è ridotta nella linea apoA-I_M *k-in*, rivelando un'apparente minore efficienza di eliminazione degli steroli nella bile. D'altra parte, non sono state riscontrate differenze nell'eliminazione di steroli nelle feci tra le due linee murine, quindi la capacità di disporre del colesterolo risulta sostanzialmente invariata tra le due linee transgeniche. Queste conclusioni sono in linea con una buona efficienza dell'apoA-I_M nel processo del trasporto inverso del colesterolo.

PROPRIETA' ANTI-ATEROTROMBOTICHE DELLA ROSUVASTATINA IN TOPI APO E-DEFICIENTI

Monica Canavesi¹, Mara Monetti¹, Marina Camera^{1,2}, Roberto Bonzi^{1,2}, Elena Tremoli^{1,2}, Alberto Corsini¹, Stefano Bellocchi¹.

¹Dipartimento di Scienze Farmacologiche, Università degli Studi di Milano;

²Centro Cardiologico Monzino IRCCS, Milano, Italia.

I processi infiammatori svolgono un ruolo fondamentale nella patogenesi dell'aterosclerosi e mediano diversi stadi nello sviluppo dell'ateroma, dall'iniziale richiamo di leucociti fino alla rottura della placca instabile con conseguente trombosi. L'espressione di molecole di adesione per i monociti, quali VCAM-1 e ICAM-1, da parte delle cellule endoteliali è un passo importante per l'inizio e la progressione della lesione aterosclerotica. Al fine di studiare le proprietà antinfiammatorie e antitrombotiche della nuova statina rosuvastatina, abbiamo valutato il suo effetto sull'espressione di molecole di adesione e fattore tissutale (TF) *in vivo*. Topi apoE-deficienti di 10 settimane sono stati nutriti con una dieta arricchita in colesterolo e contenente o meno rosuvastatina (1, 2 o 10 mg/kg al giorno; n=9 topi per gruppo) per 12 settimane. Al termine del trattamento è stato raccolto il sangue; le aorte sono state isolate e quindi analizzate le valvole aortiche (V) ed il tratto prossimale dell'aorta ascendente (AA). I livelli plasmatici di colesterolo totale e trigliceridi non sono stati modificati dal trattamento con il farmaco. Il trattamento con rosuvastatina ha ridotto l'espressione di ICAM-1 in V (fino ad un 40% di inibizione, $p < 0.01$ alla concentrazione più alta). Il trattamento ha ridotto anche in modo dose-dipendente e significativo l'espressione di ICAM-1 in AA (fino al 50%, $p < 0.001$). In modo analogo, abbiamo osservato un effetto inibitorio della rosuvastatina sull'espressione di VCAM-1 in V fino al 40% ($p < 0.01$ alla concentrazione più alta utilizzata) e in AA (fino al 35%, $p < 0.01$). Inoltre, la rosuvastatina ha ridotto l'accumulo di macrofagi nelle valvole aortiche in modo dose-dipendente e statisticamente significativo (-50%, $p < 0.001$). Infine, l'espressione di TF in AA, indotta in modo significativo dalla dieta ipercolesterolemica, è risultata ridotta in modo consistente in seguito al trattamento con rosuvastatina (-71%, $p < 0.001$ alla dose più bassa utilizzata). I dati ottenuti dimostrano che la rosuvastatina può attenuare il potenziale infiammatorio e trombogenico delle lesioni aterosclerotiche nell'aorta di topi ipercolesterolemici apoE-deficienti attraverso meccanismi indipendenti dalla riduzione del colesterolo, fornendo nuove prospettive informazioni sul complesso meccanismo d'azione delle statine.

EFFETTO DI DIETE A BASE DI PROTEINE DELLA SOJA SULLA PROGRESSIONE DEL TUMORE MAMMARIO IN UN MODELLO TRANSGENICO MURINO

Elena Rigamonti, Giulia Chiesa, Emanuela Disconzi, Sabina Soldati, Mariagrazia Sacco, Maria Rosa Lovati, Cesare R. Sirtori

Dipartimento di Scienze Farmacologiche, Università di Milano

Negli ultimi anni la soja è divenuta un alimento molto popolare tra le popolazioni occidentali grazie ai potenziali effetti protettivi sull'incidenza di osteoporosi, patologie cardiovascolari e alcuni tipi di tumore. Tra le componenti della soja che sembrano rallentare la progressione tumorale, gli isoflavoni hanno riscosso grande interesse e recentemente è emerso un ruolo antitumorale anche di peptidi (es. lunasina).

Scopo del lavoro è stato quello di studiare l'effetto di diete a base di soja sulla progressione tumorale in un modello transgenico di tumore mammario sovraesprimente l'oncogene neu. Questo modello sperimentale presenta diverse analogie con la controparte umana: coinvolge un oncogene implicato nel tumore mammario umano, il tumore si sviluppa con relativa lentezza nell'arco di vita dell'animale e può metastatizzare, prevalentemente a livello polmonare.

Femmine MMTV-neu di 21 giorni sono state suddivise in 4 gruppi e sottoposte per 20 settimane a diversi trattamenti dietetici: isolato proteico di soja, arricchito proteico di soja impoverito in isoflavoni (crocksoj), siero proteine del latte e dieta standard. Al termine dei trattamenti i tumori mammari sono stati prelevati ed è stata condotta un'autopsia completa.

Negli animali alimentati con isolato proteico di soja lo sviluppo tumorale è risultato inferiore al gruppo a dieta standard senza osservare una differenza statisticamente significativa ($p=0.77$). La dieta crocksoj ha determinato una ridotta progressione tumorale che è risultata statisticamente significativa se confrontata alla dieta standard ($p<0.02$). L'esame istologico dei polmoni ha evidenziato la presenza di metastasi nel 100% degli animali a dieta standard ma solo nel 30% di quelli alimentati a crocksoj che presentavano un numero di metastasi inferiore a quello di tutti gli altri gruppi.

I risultati ottenuti suggeriscono, in questo modello animale, un potenziale ruolo protettivo di diete a base di proteine di soja con un ridotto contenuto di isoflavoni dall'insorgenza di tumore mammario. Ulteriori indagini potranno chiarire il ruolo degli isoflavoni e delle proteine della soja nella carcinogenesi.

DISTRIBUZIONE DEI FATTORI DI RISCHIO CARDIOVASCOLARI IN UN CAMPIONE DELLA POPOLAZIONE ITALIANA: DATI PRELIMINARI DELLO STUDIO CHECK

E. Tragni, A. Poli, O. Brignoli*, A. Filippi*, A .L. Catapano.

*Servizio di Epidemiologia e Farmacologia Preventiva (SEFAP), Dipartimento di Scienze Farmacologiche, Università di Milano, *Società Italiana di Medicina Generale (SIMG), Italia*

Le malattie cardiovascolari (CVD) costituiscono la prima causa di mortalità e morbilità nelle società industrializzate. Fattori di rischio, quali ipertensione, dislipidemia, fumo, diabete, hanno un ruolo eziologico determinante nell'insorgenza di queste patologie. Interventi mirati a ridurre i livelli dei fattori di rischio (FR) modificabili producono effetti benefici sul rischio di CVD. E' necessario a tal fine conoscere la distribuzione dei FR nella popolazione italiana per definire strategie generali a livello di sanità pubblica.

Lo studio CHECK si pone appunto l'obiettivo di determinare la distribuzione dei principali FR per le CVD in un campione rappresentativo della popolazione italiana di età compresa tra 40 e 79 anni e di valutare l'incidenza di queste patologie.

CHECK è uno studio osservazionale prospettico che coinvolge circa 700 medici di medicina generale distribuiti in modo uniforme sul territorio nazionale. Ciascun medico arruola 16 pazienti dalle proprie liste con una procedura randomizzata. I pazienti vengono sottoposti una visita standardizzata e ad un prelievo ematico per analisi biochimico-cliniche e genetiche. Successivamente i pazienti vengono seguiti per 10 anni per verificare lo stato di salute e l'eventuale insorgenza di eventi vascolari non fatali e fatali. La struttura portante dello studio è completamente informatizzata.

Ad oggi sono stati arruolati circa 5000 soggetti. Da un'analisi preliminare condotta su 4307 individui, per i quali erano disponibili i dati completi, è risultato che il 49% è di sesso maschile, l'età media è di $57,7 \pm 10,5$ anni, il 20,8% è fumatore, il 74,3% non svolge attività fisica extralavorativa, il 49% assume alcolici.

Nella tabella sottostante sono riportate le caratteristiche fisiologiche e biochimiche (media \pm DS) relative all'osservazione basale:

IMC	26,5 \pm 4,5	FC (bpm)	73,0 \pm 0,2		
PAS (mm Hg)	128,2 \pm 0,3	PAD (mm Hg)	81,2 \pm 1,6	GLU (mg/dL)	97,8 \pm 27,5
CT (mg/dL)	203,7 \pm 35,5	TG (mg/dL)	132,0 \pm 96,0	C-HDL (mg/dL)	54,2 \pm 11,7
C-LDL (mg/dL)	123,4 \pm 29,5	Apo B (mg/dL)	115,1 \pm 25,6	Fibrinogeno (g/L)	3,27 \pm 0,59

Il 38,4% dei soggetti è iperteso, il 9,1% ha il diabete di tipo2, il 51,8% è affetto da ipercolesterolemia, il 42,8% è in sovrappeso, l'8,7% è obeso.

Il 27,2% è in terapia dietetica, il 55,6% ha almeno una prescrizione farmacologica in atto.

Ad oggi si sono verificati 4 eventi fatali (IMA, arresto cardiocircolatorio) e 41 eventi non fatali (IMA, by-pass, PTCA, angina, ictus, claudicatio, tumore e altri a carico del sistema circolatorio).

E' previsto l'arruolamento di circa 9000 soggetti, con i quali terminerà l'osservazione trasversale.

VALUTAZIONE DELLA QUALITÀ DI VITA NELLA POPOLAZIONE ITALIANA: LO STUDIO CHECK

*[§]Lorenzo G Mantovani, *Paola Perelli Cippo, * Luciana Scalone, [§]Elena Tragni, [§]Alberico L Catapano.

*Dipartimento di Scienze Farmacologiche Università degli Studi di Milano - * Centro di Farmacoeconomia, e [§]SEFAP Servizio di Epidemiologia e Farmacologia Preventiva.*

Introduzione ed obiettivo

La valutazione della qualità di vita è una branca della *Outcomes Research* che ha avuto notevoli sviluppi teorici ed applicazioni pratiche negli ultimi due decenni. Tra i diversi strumenti disponibili, l'EuroQol è sicuramente uno di quelli maggiormente diffusi ed utilizzati. Nonostante ciò, non sono disponibili i valori di norma della qualità di vita della popolazione italiana misurati con tale strumento. L'obiettivo di questo studio è stato la valutazione della qualità di vita misurata con l'EuroQol nella popolazione generale italiana di età compresa tra i 40 ed i 79 anni.

Metodi

L'obiettivo dello studio è stato perseguito mediante l'utilizzo dei dati provenienti dallo studio CHECK (Cholesterol and Health: Education, Control and Knowledge). Lo studio CHECK ha per obiettivo quello di descrivere i fattori di rischio cardiovascolare, i costi e la qualità di vita in un campione rappresentativo della popolazione italiana di età compresa tra i 40 ed i 79 anni, arruolato mediante un campione di 700 medici di medicina generale. All'interno dello studio CHECK è stato utilizzato l'EuroQoL, questionario usato soprattutto per le valutazioni economiche, il quale è in grado di descrivere come l'individuo percepisce il proprio stato di salute sia in senso complessivo che per alcuni problemi specifici quali la capacità di movimento, la cura della propria persona, l'ansia e la depressione, la capacità di compiere le attività abituali, il dolore ed il fastidio.

Risultati

La percezione complessiva della qualità di vita della popolazione italiana decresce al crescere dell'età: da circa 80 punti su cento nei quarantenni si scende a poco più di 65 nei settantenni. In generale, gli individui di sesso maschile riportano livelli di qualità di vita superiori rispetto a quelli di sesso femminile. Un ulteriore dato interessante è che, nella popolazione tra i 40 e i 79 anni, più della metà delle donne e circa un terzo circa degli uomini riferisce problemi di ansia e depressione, in modo crescente con l'aumentare dell'età.

Discussione

Il presente studio contribuisce alla descrizione della qualità di vita così come essa viene percepita dagli individui. Esso inoltre ha permesso di fornire la norma dell'EuroQol per la popolazione italiana di età compresa tra i 40 ed i 79 anni.

LO SPESSORE MEDIO-INTIMALE DELLA CAROTIDE COMUNE E' MODULATO IN MODO INDIPENDENTE DAI LIVELLI PLASMATICI DI COLESTEROLO HDL

²Sara Raselli, ^{1,2}Franco M. Maggi, ²Liliana Grigore, ²Simona Fantappiè, ²Alessandra Pissarelli, ²Laura Redaelli, ^{1,2}Alberico L Catapano.

¹Dipartimento di Scienze Farmacologiche, Università di Milano ²Centro Aterosclerosi, Ospedale Bassini, Cinisello B.mo, Milano.

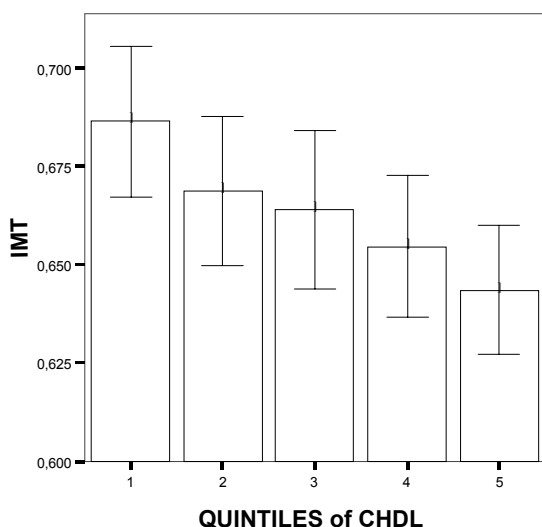
La valutazione dello spessore medio-intimale della carotide comune (IMT: intima-media thickness) in modo non invasivo tramite l'ultrasonografia costituisce un indice surrogato di aterosclerosi. Le lipoproteine ad alta densità sono in grado di ritardare la progressione della malattia aterosclerotica captando dalle cellule endoteliali il colesterolo in eccesso. La misurazione dell'IMT carotideo in soggetti con bassi o alti livelli di HDL, e in pazienti iperlipidemici, indica che basse HDL sono associate ad alto IMT. Rimane da dimostrare se alti livelli di HDL possano avere un ruolo protettivo sull'aterosclerosi carotidea.

Obiettivo di questo studio è quello di indagare la relazione tra i livelli plasmatici di colesterolo HDL e l'IMT della popolazione italiana (n=1386) nell'ambito dello studio PLIC (presenza e progressione delle lesioni intimali carotidee).

Metodi e risultati: dal database generale dei partecipanti allo studio PLIC, sono stati selezionati i soggetti che non erano in trattamento farmacologico con ipolipemizzanti o antiipertensivi e non presentavano malattie epatiche o renali o disfunzione tiroidea.

La tabella sottostante mostra le caratteristiche fisico-biochimiche della popolazione in studio. Tutti i dati sono espressi come media \pm ES.

Età (anni)	PAS/PAD (mmHg)	BMI (Kg/m ²)	C-TOT (mg/dL)	C-LDL (mg/dL)	C-HDL (mg/dL)	TG (mg/dL)	GLU (mg/dL)
55 \pm 1	133/83 \pm 1	29.7 \pm 0.1	222.3 \pm 1	147 \pm 1	54.5 \pm 0.5	106 \pm 2	92 \pm 1



I dati raccolti ci permettono di affermare che, almeno in questa popolazione, l'IMT correla in modo significativo con i fattori di rischio tradizionali per aterosclerosi. In particolare, la relazione inversa tra IMT e lipoproteine ad alta densità è lineare (p del trend < 0.001). All'analisi multivariata, con IMT come variabile dipendente, l'età, la trigliceridemia, la pressione arteriosa sistolica, le HDL e la glicemia sono le variabili indipendenti incluse nel modello matematico. Anche nei soggetti iperlipemici (C-LDL > 130 mg/dL), le HDL mantengono la loro importanza modulatrice sull'IMT.

Conclusioni: la continua, costante diminuzione dell'IMT dal primo quintile di HDL al quinto è la dimostrazione che l'effetto delle HDL è progressivo; il ruolo del colesterolo LDL sull'IMT sembra essere più importante in corrispondenza di livelli medi di HDL, mentre in soggetti iperlipemici le HDL sono i predittori più forti per aterosclerosi carotidea, dopo l'età.

INTIMA-MEDIA THICKNESS (IMT) E SINDROME PLURIMETABOLICA IN UNA POPOLAZIONE ITALIANA

²Liliana Grigore,²Sara Raselli,^{1,2}Franco M. Maggi, ²Simona Fantappiè, ²Alessandra Pissarelli, ²Laura Redaelli,^{1,2}Alberico L. Catapano.

¹Dipartimento di Scienze Farmacologiche, Università di Milano ²Centro Aterosclerosi, Ospedale Bassini, Cinisello B.mo, Milano.

La sindrome plurimetabolica si presenta con una costellazione di fattori di rischio lipidici e non lipidici quali obesità, ipertrigliceridemia, ridotti livelli di colesterolemia HDL, ipertensione arteriosa e iperglicemia e si associa ad un sostanziale aumento della probabilità di sviluppare eventi cardiovascolari.

L'IMT (intima-media thickness) è lo spessore medio intimale dell'arteria carotide. La sua valutazione non invasiva tramite ultrasonografia costituisce un indice surrogato di aterosclerosi infatti, oltre che essere direttamente correlato con la gravità dei diversi fattori di rischio, è anche predittivo di eventi cardiovascolari.

Allo scopo di indagare la relazione tra presenza di sindrome plurimetabolica e alterazione dell'IMT, abbiamo considerato una popolazione dell'area nord di Milano, partecipante allo studio PLIC (Presenza e progressione delle Lesioni Carotidee): dai 1600 soggetti arruolati, si è selezionato un sottogruppo che non fosse in trattamento farmacologico con ipolipemizzanti o antipertensivi (n=1337). Di questi ultimi, 119 soggetti (81 donne e 38 uomini) presentavano le caratteristiche cliniche della sindrome plurimetabolica, secondo i criteri delle linee guida stabilite da NECP 2001. Tutti i dati sono espressi come media \pm ES

Età (anni)	PAS/PAD (mmHg)	BMI (Kg/m ²)	W/H ratio	C-LDL (mg/dL)	C-HDL (mg/dL)	TG (mg/dL)	GLU (mg/dL)
59 \pm 1	144/89 \pm 1	29.7 \pm 0.4	0.9 \pm 0.01	159 \pm 3	41 \pm 0.8	173 \pm 7	101 \pm 2

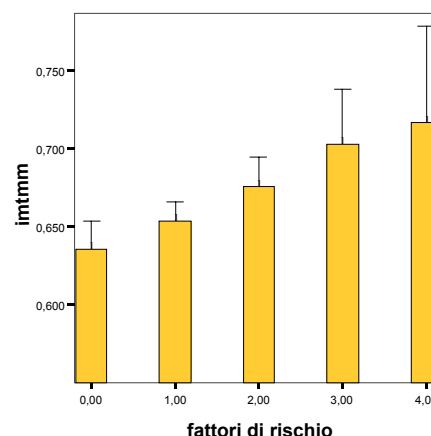
Dei 119 soggetti è stato calcolato il Rischio Cardiovascolare globale (algoritmo dallo studio Framingham), valutato l'IMT mediante ultrasonografia B-Mode e confrontati i valori ottenuti con quelli di una popolazione senza fattori di rischio come controllo (n= 137, stessa età e distribuzione tra i sessi)

	plurimetabolici	popolazione	differenza	significatività
RCV	15.95 \pm 0.85	6.81 \pm 0.35	9.13 \pm 0.87	P < 0.001
IMT (mm)	0.706 \pm 0.165	0.640 \pm 0.012	0.066 \pm 0.019	P < 0.01

Risultati 1: IMT e RCV dei pazienti con sindrome plurimetabolica sono significativamente più elevati rispetto a soggetti sani di sesso ed età confrontabili.

Risultati 2: IMT si dimostra crescente all'aumentare dei fattori di rischio lipidici e non, con un significativo trend lineare (p<0.001).

Conclusioni: la sindrome plurimetabolica si associa a un aumento dell'IMT della carotide. La quantità dei fattori di rischio presenti ha effetti progressivamente additivi sull'aterosclerosi carotidea



IL MALESSERE DEL BENESSERE: PREVALENZA DI FATTORI DI RISCHIO CARDIOVASCOLARE IN PAZIENTI DIABETICI DI TIPO 2 DELLA PIANURA BERGAMASCA.

D. Berzi, B. Cremonesi, G. Meregalli, A. Balini, A.M. Sapone e A. C. Bossi.

U.O. Malattie Metaboliche e Diabetologia – A.O. "Ospedale Treviglio-Caravaggio" - Treviglio (BG)

In un campione di 988 pazienti affetti da diabete mellito tipo 2 sottoposti consecutivamente nell'ultimo anno a Day Hospital diagnostico (per primo riscontro di malattia o per programmato follow-up di complicanze croniche) presso l'Ospedale di Treviglio, è stata valutata la prevalenza dei principali fattori di rischio cardiovascolare. I dati principali sono riportati in Tabella (dati espressi in percentuale e, tra parentesi, in numero assoluto).

M/F (988)	59,7%-40,3%	P.A. Sist. > 135 mmHg	68.5% (677)
Età 30- 50 anni	10.8 % (109)	P.A. Diast. > 85 mmHg	22,2% (220)
Età 51- 70 anni	68.5% (677)	HbA1c > 8 %	41.4% (410)
Età > 71 anni	20.7% (202)	Glic. Basale > 150 mg/dl	36,8% (366)
Col. Totale > 200 mg/dl	56,3% (556)	Glic. Post-pr.> 200 mg/dl	42,4% (419)
LDL-C > 100 mg/dl	75% (741)	Circ. Add.> 88 cm. (F)	92.2% (370)
Trigliceridi > 150 mg/dl	43.2% (427)	Circ. Add. > 102 cm (M)	43,9% (259)
BMI > 25	82,4% (814)	Microalbuminuria > 20 mg/l	29.7 % (294)

Analizzando i dati antropometrici si conferma l'elevata frequenza di sovrappeso (82,4%) o di obesità (BMI > 30: 41,6% - 410 pz.) in pazienti diabetici tipo 2. Peraltro si osserva che la distribuzione addominale del tessuto adiposo è ben maggiore nel sesso femminile (92,2%) rispetto ai maschi (43,9%). Appare significativamente elevata anche la percentuale di soggetti ipercolesterolemici, applicando i criteri diagnostici delle linee guida del NCEP-ATPII (il 75% dei pazienti presenta un valore di LDL-C maggiore di 100 mg/dl). Anche la Pressione Arteriosa non è controllata in modo soddisfacente, specie se si osserva la P.A. Sistolica (68.5% con valori > 135mmHg). Comunque le percentuali di pazienti diabetici che hanno valori clinici o parametri metabolici oltre i limiti considerati accettabili (e quindi che presentano fattori di rischio cardiovascolare) sono così elevate da richiamare l'attenzione dei medici ad un approccio multifattoriale nel trattamento della sindrome plurimetabolica onde cercare di poter prevenire le complicanze croniche micro- e macroangiopatiche

PREVALENZA DELLA SINDROME METABOLICA IN PAZIENTI CON ECCEDENZIA PONDERALE. EFFETTI DELLA DIETA IPOCALORICA

E. Colombo, F. Muzio, C. Colombo, E. Passaro, D. Ferri, G. Ubezio, C. Nalini,

A. Soriani, M. Bottoli, C. Berra, A. Torri, D. Sommariva, A. Branchi*

*Divisione di Medicina Interna 1, Ospedale G. Salvini, Garbagnate Milanese, *Dipartimento di Medicina Interna, Università di Milano, Ospedale Maggiore IRCCS, Milano*

La sindrome metabolica (SM) è caratterizzata dall'aggregazione di numerosi fattori tra cui assumono un significato clinico determinante l'obesità addominale, l'iperglicemia, l'ipertrigliceridemia, la presenza di basse HDL e l'ipertensione arteriosa. Abbiamo studiato 809 pazienti (582 donne e 227 uomini), non-diabetici in sovrappeso, di età compresa tra 20 e 70 anni. La SM, così come definita dal NCEP ATP III, è stata riscontrata nel 39% delle donne e nel 52% degli uomini ($P < 0.001$). Nelle donne l'associazione più frequente di determinanti clinici della SM è risultata costituita da obesità addominale, ipertensione e basse HDL (62%), mentre negli uomini l'associazione più frequente è risultata quella di obesità addominale, ipertensione ed ipertrigliceridemia (50%). La resistenza insulinica, valutata mediante HOMA (Homeostasis Model Assessment) è risultata più elevata nei soggetti con SM che in quelli senza SM (4.7 ± 0.39 vs 2.8 ± 0.20 , $P < 0.001$). Di tutti i soggetti, 148 donne e 63 uomini erano in sovrappeso con un indice di massa corporea (IMC) di 25-29, mentre 434 donne e 164 uomini erano obesi ($IMC \geq 30$). La prevalenza della SM è risultata maggiore negli obesi che nei soggetti in sovrappeso (46% vs 19% nelle donne, $P < 0.001$ e 62% vs 24% negli uomini, $P < 0.001$). I pazienti con SM sono stati inseriti in un programma di terapia comportamentale di gruppo, educazione alimentare e dieta ipocalorica (500 Cal in meno del fabbisogno energetico teorico). Al momento sono disponibili i dati relativi a 78 soggetti (50 donne e 28 uomini) che hanno ottenuto in media un calo ponderale di 7 Kg, una riduzione della colesterolemia del 7%, della trigliceridemia del 26%, della glicemia del 11% e dell'insulinemia del 26%. La pressione sistolica si è ridotta del 11% e la diastolica del 12%. Trentasette soggetti (47%) non risultano più affetti da SM. In conclusione, la SM è più frequente negli uomini che nelle donne ed è identificabile in circa la metà degli uomini e nel 40% delle donne con un IMC maggiore di 25. La prevalenza della SM è in diretta relazione con l'eccesso ponderale e raggiunge il suo massimo nei soggetti obesi. La sua prevalenza è però alta anche nei non obesi, suggerendo la necessità di una sua attiva ricerca e trattamento anche nei soggetti con un IMC compreso tra 25 e 30. La terapia dietetica blanda è in grado di far regredire la SM nella metà dei pazienti già dopo circa 5 mesi.

LA MUTAZIONE S447X DELLA LIPASI LIPOPROTEICA E ATEROSCLEROSI CAROTIDEA

¹S. Fantappiè, ¹S. Raselli, ^{1,2}F. M. Maggi, ¹L. Grigore, ¹L. Redaelli e ^{1,2}A.L. Catapano

¹Centro Aterosclerosi, Ospedale Bassini, Cinisello B.mo, Milano. ²Dipartimento di Scienze Farmacologiche, Università di Milano.

Nella multifattorialità della malattia aterosclerotica, accanto ai fattori di rischio tradizionali, i fattori genetici svolgono un ruolo di primaria importanza. Geni coinvolti nel controllo del metabolismo lipoproteico sono direttamente correlati alla progressione della malattia aterosclerotica ed alle patologie vascolari che da essa conseguono.

Sono state descritte circa 100 diverse mutazioni della lipasi lipoproteica (LPL), numerose ne influenzano le funzioni enzimatiche a diversi livelli. Fra queste, la mutazione Ser447X si realizza a livello del nono esone, dove la sostituzione di una citosina con una guanina porta alla formazione di uno stop codon con la conseguente sintesi di una forma troncata di LPL che manca di due aminoacidi all'estremità carbossiterminale. I portatori della mutazione Ser447X presentano una forma di lipasi lipoproteica con attività superiore rispetto a quella presente nei non portatori.

Scarsi e inconsistenti dati presenti in letteratura non permettono di definire un ruolo per la mutazione Ser447X nello sviluppo della malattia aterosclerotica, scopo del nostro studio è stato, quindi, quello di valutare il ruolo di questa mutazione sullo spessore intima-media (IMT) della carotide comune, indice surrogato di progressione dell'aterosclerosi.

Dai partecipanti ad uno studio di popolazione, condotto nell'area Nord-Milano e che ha coinvolto oltre 2000 soggetti, abbiamo selezionato 1544 soggetti che non assumevano alcuna terapia ipolipemizzante o antiipertensiva e che non presentavano malattie vascolari manifeste.

In tutti i soggetti è stato valutato il profilo lipidico e lipoproteico, la glicemia e lo spessore medio della carotide comune (IMT), mediante ultrasonografia B-mode.

Da questo gruppo abbiamo selezionato i soggetti con un rischio cardiovascolare, calcolato con l'algoritmo dello studio di Framingham (RCV), superiore o uguale al 90° percentile: le caratteristiche di questi soggetti sono riportate nella tabella 1

numero	età	PAS	PAD	BMI	RCV	IMT
148	65 ± 0,1	150 ± 0,2	88 ± 0,1	28 ± 0,1	26,38 ± 0,41	0,77 ± 0,01

In questo gruppo ad elevato rischio abbiamo valutato la presenza della mutazione Ser447X della LPL mediante amplificazione genica e successiva digestione con l'enzima Hinf I: 36 soggetti sono risultati portatori della mutazione, tutti in forma eterozigote (Ser447X +/-).

I due gruppi Ser447X +/- e Ser 447X -/- non presentano differenze nei livelli pressori, nel BMI e nel profilo lipidico e lipoproteico; gli altri parametri valutati sono riportati in tabella 2.

gruppo	numero	età	Glicemia	IMT
Ser447X +/-	36	65,3 ± 1,1	99 ± 2,6	0,75 ± 0,03
Ser447X -/-	111	64,5 ± 0,6	108 ± 2,8	0,78 ± 0,02

I soggetti portatori di mutazione, nonostante l'età più elevata, presentano uno spessore carotideo minore, ai limiti della significatività statistica, rispetto ai non portatori.

Conclusioni: Questo dato suggerisce che la presenza di mutazione S447X della LPL possa svolgere un ruolo protettivo nei confronti della progressione dell'aterosclerosi

Modificazioni in senso anti-aterogeno del profilo lipidico e lipoproteico a digiuno non sembrano essere coinvolte negli effetti della presenza dell'allele mutato, dati preliminari suggeriscono, però, che la mutazione Ser447X migliori la risposta iperlipemica postprandiale: questo possibile meccanismo antiaterogenico verrà indagato nella popolazione in studio.

LE VITAMINE ANTIOSSIDANTI RIDUCONO LO STRESS OSSIDATIVO E IL RIMODELLAMENTO VENTRICOLARE NEI PAZIENTI CON INFARTO MIOCARDICO ACUTO

Donatella Gritti, Chiara Gasparetto, Angela Malinverno e Giovanni Ricevuti.

Dipartimento di Medicina Interna e Terapia Medica, IRCCS Policlinico S. Matteo, Università di Pavia, Italia.

La terapia riperfusiva post infarto può indurre una risposta simile al processo infiammatorio acuto con attivazione delle cellule endoteliali e dei granulociti neutrofilii, e produzione di radicali liberi dell'ossigeno. Inoltre spesso l'infarto miocardico acuto ha come conseguenza il rimodellamento cardiaco con dilatazione del ventricolo sinistro e ipertrofia del tessuto miocardico non infartuato. Queste modificazioni morfologiche possono portare allo sviluppo di insufficienza cardiaca, aritmia, reinfarto e morte.

Per questo studio sono stati arruolati 98 pazienti (25 donne e 73 uomini, di età compresa tra 40 e 86 anni), con diagnosi di infarto miocardico acuto sottoposti a terapia riperfusiva (trombolisi o angioplastica) e randomizzati in doppio cieco in due gruppi per il trattamento con vitamine antiossidenti (Gruppo A) o con placebo (Gruppo P). I pazienti del gruppo A sono stati trattati secondo il seguente schema:

- Prima della riperfusione: Vit C, 1 g in bolo, per via endovenosa;
- Dopo riperfusione, per 30 giorni: Vitamina C, 1 g/die, Vitamina A 50.000 U/die e Vitamina E, 300 mg/die, per via orale;

ai pazienti del gruppo P sono state somministrate lo stesso numero di capsule placebo.

Su campioni di siero ottenuti immediatamente prima della terapia riperfusiva (tempo 0h), 48 ore dopo la riperfusione e dopo un mese di terapia antiossidante continuativa (Follow up) sono stati dosati i livelli di radicali liberi dell'ossigeno (d-ROM test, Diacron srl, Grosseto, Italia) il livello di antiossidenti (P.A.O. kit, Potere Antiossidante, Med.Dia®, Vercelli, Italia) e lo stato di attivazione endoteliale (sVCAM-1 EIA kit, Bender MedSystem, Vienna, Austria). Inoltre tutti i pazienti sono stati sottoposti, prima della terapia riperfusiva, una settimana dopo e al follow up, ad accertamenti ecocardiografici con il rilevamento del volume telediastolico del ventricolo sinistro (VTVV).

Al tempo 0 tutti i pazienti presentavano valori simili per i diversi parametri considerati; dopo 48 ore di terapia antiossidante, i pazienti trattati con antiossidenti presentavano valori di VTVV, dROM e sVCAM-1 significativamente più bassi rispetto al gruppo P, (VTVV, in ml: 119,40 vs 125,12, $p < 0,05$; dROM, in U.Carr, 307,50 vs 335,60, $p < 0,01$; sVCAM-1, in $\mu\text{g/ml}$, 1,63 vs 2,03, $p < 0,05$), mentre il livello di antiossidenti era significativamente più basso nel gruppo P rispetto ad A (TAS, in $\mu\text{M/L}$, 526,47 vs 737,65, $p < 0,01$). Al follow-up non sono state notate differenze significative tra i due gruppi di sVCAM, dROM e TAS, mentre il VTVV rimaneva significativamente più alto nel gruppo P rispetto ad A (132,0 vs 123,40, $p < 0,05$).

Questi dati suggeriscono un effetto endotelio-protettivo della terapia antiossidante dopo IMA. Infatti, i pazienti trattati con placebo presentano segni di stress ossidativo e danno endoteliale in progressione dopo 48 ore dall'evento acuto, con una correlazione positiva con l'aumento di volume del ventricolo sinistro e correlazione negativa con il livello di antiossidenti nel plasma. All'opposto, pazienti trattati con la terapia antiossidante mostrano livelli elevati di antiossidenti, un minor stato di stress ossidativo e di attivazione endoteliale associabili con l'assenza di dilatazione del ventricolo sinistro. Tale effetto protettivo è ancora osservabile ad un mese dall'evento acuto.

RUOLO PROTETTIVO DI HDL SINTETICHE NEL DANNO DA ISCHEMIA E RIPERFUSIONE: EVIDENZE EX VIVO ED IN VIVO

Marta Marchesi¹, Erin A. Booth², Cesare R. Sirtori¹, Charles L. Bisgaier³, Benedict R. Lucchesi²

¹Dipartimento di Scienze Farmacologiche, Italia; ²University of Michigan, USA; ³Esperion Therapeutics, USA.

Il danno cardiaco da riperfusione e' una potenziale conseguenza della rivascolarizzazione coronarica arteriosa in cui si ha liberazione di prodotti di ossidazione con conseguente propagazione del danno tissutale. Vi sono numerose evidenze sperimentali che confermano la capacita' delle HDL di rimuovere i lipidi ossidati e questo ci ha indotto a ipotizzare un loro eventuale ruolo protettivo nel danno da riperfusione. Per verificarne l'efficacia sono stati condotti esperimenti *ex vivo* ed *in vivo* nel coniglio utilizzando HDL sintetiche contenenti apolipoproteina A-I_{Milano} (ETC-216) Negli esperimenti *ex vivo*, svolti in accordo con il metodo Langendorff di cuore isolato, si avevano 10 minuti di equilibratura, 10 minuti di pretrattamento con ETC-216 (0.45 mg/ml) o veicolo, ischemia totale per 30 minuti e riperfusione per un'ora. Si è visto come l'ETC-216 fosse in grado di prevenire l'aumento della pressione di fine diastole ($p < 0.05$) e della pressione di perfusione coronarica ($p < 0.001$) rispetto al gruppo controllo. Nell'ETC-216 si è anche potuto rilevare una riduzione del rilascio di creatina chinasi ($p < 0.001$) e di idroperossidi lipidici (-46%). La microscopia elettronica ha rivelato come l'ETC-216 fosse in grado di prevenire la contrazione delle bande muscolari e la formazione di granuli nei mitocondri. Sulla base di questi risultati si è proceduto con esperimenti *in vivo* utilizzato un modello di occlusione e riperfusione indotta mediante legatura dell'arteria coronarica discendente anteriore (LAD) per 30 minuti. L'ETC-216 o il veicolo sono stati somministrati alle concentrazioni di 100, 10, e 3 mg/kg mediante infusione endovenosa per un'ora a partire da 15 minuti prima dell'induzione dell'occlusione della LAD, durante il periodo di ischemia e protratti per 15 minuti nel periodo di riperfusione di 4 ore. L'area infartuata espressa come percentuale del ventricolo sinistro era sensibilmente ridotta negli animali trattati con ETC-216 alla concentrazione di 100 mg/kg ($p < 0.05$), 10 mg/kg ($p < 0.0001$) e 3 mg/kg ($p < 0.05$). L'ETC-216 (10 mg/kg) o il veicolo sono stati successivamente infusi endovena sempre per un periodo di un'ora iniziando 5 minuti prima della fine dell'ischemia e per i successivi 55 minuti di riperfusione. L'ETC-216 si e' dimostrato in grado di ridurre significativamente l'area infartuata ($p < 0.0005$) e la microscopia elettronica ha confermato i risultati precedentemente osservati nello studio *ex vivo*. Tutto ciò suggerisce come l'ETC-216 sia in grado di limitare il danno da ischemia e riperfusione.

EFFETTO CARDIOPROTETTIVO DELLE HDL SINTETICHE NEL DANNO DA ISCHEMIA E RIPERFUSIONE

*Monica Gomaschi, Giuseppe Rossoni, Cesare R. Sirtori, Guido Franceschini e Laura Calabresi
Centro Grossi Paoletti, Dipartimento di Scienze Farmacologiche, Università degli Studi di Milano*

L'effetto protettivo delle HDL contro le malattie cardiovascolari non è dovuto solamente al loro ruolo nel trasporto inverso del colesterolo, ma anche ad una serie di effetti cellulari addizionali. Abbiamo recentemente dimostrato che le HDL sono in grado di proteggere il cuore dal danno da ischemia e riperfusione (I/R) in un modello di cuore isolato di ratto. Per valutare quale componente delle HDL sia responsabile di tale effetto, sono state preparate HDL sintetiche (sHDL) a partire da apolipoproteina A-I umana purificata (apoA-I) e fosfatidilcolina sintetica. Cuori di ratto sono stati sottoposti ad un'ischemia globale riducendo il flusso di perfusione per 20 minuti ed, in seguito, sono stati riperfusi per 30 minuti. sHDL (0.5-2 mg di proteina/ml), apoA-I purificata, liposomi di sola fosfatidilcolina o volumi equivalenti di soluzione salina sono stati infusi nei 10 minuti antecedenti la riduzione del flusso di perfusione. Nei cuori trattati con la soluzione salina, è stata registrata una netta diminuzione della capacità contrattile del ventricolo sinistro alla riperfusione, unitamente ad un rilascio consistente di creatina chinasi (CK) nell'eluato coronarico. Il trattamento con sHDL previene in modo dose-dipendente il danno da I/R: alla dose di 2 mg/ml la funzionalità del ventricolo sinistro viene ripristinata in modo quasi completo, con una netta riduzione del rilascio di CK. La somministrazione di apoA-I purificata o della sola fosfatidilcolina non comporta un aumento del recupero funzionale alla riperfusione, né una riduzione del rilascio di CK rispetto all'infusione della soluzione salina, indicando che per l'effetto protettivo è necessaria l'associazione tra apoA-I e lipidi. L'effetto cardioprotettivo viene mantenuto anche per infusione delle sHDL dopo l'ischemia, durante i primi 10 minuti di riperfusione. I meccanismi responsabili di tale effetto includono la capacità delle sHDL (1) di stimolare il rilascio di prostaglandine (PGI₂ e PGE₂) e (2) di legare ed inattivare il TNF α , una citochina con un potente effetto cardiottossico. Un'analisi multivariata ha evidenziato che entrambi questi meccanismi sono responsabili in modo indipendente dell'effetto cardioprotettivo mediato dalle sHDL. Questi risultati indicano che le sHDL sono in grado di proteggere il cuore dal danno da I/R, anche quando somministrate durante la riperfusione, suggerendo la possibilità di un impiego terapeutico delle sHDL in una serie di condizioni cliniche caratterizzate dalla presenza di un danno ischemico. L'effetto protettivo potrebbe, inoltre, essere esteso ad altri organi, quali cervello, rene, fegato, milza e polmoni.

LE STATINE SONO PIU' ATTIVE NELL'AUMENTARE LA SINTESI DI ACIDI GRASSI POLIINSATURI A LUNGA CATENA DA PRECURSORI CHE NELL'INIBIRE LA SINTESI DEL COLESTEROLO, IN CELLULE IN CULTURA

Risé P., Ghezzi S. e Galli C.

Dipartimento di Scienze Farmacologiche, Università degli Studi di Milano

Le statine, noti inibitori della sintesi del colesterolo, aumentano la formazione di acidi grassi poliinsaturi a lunga catena (AGP-LC) a partire dai loro precursori, *in vitro*, ed aumentano i livelli plasmatici di AGP *in vivo*. In particolare, la simvastatina aumenta la conversione di acido linoleico (18:2 n-6) ad acido arachidonico (20:4 n-6), oltre a diminuire la sintesi di colesterolo da acetato, in cellule in coltura. Analogamente viene attivata la sintesi di AGP-LC della serie n-3.

Si sono determinate le curve dose-risposta per diverse statine, simvastatina, atorvastatina e fluvastatina - le più utilizzate in clinica - per quanto riguarda l'inibizione della sintesi di colesterolo, a partire da [¹⁴C] sodio acetato, e l'aumento della produzione di 20:4 n-6 a partire da [¹⁴C] 18:2 n-6, in cellule THP-1.

Le tre diverse statine, come atteso, hanno inibito la sintesi di colesterolo in maniera dose-dipendente: la simvastatina è risultata più potente (IC₅₀ 66 nM) di atorvastatina (IC₅₀ 154 nM) e fluvastatina (IC₅₀ 198 nM). La conversione di [¹⁴C] 18:2 n-6 a 20:4 n-6 è invece aumentata a concentrazioni più basse, con EC₅₀ pari a 10 nM per atorvastatina, 24 nM per simvastatina e 39 nM per fluvastatina.

La sintesi di 20:4 a partire da 18:2 è caratterizzata da reazioni di allungamento e desaturazione e gli enzimi $\Delta 6$ (18:2 a 18:3) e $\Delta 5$ (20:3 a 20:4) desaturasi catalizzano le tappe limitanti l'intero processo. L'attività della $\Delta 5$ desaturasi è significativamente influenzata dall'azione delle statine e segue lo stesso andamento della conversione del 18:2 n-6; le EC₅₀ sono rispettivamente 15 nM per atorvastatina, 29 nM per simvastatina e 44 nM per fluvastatina.

I risultati dimostrano come, *in vitro*, l'effetto delle statine sull'aumento della conversione di acido linoleico si ottiene a concentrazioni inferiori rispetto a quelle richieste per l'inibizione della sintesi del colesterolo - con più bassi rapporti EC₅₀ acido linoleico/EC₅₀ colesterolo - suggerendo che l'attivazione del metabolismo degli acidi grassi poliinsaturi possa essere un importante effetto delle statine.