

## IL DONATORE DI MONOSSIDO D'AZOTO SIN-1 INDUCE L'ESPRESSIONE DI CICLOSSIGENASI-2 (COX-2) PRIVA DI ATTIVITA' ENZIMATICA IN CELLULE ENDOTELIALI UMANE

Eligini S., Lévy-Toledano S., Maclouf J., Centro E. Grossi Paoletti, Dip. di Scienze Farmacologiche, Università di Milano, e Unità U348 INSERM, Hopital Lariboisiere, Parigi, Francia.

**Premessa.** Le recenti scoperte, relative all'interazione dei nitroderivati con l'endotelio vascolare hanno aperto il campo alla valutazione dei meccanismi attraverso i quali tali composti esercitano attività anti-ischemica. Per quanto riguarda la modulazione della COX-2 ad opera del monossido d'azoto (NO) sono presenti in letteratura risultati ampiamente discordanti. Infatti NO può stimolare od inibire la COX-2 in relazione ai vari modelli sperimentali utilizzati. In questo studio abbiamo valutato l'effetto del donatore di NO 3-morfolinossidnonimina (SIN-1), sulla espressione di COX-2 in cellule endoteliali umane isolate da cordone ombelicale (HUVEC). Il SIN-1 è stato impiegato in quanto metabolita attivo del nitroderivato molsidomina.

**Risultati.** L'incubazione delle HUVEC con SIN-1 dà luogo ad un aumento della espressione di COX-2 in tempi rapidi (4-6 ore). Tale aumento, valutato mediante analisi di Western e di Northern è concentrazione-dipendente (0.1-1 mM) e risulta essere additivo a quello ottenuto con uno stimolo classico per indurre l'espressione di COX-2 quale l'interleukina-1a (IL-1a). Tuttavia, contrariamente a quanto si osserva con IL-1a l'aumento dei livelli di proteina non è accompagnato da aumento dell'attività enzimatica, valutata mediante dosaggio dei livelli di 6-cheto-prostaglandinaF1a nel medium di incubazione. L'attività enzimatica viene tuttavia recuperata, anche se in modo non completo, quando la COX-2, una volta immunoprecipitata, viene incubata con acido arachidonico ed ematina. Questo risultato indica come la presenza di un nuovo gruppo eme sia fondamentale per il ripristino della attività enzimatica. Il SIN-1, oltre a generare NO, libera anche anione superossido e questi due composti reagiscono l'uno con l'altro dando luogo a perossinitrito, specie ossigenata altamente reattiva. I dati ottenuti con HUVEC incubate con perossinitrito indicano che esso è in grado di aumentare, in modo significativo l'espressione di COX-2, suggerendo un suo coinvolgimento nell'effetto osservato con SIN-1. Il successivo aspetto di questo studio ha preso in considerazione i meccanismi attraverso cui SIN-1 induce espressione della COX-2 nelle HUVEC. In particolare, sono state prese in considerazione alcune vie di trasduzione del segnale che sono importanti per la modulazione della COX-2 a livello endoteliale. I risultati ottenuti tramite l'impiego di inibitori specifici indicano che sia la proteinchinasi C che le MAP-chinasi ERK1/2 e p38 sono coinvolte, anche se in misura diversa, nella espressione di COX-2 indotta da SIN-1.

**Conclusioni.** I risultati ottenuti evidenziano una complessa regolazione della espressione di COX-2 e della sua attività da parte del monossido d'azoto e dei suoi prodotti di ossidazione.

## **RUOLO DELL'INSULINA NELL'ESPRESSIONE DEL GENE DELLA LIPASI ENDOTELIALE. MODULAZIONE AD OPERA DEL CLOFIBRATO E DEL CIGLITAZIONE.**

<sup>1</sup>Francesca Ragogna, <sup>2</sup>Fabio Pellegatta, <sup>1</sup>Salvatore Russo, <sup>1</sup>Giacomo Ruotolo.

<sup>1</sup>Istituto Scientifico Universitario San Raffaele, Milano, <sup>2</sup>Dipartimento di Scienze Farmacologiche, Milano.

La lipasi endoteliale (EL) è un enzima ad attività lipasica espresso prevalentemente a livello endoteliale. La sua azione si svolge essenzialmente sui fosfolipidi delle HDL, partecipando così alla regolazione del metabolismo di queste lipoproteine. La lipasi lipoproteica (LPL) invece agisce prevalentemente sui trigliceridi dei chilomicroni e delle VLDL, e l'insulina e gli attivatori dei peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) sembrano essere fra i principali modulatori della trascrizione del suo gene. Recentemente il gene che codifica per la EL è stato identificato e mappato sul cromosoma 18, e la modulazione della sua espressione è quindi oggetto di intense investigazioni.

Scopo del nostro lavoro è stato quello di valutare il ruolo dell'insulina e di attivatori di PPAR $\alpha$  (clofibrato) e PPAR $\gamma$  (cigliitazione) nella modulazione della trascrizione del gene della EL.

Cellule endoteliali umane estratte da cordone ombelicale (HUVEC) sono state incubate con insulina (100 ng/ml), con ciglitazione (50 $\mu$ M) e con clofibrato (100  $\mu$ M) da soli o in associazione (insulina-clofibrato, insulina-cigliitazione). La valutazione della trascrizione della EL è stata effettuata mediante real-time PCR.

I risultati dimostrano che l'insulina stimola di circa 1,5 volte l'espressione della EL, e tale attivazione è inibita dal LY294002 50  $\mu$ M (inibitore della phosphatidylinositolo-3phosphato chinasi, PI-3K) e dal PD98054 40 $\mu$ M (inibitore delle Mitogen activated kinase kinase). Il clofibrato, aumenta la trascrizione della EL. Tuttavia, se associato all'insulina, non esercita un effetto additivo.

Il ciglitazione, da solo o associato all'insulina non modifica significativamente l'espressione della EL.

Questi dati preliminari indicherebbero quindi un ruolo dell'insulina e del clofibrato nella modulazione dell'espressione della EL. L'attivazione indotta dall'insulina sarebbe in parte mediata dalla PI-3K e dalle mitogen activated chinase (MAPK).

## LE COLTURE DI CELLULE ENDOTELIALI UMANE PRESENTANO SEGNI DI STRESS OSSIDATIVO E INVECCHIAMENTO. EFFETTI SULL'ATTIVITA' ENDOTELIALE

Anthony R. Smith, Francesco Visioli, Alex Michels, Tory M. Hagen  
Linus Pauling Institute, Oregon State University, Corvallis, OR e Dipartimento di Scienze Farmacologiche, Università degli Studi di Milano.

Le cellule aortiche endoteliali umane (HAEC) rappresentano un utile modello sperimentale per lo studio della funzione endoteliale e di patologie ad essa correlate quali aterosclerosi, diabete, ipertensione. Tuttavia, l'influenza delle condizioni di coltura, necessariamente artificiali, su queste cellule non sono mai state caratterizzate appieno. Per esempio, le HAEC non ricevono un'adeguata quantità di antiossidanti dal medium di coltura; in particolare, manca loro l'acido ascorbico (vitamina C) che, ad esempio, gioca un ruolo cruciale nel mantenere in stato ridotto la tetraidrobiopterina, un cofattore importante nella sintesi dell'ossido nitrico. Abbiamo quindi caratterizzato le HAEC in coltura ed il loro stato redox prima e dopo supplementazione con vitamina C (100  $\mu$ M). I livelli di vitamina C, assente nelle HAEC coltivate in condizioni usuali, sono aumentati fino a 200  $\mu$ g/mg prot. dopo 30 min dalla supplementazione. Il rapporto glutazione ridotto (GSH)/glutazione ossidato (GSSG) è aumentato da  $61.3 \pm 3.5$  a  $91.3 \pm 2.2$  come conseguenza di una minor formazione di GSSG. Inoltre, la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e dell'azoto (RNS), valutata con metodi fluorimetrici, è diminuita sia nelle cellule in toto che nei loro mitocondri. Infine, la supplementazione giornaliera con vitamina C ha diminuito i livelli cellulari di 8-oxo-deossiguanosina (8-oxo-dG), un marker di danno ossidativo al DNA, valutata tramite immunocitochimica. In cellule coltivate in condizioni normali, l'8-oxo-dG si localizza perinuclearmente e si riscontra soprattutto nei mitocondri. Come parametro funzionale, è stata valutata l'attività dell'ossido nitrico sintasi (eNOS) dopo stimolazione con calcio ionoforo A23187. Tale attività è aumentata di circa il 300% in seguito a supplementazione con vitamina C.

In conclusione, questo studio dimostra che le condizioni di coltura comunemente impiegate per le HAEC le rendono scorbutiche e le pongono in stato di stress ossidativo, come evidenziato da diversi parametri quali danno al DNA, alterata funzione mitocondriale, perdita di attività dell'eNOS. Queste modificazioni, simili a quelle riscontrate nei processi di invecchiamento tissutale, possono risultare in artefatti sperimentali negli studi di funzione endoteliale.

## STATINE ED AGGREGAZIONE PIASTRINICA: EFFETTO DELLA CERIVASTATINA SULL'ATTIVITÀ DELL'ENZIMA CD39/ATPasi.

Donatella Gritti, Nicole C. Kaneider<sup>1</sup>, Christian J. Wiedermann<sup>1</sup> e Giovanni Ricevuti.

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

<sup>1</sup>Dipartimento di Medicina Interna, Università di Innsbruck, Austria,

Studi recenti hanno dimostrato che le statine, farmaci ipocolesterolemizzanti inibitori dell'enzima HMG-CoA reduttasi, possono avere anche effetti anti-trombotici ed anti-infiammatori.

Le piastrine attivate in sede vascolare rilasciano adenosina trifosfato (ATP) e adenosina difosfato (ADP), in grado di attivare le cellule endoteliali, le piastrine stesse e i neutrofilii. L'effetto opposto viene esercitato da adenosina monofosfato e adenosina.

L'enzima CD39/ATPasi, espresso dalle cellule endoteliali quiescenti, idrolizza ATP e ADP ad AMP e adenosina, evidenziando un meccanismo antitrombotico ed antinfiammatorio di questo enzima. Poiché i mediatori dell'infiammazione inibiscono l'attività dell'enzima CD39/ATPasi endoteliale, impedendo l'idrolisi di ATP e ADP, mentre nelle cellule endoteliali quiescenti l'enzima CD39/ATPasi agisce disperdendo gli aggregati piastrinici, abbiamo studiato il ruolo della cerivastatina nella regolazione del metabolismo di ATP e ADP, e l'influenza che questo può avere nell'attivazione piastrinica.

Le cellule HUVEC, ottenute da cordone ombelicale e piastrate alla concentrazione di  $2.5 \times 10^5$  cells/ml, sono state trattate con trombina [0.1 U/ml] e cerivastatina (CVN) [1 pM - 100  $\mu$ M] per 45 min. Al termine dell'incubazione le cellule sono state lavate e incubate con RPMI 1640 contenente ADP [100  $\mu$ M] e ATP [100  $\mu$ M] per 20 min. Il surnatante è stato recuperato, e utilizzato per dosare i livelli di ATP, ADP e per valutarne l'effetto sull'aggregazione piastrinica.

Il plasma ricco di piastrine (PRP) è stato ottenuto da sangue periferico di volontari sani per centrifugazione a 110 g.

L'aggregazione piastrinica è stata studiata utilizzando il PRP contenente  $250 \times 10^6$  piastrine/ml con un Lumi-Aggregometro (ChronoLog Corporation; Havertown, PA, USA).

PRP è stato preincubato a 37°C in apposite provette e l'attivazione piastrinica è stata indotta aggiungendo 100  $\mu$ l di surnatante ottenuto dalle cellule HUVEC in coltura, trattate con CVN alle diverse concentrazioni. Come controllo positivo è stato utilizzato l'ADP. L'aggregazione piastrinica è stata valutata come aumento della luce trasmessa in 6 minuti.

Il surnatante delle cellule endoteliali trattate con trombina induce aggregazione piastrinica, mentre il trattamento con CVN diminuisce questo effetto in modo dose-dipendente.

Il trattamento con CVN ristabilisce il metabolismo di ATP e ADP nelle cellule endoteliali attivate con trombina prevenendo l'inibizione della CD39/ATPasi.

Il mantenimento dell'attività dell'enzima CD39/ATPasi da parte della cerivastatina può contribuire direttamente agli effetti anti-trombotici ed anti-infiammatori delle statine.

## TROMBOGENICITA' VASCOLARE ED OSSIDAZIONE LIPOPROTEICA: STUDI *IN VITRO* ED *IN VIVO*

Banfi C., Camera M., Giandomenico G.D., Mussoni L. and Tremoli E.  
Istituto di Scienze Farmacologiche, Università degli Studi di Milano.

L'ossidazione delle lipoproteine a bassa densità (LDL) e l'aumentata trombogenicità dell'endotelio rappresentano eventi chiave nella patogenesi dell'aterosclerosi. Il presente studio è stato disegnato per analizzare le alterazioni funzionali, in termini di risposta trombotica e fibrinolitica, che l'endotelio subisce durante un processo di ossidazione lipoproteica. In una prima fase dello studio sono stati valutati, *in vitro*, gli effetti dell'ossidazione delle LDL sull'espressione di Tissue Factor (TF) e proteine del sistema fibrinolitico in cellule endoteliali umane (EC) isolate da funicoli ombelicali. Durante l'ossidazione lipoproteica, ottenuta incubando le cellule con 50 µg/ml di LDL in presenza di Cu<sup>++</sup> 2.5 µM, si osserva un incremento concentrazione-dipendente dell'espressione di TF, PAI-1 e tPA. Il picco di secrezione di PAI-1 (200% rispetto al controllo) e tPA (240% rispetto al controllo) si verifica in seguito ad 8 ore di incubazione, mentre l'aumentata espressione di TF si osserva solo dopo 16 ore di incubazione (600% rispetto al controllo). L'espressione di TF è accompagnata da una concomitante alterazione morfologica delle cellule identificabile come apoptosi, confermata sia dalla reazione di TUNEL che mediante citofluorimetria. Dal punto di vista meccanicistico, l'attivazione delle MAP chinasi rappresenta il comun denominatore sia per l'induzione di TF che per l'insorgenza del fenomeno apoptotico. Tuttavia tali mediatori intracellulari non giocano un ruolo nell'induzione delle proteine del sistema fibrinolitico. In una seconda fase dello studio, LDL (6 mg/Kg) e Cu<sup>++</sup> (2.5 µM) sono stati iniettati nel coniglio dal quale, dopo 16 ore, è stato prelevato un segmento di aorta toracica su cui è stata valutata la trombogenicità vasale mediante la camera di perfusione di Badimon. I vasi dei conigli trattati con LDL e Cu<sup>++</sup> presentano una marcata risposta trombogenica (623±124% rispetto al controllo), attribuibile ad una aumentata attività del TF. L'arricchimento delle LDL con antiossidanti (α-tocoferolo 100 µM e probucolo 100 µM) è in grado di prevenire la comparsa del fenomeno di disfunzione endoteliale *in vitro*, in termini di TF ed apoptosi ma non delle proteine del sistema fibrinolitico. *In vivo* la presenza di α-tocoferolo riduce del 50% la risposta trombogenica indotta dall'ossidazione delle LDL, sia la marcata trombogenicità vascolare nel modello animale. In conclusione, questi dati indicano che l'arricchimento del potenziale antiossidante delle lipoproteine plasmatiche potrebbe proteggere l'endotelio vascolare da insulti o stress ossidativi che determinerebbero la comparsa di un evento aterotrombotico.

## L'ANGIOTENSINA II INDUCE L'ESPRESSIONE DELL'INIBITORE TISSUTALE DELLE METALLOPROTEINASI-1 (TIMP-1) NELL'AORTA DI RATTO *IN VIVO*

G. Castoldi<sup>1</sup>, C.R.T. di Gioia<sup>2</sup>, F. Pieruzzi<sup>1</sup>, C. D' Orlando<sup>1</sup>, G. Busca<sup>1</sup>, W. van de Greef<sup>3</sup>, G. Sperti<sup>3</sup>, A. Stella<sup>1</sup>

<sup>1</sup>UDA Nefrocardiovascolare, Università di Milano-Bicocca, Az.Osp. San Gerardo, Monza; <sup>2</sup>Istituto di Anatomia Patologia, Università "La Sapienza", Roma; <sup>3</sup>Istituto di Cardiologia, Università Cattolica, Roma.

**Obiettivi:** E' noto che l'angiotensina II (Ang II) stimola la sintesi e la deposizione di collagene e di matrice extracellulare nel cuore, nel rene e nei vasi favorendo lo sviluppo della fibrosi. Il sistema delle metalloproteinasi e dei loro inibitori tissutali (TIMPs) agendo sul rimaneggiamento delle proteine della matrice extracellulare interviene nei processi dell' aterosclerosi. Gli inibitori delle metalloproteinasi maggiormente presenti a livello vascolare sono TIMP-1 e TIMP-2.

Scopo dello studio e' stato valutare l'effetto dell'angiotensina II sull'espressione genica e proteica di TIMP-1 nell'aorta di ratto evidenziando la presenza di eventuali alterazioni morfologiche a carico del vaso.

**Metodi:** A ratti Sprague Dawley posti in gabbie metaboliche per due settimane e' stata misurata la pressione arteriosa sistolica (tail cuff) ogni due giorni. Dopo la prima settimana di controllo ai ratti si somministrava, tramite una minipompa osmotica impiantata sottocute, Ang II (200ng/kg/min, n=6) o soluzione fisiologica (n=6) per sei giorni. Al termine del periodo di trattamento i ratti venivano soppressi e si prelevava un campione di plasma per misurare l'attività plasmatica della renina (metodo RIA), e l'aorta. Sul vaso si effettuavano prelievi lungo l'asse trasversale che venivano montati in OCT e congelati in azoto liquido, previo passaggio in isopentano. La tonaca media della rimanente aorta veniva separata dall'endotelio e dall'avventizia e direttamente congelata in azoto liquido. Le aorte sono state sottoposte ad esame istologico per una valutazione morfologica del vaso. Sulla tonaca media dell'aorta l'espressione genica di TIMP-1 e' stata valutata con il Northern blotting mentre l'espressione proteica e' stata sia misurata con il Western blotting che evidenziata con metodiche di immunistochemical utilizzando un anticorpo monoclonale specifico per il TIMP-1.

**Risultati:** La somministrazione di Ang II per 6 giorni provocava un aumento della pressione arteriosa sistolica nei ratti trattati ( $p < 0.05$ ) rispetto ai ratti di controllo, mentre negli stessi l'attività plasmatica della renina risultava soppressa ( $p = 0.01$ ). La somministrazione di Ang II aumentava l'espressione genica ( $p = 0.01$ ) e proteica di TIMP-1 ( $p < 0.05$ ) a livello delle cellule muscolari lisce dell'aorta. L'analisi immunistochemical ha confermato l'aumentata espressione di TIMP-1 nella tonaca media dell'aorta dei ratti trattati con Ang II. L'esame istologico non ha evidenziato alterazioni morfologiche di rilievo del vaso in entrambi i gruppi di ratti .

**Conclusioni:** I nostri dati dimostrano che *in vivo* l' Ang II aumenta l'espressione di TIMP-1 nella tonaca media dell'aorta di ratto in assenza di alterazioni morfologiche del vaso. Questi dati suggeriscono che l' effetto dell' Ang II su TIMP-1 interviene nei processi di rimodellamento vascolare già nella fase precoce, prima che si instauri un danno strutturale.

## **EFFETTO DELLA COMPONENTE PROTEICA SUI LIVELLI PLASMATICI DI COLESTEROLO E TRIGLICERIDI E SULL'ESTENSIONE DELLA PLACCA ATEROMATOSA IN CONIGLI ALIMENTATI CON UNA DIETA IPERCOLESTEROLEMICA.**

Castiglioni S\*, Lovati M.R.\* , Manzoni C. \* , Monteggia E.\* , Chiesa G.\* e Sirtori C.R.\*

\* Dipartimento di Scienze Farmacologiche Università degli Studi di Milano.

In questo studio sono stati valutati, in conigli New Zealand, gli effetti della componente proteica presente nella dieta sull'insorgenza ed estensione della placca aterosclerotica e sull'ossidabilità delle LDL. Dopo induzione della lesione aterosclerotica a livello delle carotidi comuni, ottenuta attraverso l'applicazione di uno stimolo elettrico, gli animali sono stati divisi in 2 gruppi che hanno assunto per 90 giorni due diete semisintetiche isocaloriche/isonitrogeno contenenti 1% colesterolo e 15% acidi grassi saturi. La porzione proteica (20%) era costituita in un caso da 16% caseina e 4% siero proteine del latte (dieta di caseina) e nell'altro da 16% isolato di soja e 4% siero proteine del latte (dieta di soja). Assunzione di cibo, peso corporeo, colesterolo e trigliceridi plasmatici sono stati monitorati durante tutto il periodo sperimentale. L'ossidabilità delle LDL e l'istologia delle lesioni ateromasiche sono state valutate dopo sacrificio degli animali. Al termine del trattamento dietetico negli animali a dieta di soja i livelli plasmatici di colesterolo e trigliceridi sono risultati inferiori del 39% e 30% rispetto ai valori degli animali a dieta di caseina. L'ossidazione delle LDL é stata studiata in vitro valutando la cinetica di formazione dei dieni coniugati mediata da Cu<sup>++</sup>. Negli animali a dieta di soja il tempo di latenza ( "lag phase" ) dell'ossidazione delle LDL è risultato maggiore (150±5 min.) rispetto a quello degli animali a dieta di caseina (20±3 min.). L'analisi istologica delle carotidi ha evidenziato marcate differenze sia nello spessore (-30%) ed estensione (-38%) che nella composizione cellulare delle placche, principalmente costituite da macrofagi, nei conigli a dieta di soja rispetto a quelli a dieta di caseina. I risultati ottenuti in questo studio confermano l'effetto fortemente ipocolesterolemizzante delle proteine della soja all'interno di un regime dietetico ad elevato contenuto di grassi saturi e colesterolo e ne evidenziano, nel nostro modello sperimentale, un notevole ruolo protettivo nella progressione della lesione aterosclerotica.

## ATTIVAZIONE ENDOTELIALE ED INFILTRAZIONE LEUCOCITARIA IN CAROTIDI DI CONIGLIO DOPO MANIPOLAZIONE PERIAVVENTIZIALE.

Donetti E.\*, Comparato C.\*\*\*, Boschini E.\*, Silva F.\*\*\*, Barajon I.\*, Corsini A\*\*, Baetta R\*\*.

\*Dipartimento di Anatomia Umana e \*\* Dipartimento di Scienze Farmacologiche, Università degli Studi di Milano.

Numerose evidenze hanno dimostrato che l'alterazione funzionale delle cellule endoteliali (EC) rappresenta l'evento iniziale dell'aterogenesi. In questo studio, abbiamo valutato il fenotipo proinfiammatorio dell'endotelio e l'andamento dell'infiltrazione leucocitaria nelle fasi precoci della formazione dell'iperplasia in un modello sperimentale di aterogenesi. Il modello, basato sulla manipolazione periaavventiziale della carotide di coniglio mediante applicazione chirurgica di un collarino di silicone, offre il vantaggio di indurre rapidamente una iperplasia intimale, mantenendo l'integrità anatomica dell'endotelio, a differenza di altri sistemi di induzione meccanica della lesione. Abbiamo utilizzato metodiche di immunohistochimica (anticorpi monoclonali anti-CD31, anti-VCAM-1, anti-ICAM-1 e anti-CD18) e di microscopia elettronica a trasmissione (TEM) su campioni biotici ottenuti da conigli normocolesterolemici sacrificati 6, 24 e 72 ore dopo la manipolazione periaavventiziale. A tutti i tempi esaminati, nelle arterie con collarino (C) e di controllo (sham) l'immunoreattività con anti-CD31 e l'analisi TEM hanno dimostrato la presenza di un monostrato continuo di EC. Nelle arterie C è stato possibile osservare indici ultrastrutturali di attivazione e ipertrofia delle EC; immunopositività per ICAM-1 e VCAM-1 è stata riscontrata a tutti i tempi considerati. A 24 e 72 ore la reattività risultava estesa anche alla tunica media. Nelle arterie sham, il monostrato endoteliale è risultato immunoreattivo solo per ICAM-1. La reazione con anticorpo anti-CD18 ha dimostrato l'infiltrazione di numerosi leucociti nelle carotidi C, ma non nelle arterie sham. Questo fenomeno ha un andamento bifasico: dapprima compaiono i leucociti polimorfonucleati (PMN) (dopo 6 ore) e, in seguito, i leucociti mononucleati (dopo 24 ore). I PMN invadono la maggior parte della tunica media a 24 ore e sono internalizzati dalle cellule muscolari lisce della tunica media mediante un'interazione denominata emperipolesi. Sebbene il significato fisiopatologico di questa interazione e i meccanismi sottesi all'attivazione endoteliale siano ancora da approfondire, i risultati riportati confermano l'utilità del modello del collarino nello studio della funzionalità endoteliale e delle interazioni cellulari nelle fasi precoci dell'aterogenesi.

## **LO STUDIO WALSER: “PREVALENZA DI DISMETABOLISMI DEI LIPIDI E DEL GLUCOSIO NELLA COMUNITÀ WALSER DI FORMAZZA IN CONFRONTO AD UNA POPOLAZIONE DI CONTROLLO”**

Nicoletti M<sup>#</sup>, Cassani P.<sup>°</sup>, Galletti R.<sup>°</sup>, Lepri M.<sup>°</sup>, Marengo P.<sup>°</sup>, Perricone L.<sup>\*</sup>, Sandrini R.<sup>§</sup>, Strurkenboom M.<sup>#</sup>, Zavatti F.<sup>\*</sup>, Tragni E.<sup>#</sup>.

<sup>°</sup>UOA Medicina, <sup>\*</sup>UOA Laboratorio Analisi, <sup>§</sup>Direzione Sanitaria Aziendale dell'Ospedale di Domodossola, <sup>#</sup>SEFAP, Dipartimento di Scienze Farmacologiche, Università degli Studi di Milano.

### **PREMESSA:**

In questo studio si è voluto valutare la prevalenza dei dismetabolismi del glucosio e dei lipidi e la distribuzione del rischio cardiovascolare assoluto (RCVA) in soggetti di etnia Walser, una popolazione montana della Valle Formazza, emigrata dall'Alto-Vallese più di 700 anni fa, confrontandola ad una analoga popolazione montana autoctona.

### **METODI:**

Lo studio, di tipo cross-sectional, ha coinvolto due comunità montane, Formazza (264 arruolati di cui 214 Walser e 50 non-Walser) e Antrona (258 arruolati), rappresentative rispettivamente dell'etnia Walser e di quella autoctona. Gli abitanti, di età superiore ai 18 anni, sono stati convocati dal loro Medico di Medicina Generale e dopo aver letto il foglio informativo, hanno firmato il consenso informato. I soggetti sono stati sottoposti ad una visita medica dettagliata con rilevamento dei dati anamnestici, dei parametri antropometrici e vitali, ad un prelievo ematico e al test OGTT. I soggetti hanno anche compilato questionari sulle loro abitudini alimentari e sullo stato di salute.

### **RISULTATI:**

L'età media della due popolazione è così distribuita: popolazione di controllo  $53,2 \pm 15,7$  anni – mediana 53,0 - (44.2% uomini e 55.8% donne), comunità Walser  $50,3 \pm 17,5$  anni – mediana 49,5 - (48.6% uomini e 51.4% donne). Da analisi preliminari dei dati raccolti si sono ottenuti i seguenti risultati: i livelli medi di colesterolo totale non sono significativamente differenti benché nella comunità Walser essi risultino leggermente inferiori (Popolazione di controllo  $220 \pm 38,7$  mg/dL – mediana 218,5 - Walser  $214 \pm 43,9$  mg/dL – mediana 210,0 -). I livelli medi di colesterolo HDL e LDL sono invece risultati statisticamente differenti (C-HDL popolazione di controllo  $57,1 \pm 13,6$  mg/dL – mediana 57,0 -, Walser  $61,1 \pm 15,4$  mg/dL – mediana 60,0 - [ $p < 0,05$ ]; C-LDL popolazione di controllo  $158,1 \pm 35,3$  mg/dL – mediana 141,2 -, Walser  $128,9 \pm 36,6$  mg/dL – mediana 126,0 - [ $p < 0,01$ ]). I livelli medi dei trigliceridi non differivano tra la popolazione di controllo  $116,1 \pm 86,8$  mg/dL – mediana 93,0 - e i Walser  $119,6 \pm 77,8$  mg/dL – mediana 91,0 - ( $p = 0,650$ ).

I valori medi di glucosio a digiuno sono per Popolazione di controllo  $87,0 \pm 19,7$  mg/dL – mediana 84,0 - mentre quelli della comunità Walser  $85,7 \pm 13,2$  mg/dL – mediana 82,0 - e dopo test OGTT (singolo prelievo a due ore dopo carico) popolazione di controllo  $94,9 \pm 37,9$  mg/dL – mediana 89,0 -, Walser  $94,0 \pm 35,8$  mg/dL – mediana 89,0 -. I valori medi di RCVA, inteso come probabilità percentuale di avere eventi cardiovascolari nei prossimi 10 anni, calcolato utilizzando l'algoritmo di Framingham, sono  $9,9 \pm 8,2$  – mediana 7,7 - per la popolazione di controllo e  $7,4 \pm 6,8$  – mediana 5,6 - per la comunità Walser ( $p = 0,001$ ).

### **CONCLUSIONI:**

Da questa analisi preliminare è emerso che la comunità Walser è una popolazione con un rischio cardiovascolare assoluto inferiore rispetto alla popolazione di controllo.

## **“PROGETTO COLESTEROLO 2000”: UN INTERVENTO DI EDUCAZIONE SANITARIA/ SCREENING DEI PRINCIPALI FATTORI DI RISCHIO CARDIOVASCOLARE FRA STUDENTI DELLE SCUOLE MEDIE SUPERIORI.**

Giuseppe Saglietti, Giorgio Ripamonti

U.O.A. Medicina Generale – Ambulatorio Diabetologico Ospedale di Omegna a.s.l. 14 .

### **INTRODUZIONE**

Le malattie cardiovascolari, principali cause di morte nel nostro Paese, sono legate ad una serie di fattori di rischio ben identificati quali sovrappeso, iperlipidemie, ipertensione arteriosa, fumo di sigaretta, diabete. Studi recenti indicano che il danno cardiovascolare è tanto maggiore quanto maggiore è la durata dei fattori causali coinvolti: ad esempio livelli di colesterolo elevati in giovane età sono risultati fortemente predittivi di malattia cardiovascolare nelle quattro decadi successive nello John Hopkins Precursor Study.

Risulta quindi di fondamentale importanza attuare strategie di tipo preventivo (educazione sanitaria) e di screening dei principali fattori di rischio cardiovascolare fin dall'età scolare, periodo in cui le abitudini non sono ancora consolidate, e quindi sono suscettibili di congrue modifiche. In quest'ottica, nel corso dell'anno scolastico '99/2000 abbiamo elaborato un intervento nelle Scuole Medie Superiori di Omegna con un duplice obiettivo: l'educazione sanitaria riguardo ai principali fattori di rischio cardiovascolare (con particolare riguardo all'alimentazione ed al fumo) e lo screening di alcuni di questi.

### **MATERIALI E METODI**

Nel corso degli interventi nelle scuole, nella prima parte veniva presentata una serie di diapositive preparate “ad hoc” riguardo ai fattori di rischio cardiovascolare; nella seconda parte si provvedeva alla raccolta dei dati antropometrici (peso, altezza, BMI), clinici (pressione arteriosa) ed al dosaggio del colesterolo su sangue capillare mediante reflattometro tipo “Accutrend GC” – Roche Diagnostici S.P.A.

Di ogni ragazzo partecipante allo studio si disponeva inoltre di una cartella con i principali dati anamnestici riguardo alla familiarità per cardiopatia, ictus, diabete, iperlipidemia ed ipertensione arteriosa; veniva inoltre richiesto di segnalare il numero di sigarette eventualmente fumate.

### **RISULTATI**

Hanno partecipato 781 studenti (316 maschi/465 femmine) di età compresa fra 14 e 20 anni.

Nel 23% era presente una familiarità per iperlipidemia in parenti di primo grado, nel 2% per IMA, nel 15% per ipertensione arteriosa, nel 4% per diabete. Il 12% dei ragazzi presentava sovrappeso, considerato come BMI >25 Kg/mq. Non vi era significativa differenza fra maschi e femmine riguardo alla prevalenza del sovrappeso. Abbiamo considerato normale (per l'età) un valore di colesterolemia < 170 mg/dl, valore borderline 170-199 e valore elevato > 200; con questi cut-off abbiamo evidenziato:

- Ipercolesterolemia nel 6% dei soggetti
- Valori borderline nel 18%
- Valori normali nel 76%

I soggetti fumatori erano il 25% degli intervistati, con una lieve prevalenza per il sesso femminile (28% contro 21%). Il 24% fuma meno di 5 sigarette/die, il 38% ne fuma 5-10, il 38% più di 10.

### **CONCLUSIONI**

Il lavoro evidenzia una prevalenza del sovrappeso del 12%, perfettamente in linea con analoghi studi effettuati nell'Italia del Nord. Per quanto riguarda i valori di colesterolo, a nostro avviso risulta degno di nota l'elevato numero di soggetti nella fascia definita “borderline” (170-199 mg/dl), risultata pari al 18%.

Fra i soggetti ipercolesterolemici, era presente familiarità per iperlipidemia/cardiovasculopatia precoce solamente nel 30% dei casi: ciò sta a indicare che limitare il dosaggio del colesterolo solamente ai giovani a rischio, come indicato dalle attuali linee-guida, porterebbe ad identificare, secondo i nostri dati, solamente il 30% dei soggetti con colesterolemia elevata e quindi ad un significativo ritardo nell'intervento preventivo.

Riguardo al fumo la prevalenza del sesso femminile tra i fumatori è in accordo con quanto rilevato in altri studi analoghi e potrebbe aprire nuovi scenari nell'epidemiologia delle malattie cardiovascolari.

I soggetti forti fumatori ( 38 % ) nel nostro gruppo risultano più elevati rispetto ad indagini effettuate.

## FATTORI PREDITTIVI DI RISTENOSI PRECOCE IN PAZIENTI SOTTOPOSTI AD ANGIOPLASTICA ED IMPIANTO DI STENT: STUDIO CRIR.

Emanuela Setola, PierMarco Piatti, Gabriele Fragasso, Carlo Di Mario, Lucilla D. Monti, Fabio Sgura, Pietro Lucotti, Marco Moltrasio, Elena Galluccio, Emilia P. Sandoli, Guido Pozza, Alberto Margonato, Antonio Colombo. IRCCS H. San Raffaele, Milano, Italia.

Negli ultimi dieci anni le tecniche di angioplastica coronarica ed impianto di stent hanno migliorato in modo significativo la sopravvivenza e la qualità di vita di pazienti affetti da cardiopatia ischemica. Tuttavia queste procedure non raggiungono i risultati attesi nei pazienti affetti da diabete mellito tipo 2. L'insulinorresistenza e le alterazioni della funzione endoteliale, accelerando lo sviluppo di aterosclerosi, possono essere responsabili di queste differenze anche se il contributo dei singoli fattori merita ulteriori studi.

Settantasette pazienti (età media:  $57 \pm 2$  aa e BMI  $27.1 \pm 0.5$  Kg/m<sup>2</sup>) sono stati sottoposti a carico orale di glucosio (OGTT) prima dell'esecuzione di controllo coronarografico a sei mesi dall'impianto di stent. La Sindrome da Insulino Resistenza è stata definita dalla presenza contemporanea di almeno tre dei seguenti fattori: iperinsulinemia, ipertrigliceridemia, bassi livelli di colesterolo HDL, obesità viscerale, intolleranza ai carboidrati (IGT) o diabete mellito di tipo 2.

I pazienti presentavano normali livelli glicemici basali. In 43 pazienti (56%) è stata rilevata la presenza di IGT o diabete mellito di tipo 2. Ristenosi intra-stent è stata riscontrata in 39 dei pazienti studiati (51%). La Sindrome da Insulino Resistenza era presente in 15 pazienti con ristenosi (38%) e in 8 pazienti senza ristenosi (21%).

Inoltre, i pazienti con ristenosi presentavano aumentati livelli di HOMA ( $2.3 \pm 0.2$  vs  $1.9 \pm 0.1$ ;  $p < 0.03$ ), di insulina a digiuno ( $9.4 \pm 0.7$  vs  $7.7 \pm 0.3$   $\mu$ U/ml) e di peptide-C ( $2.5 \pm 0.1$  vs  $2.0 \pm 0.1$  ng/ml,  $p < 0.003$ ). La risposta insulinemica dopo OGTT era significativamente aumentata nei pazienti con ristenosi ( $7631.3 \pm 762$  vs  $5628.9 \pm 423.882$   $\mu$ U/ml; 0-120 min;  $p < 0.02$ ). I livelli di omocisteina risultavano significativamente aumentati nei pazienti con ristenosi sia a digiuno ( $17.3 \pm 3.5$  vs  $11.8 \pm 0.6$   $\mu$ mol/l,  $p < 0.05$ ) che al termine dell'OGTT ( $14.7 \pm 3.1$  vs  $8.9 \pm 0.6$   $\mu$ mol/l,  $p < 0.03$ ). La percentuale di ristenosi al follow-up era significativamente correlata con insulinemia a digiuno ( $r = 0.29$ ;  $p < 0.01$ ), peptide-C ( $r = 0.37$ ;  $p < 0.001$ ), area di secrezione insulinica durante OGTT ( $r = 0.24$ ;  $p < 0.05$ ), HOMA ( $r = 0.34$ ;  $p < 0.002$ ) e omocisteina basale ( $r = 0.46$ ;  $p < 0.05$ ).

In conclusione, l'iperinsulinemia sia basale che dopo carico orale di glucosio, l'insulino resistenza ed aumentati livelli di omocisteina sono importanti fattori predittivi di ristenosi dopo impianto di stent nei pazienti affetti da cardiopatia ischemica.

## LIVELLI DI LIPIDI E LIPOPROTEINE NEI PAZIENTI CON IPERCOLESTEROLEMIA FAMILIARE IN TRATTAMENTO CON STATINE

E. Tragni, S. Bertolini\*, P. Pauciullo\*\*, S. Martini°, R. Fellin°, M. Arca\$, S. Fantappiè, A. L. Catapano  
Università degli Studi di Milano, Genova\*, Napoli\*\*, Padova°, Ferrara°° e Roma\$

**SCOPO DELLO STUDIO:** Descrivere l'effetto del trattamento farmacologico, secondo la usuale pratica clinica, con farmaci ipolipemizzanti in una coorte di pazienti affetti da ipercolesterolemia familiare eterozigote (FH), reclutati in 6 Centri italiani per lo studio delle dislipidemie.

**METODI:** Sono stati quindi selezionati complessivamente 333 pazienti affetti da ipercolesterolemia familiare, diagnosticata secondo i seguenti criteri (1+2 o 3):

- Colesterolo LDL nel probando superiore al 95° percentile della distribuzione nella popolazione (>190 mg/dL), trasmissione verticale dell'ipercolesterolemia nella famiglia, distribuzione bimodale della colesterolemia nella famiglia.
- Presenza di xantomi tendinei nel probando o in almeno un membro affetto della famiglia o in alternativa presenza di severa ipercolesterolemia in un soggetto prepubere della famiglia.
- Presenza di mutazione identificata nel gene del recettore LDL (valutata in circa il 50% dei pazienti)

Seguendo la normale pratica clinica, nei soggetti sopra descritti, è stato quindi iniziato un trattamento dietetico adeguato (dieta AHA fase I) e successivamente una terapia mirata con farmaci ipocolesterolemizzanti appartenenti alle seguenti classi: inibitori dell'HMG CoA redattasi, fibrati e/o resine, somministrati da soli o in combinazione. I dati ottenuti devono essere considerati come rappresentativi di una realtà clinica di tipo prettamente assistenziale. Anche la scelta e, soprattutto, l'aggiornamento dei protocolli di trattamento non hanno seguito criteri predeterminati, ma bensì quelli legati all'ottenimento del migliore risultato clinico possibile per il singolo paziente. Ciò ha prodotto spesso variazioni di schema di trattamento nel corso del follow-up.

L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando il software Statistica CSS, sia per analisi descrittive (media, deviazione standard, ed altre misure della distribuzione dei dati), che per la valutazione delle differenze tra gruppi di trattamento e/o tra centri. I dati relativi ai parametri lipidici sono stati analizzati anche in funzione della classe di farmaci utilizzata e/o dei principi attivi e dei loro dosaggi. Le valutazioni sono state effettuate utilizzando l'analisi della varianza.

**RISULTATI:** I dati di seguito mostrati sono stati ottenuti dopo tre mesi di trattamento con una delle seguenti statine: atorvastatina (A), pravastatina (P), and simvastatina (S). Poiché i pazienti potevano essere stati avviati, in periodi successivi di differente durata, al trattamento con farmaci diversi, il numero di cicli di terapia analizzato dopo tre mesi dall'avvio è considerevolmente più alto (523). I livelli basali medi dei lipidi erano i seguenti: colesterolo totale (CT)  $370 \pm 79$  mg/dL, colesterolo LDL (C-LDL)  $284 \pm 73$  mg/dL, colesterolo HDL (C-HDL)  $53 \pm 15$  mg/dL e trigliceridi (TG)  $141 \pm 70$  mg/dL. Dei 523 cicli di trattamento, 155 sono stati con A, 94 con P e 274 con S, ad una dose giornaliera media di 28,8, 27,7, and 32,0 mg rispettivamente. Queste dosi hanno portato ad una riduzione dei livelli plasmatici di CT del  $36,5 \pm 10,6\%$  per A,  $21,6 \pm 8,2\%$  per P e  $28,5 \pm 9,7\%$  per S. Per i livelli di C-LDL è stata osservata una riduzione del  $43,2 \pm 11,4\%$  con A,  $26,3 \pm 10,3\%$  con P e  $34,8 \pm 11,2\%$  con S. I livelli plasmatici di TG hanno mostrato riduzioni del  $27,7 \pm 28,0\%$  con A,  $11,2 \pm 32,7\%$  con P e  $13,9 \pm 27,9\%$  con S, mentre i livelli di C-HDL sono aumentati del  $3,0 \pm 16,8\%$ ,  $4,6 \pm 11,2\%$  e  $6,6 \pm 19,3\%$  con A, P e S rispettivamente. Nel complesso A si è dimostrata più efficace di S e di P nel ridurre TC, C-LDL e TG ( $p < 0,00001$ ). S è stata più efficace di P nell'abbassare il TC e il C-LDL ( $p < 0,00001$ ). Non sono state osservate differenze statisticamente significative tra i tre farmaci nell'aumento dei livelli di C-HDL.

**CONCLUSIONI:** L'analisi di questi dati supporta l'evidenza che le statine siano i farmaci d'elezione nella pratica clinica quotidiana, per il trattamento dell'ipercolesterolemia familiare e conferma la maggiore efficacia di atorvastatina nel ridurre i livelli plasmatici di colesterolo totale e colesterolo LDL. Risulta anche confermato l'effetto delle statine di riduzione dei trigliceridi plasmatici e di aumento del colesterolo HDL, anche se questi effetti non sono dose-dipendenti e non correlano con l'efficacia delle singole statine sulla colesterolemia LDL e totale. L'intensità dell'effetto ipolipemizzante è paragonabile a quella riscontrata nei grandi trias di intervento.

*Questo studio è stato in parte supportato da un grant del MURST.*

# VALUTAZIONE FARMACOECONOMICA DELL'USO DI STATINE NELLA PREVENZIONE CARDIOVASCOLARE.

Lorenzo G Mantovani, Luciana Scalone, Michela Tinelli  
Centro di Farmacoeconomia–Università degli Studi di Milano

## INTRODUZIONE ED OBIETTIVO

Le malattie cardiovascolari rappresentano una delle più frequenti cause di mortalità e di morbidità nei paesi industrializzati. Diversi studi epidemiologici hanno indicato il colesterolo quale fattore eziologico legato all'insorgenza di tali malattie. Esiste notevole evidenza sull'efficacia della prevenzione sia primaria che secondaria degli eventi cardiovascolari con la terapia con statine.

L'obiettivo del presente studio è la valutazione farmacoeconomica dell'utilizzo di statine per la prevenzione cardiovascolare nei soggetti a rischio elevato.

## METODI

Alternative: abbiamo confrontato il trattamento con statine rispetto all'alternativa "nessun intervento". Prospettiva: abbiamo adottato la prospettiva del servizio sanitario nazionale (SSN). Tecnica: abbiamo condotto una Analisi di Costo Efficacia. Costi: Abbiamo considerato i costi diretti sanitari, cioè il costo dei farmaci e degli eventi cardiovascolari. Coerentemente con l'ottica, i costi ospedalieri sono stati quantificati utilizzando le tariffe nazionali associate ai DRG. Efficacia: l'efficacia nel ridurre il livello di colesterolo mediante l'utilizzo di statine è stata convertita in eventi evitati ed in anni di vita salvati utilizzando l'algoritmo di Framingham ed applicandolo ad una coorte di 1000 soggetti a rischio di eventi cardiovascolari superiore al 2% annuo. Tempo: abbiamo utilizzato un orizzonte temporale di 10 anni. Sensibilità: è stata condotta un'analisi di sensibilità sul prezzo e sull'efficacia delle statine.

## RISULTATI

Complessivamente, la terapia con statine è in grado di prevenire da 52 a 60 eventi e di salvare da 230 a 260 anni di vita in 10 anni (a seconda dell'efficacia). La terapia con statine dell'intera coorte comporta un costo netto annuo aggiuntivo compreso tra i 900 milioni ed il miliardo di Lire. L'Analisi di Costo Efficacia mostra un costo per anno di vita salvato compreso tra i 30 ed i 40 milioni di Lire con l'utilizzo di statine rispetto al "nessun intervento".

## DISCUSSIONE

La terapia con statine mostra livelli di costo-efficacia in linea con gli interventi considerati costo efficaci dalla comunità scientifica. I valori di costo efficacia sono parzialmente sensibili all'efficacia ed al prezzo delle statine, rimanendo comunque entro valori considerati costo-efficaci.

## **LE DIMENSIONI DELLE PARTICELLE SONO IL FATTORE PRINCIPALE NEL DETERMINARE LA SENSIBILITA' A DISSOCIAZIONE E DENATURAZIONE DELLE rHDL (LIPOPROTEINE RICOSTITUITE AD ALTA DENSITA')**

Elisabetta Gianazza<sup>^</sup>, Laura Calabresi<sup>^\*</sup>, Ivano Eberini<sup>^</sup>, Guido Franceschini<sup>^\*</sup>, Cesare R. Sirtori<sup>^\*</sup>

<sup>^</sup>Dipartimento di Scienze Farmacologiche e <sup>\*</sup>Centro E. Grossi Paoletti, Università degli Studi di Milano, via G. Balzaretti 9, I-20133 Milano, Italia

Attraverso una tecnica elettroforetica definita denaturant gradient gel electrophoresis (DGGE) sono stati caratterizzati alcuni aspetti strutturali di varie lipoproteine ricostituite ad alta densità (rHDL). La DGGE consiste nel far migrare proteine trasversalmente rispetto ad un gradiente di concentrazione di sostanze caotrope/denaturanti. La destrutturazione delle proteine, unfolding, porta ad un aumento di volume idrodinamico e diminuzione di mobilità. I parametri della curva di denaturazione permettono di valutare aspetti termodinamici e cinetici del processo di denaturazione.

Nei nostri esperimenti sono state confrontate rHDL di grandi (12.7/12.5 nm) e piccole (7.8 nm) dimensioni, contenenti o apolipoproteina A-I (apoA-I) o apolipoproteina A-I<sub>Milano</sub> (apoA-I<sub>M</sub>) dimerica. La sensibilità alla dissociazione delle proteine dai lipidi è stata valutata attraverso DGGE su gradiente di urea, di un detergente non-ionico come il Nonidet P40 e di un detergente ionico come l'SDS. In tutti e tre i casi si è osservata una sensibilità alla dissociazione delle rHDL di piccole dimensioni assai maggiore in confronto a quelle di grandi dimensioni. E' stato analizzato anche il comportamento alla denaturazione delle apolipoproteine in assenza di lipidi. Sia per l'apo A-I che per l'apoA-I<sub>Milano</sub> monomerica la curva di denaturazione in urea-DGGE indica rapida reversibilità della transizione strutturata/destrutturata. La cooperatività del processo di denaturazione risulta minore per l'apoA-I<sub>M</sub> dimerica rispetto all'apoA-I<sub>M</sub> monomera e all'apoA-I. Il processo di destrutturazione inizia per il dimero ad una concentrazione di urea leggermente inferiore rispetto al monomero e per entrambi decisamente prima che per l'apoA-I.

Dunque le apolipoproteine mostrano comportamenti radicalmente diversi tra di loro mentre per le rHDL il tipo di apolipoproteina contenuta risulta ininfluyente e l'unico parametro rilevante per definire la stabilità sembrano essere le dimensioni. Da un punto di vista biologico, le HDL<sub>3</sub> più piccole sono le più attive nel favorire l'efflusso di colesterolo, mentre il trasporto nel torrente circolatorio avviene ad opera di particelle di grosse dimensioni. E' quindi possibile che la diversa stabilità messa in evidenza dai nostri test in vitro e dovuta a diverse interazioni proteina-lipide e lipide-lipide rifletta aspetti rilevanti per la funzione in vivo.

## IL RALOXIFENE RIDUCE LA SECREZIONE DI METALLOPROTEINASI IN MACROFAGI MURINI E CELLULE MUSCOLARI LISCE IN CULTURA

S. Bellosta, M. Canavesi, R. Baetta, M. Monetti, C. Comparato, C. Altana, R. Paoletti, A. Corsini.  
Dipartimento di Scienze Farmacologiche, Università degli Studi di Milano.

Le placche instabili o vulnerabili sono ricche di macrofagi che possono fissurare il cappuccio fibroso mediante la secrezione di enzimi proteolitici specifici appartenenti alla famiglia delle metalloproteinasi (MMPs). Il raloxifene è un modulatore selettivo del recettore degli estrogeni (SERM) attualmente in fase di sperimentazione clinica per la prevenzione secondaria della malattia coronarica nella donna in postmenopausa. L'osservazione sperimentale indica come il raloxifene agisca come un agonista degli estrogeni nel sistema cardiovascolare con attività sia sul metabolismo lipidico sia sulla parete arteriosa. Risultati ottenuti nel nostro laboratorio hanno dimostrato che il raloxifene riduce l'accumulo di macrofagi e l'espressione di MMP in lesioni carotidiche di coniglie ovariectomizzate ipercolesterolemiche.

In questo studio abbiamo valutato l'effetto del raloxifene sull'espressione di MMP-9 in macrofagi peritoneali murini in coltura e di MMP-2 in cellule muscolari lisce ottenute da carotide di animali sottoposti a manipolazione perivascolare. Le cellule sono state incubate per 24 ore con concentrazioni crescenti di raloxifene; l'attività gelatinolitica delle MMPs è stata successivamente misurata nel medium condizionato tramite zimografia su gelatina. Nei macrofagi murini, in cui la secrezione di MMP-9 è stata stimolata dall'aggiunta di TNF- $\alpha$ , il trattamento con raloxifene (0.1-10  $\mu$ M) ha ridotto l'attività gelatinolitica della MMP-9 in modo concentrazione-dipendente (fino al 60% di inibizione,  $P < 0.01$ ). Abbiamo poi valutato l'effetto del raloxifene sull'attività della MMP-2 nelle cellule muscolari lisce di coniglio derivanti da carotide con collarino. In tali cellule il raloxifene (0.1-10  $\mu$ M) ha inibito fino al 40% ( $P < 0.01$ ) l'attività gelatinolitica della MMP-2. Nelle stesse condizioni sperimentali il farmaco è risultato inattivo nelle cellule muscolari derivanti dall'arteria controlaterale di controllo.

Questi risultati suggeriscono come il raloxifene sia in grado di inibire in modo diretto l'attività gelatinolitica di MMP-9 ed MMP-2 nelle cellule che concorrono alla formazione delle placche aterosclerotiche.

## **RUOLO DEL RECETTORE NUCLEARE LIVER X RECEPTOR (LXR) NELLA REGOLAZIONE DELL'ESPRESSIONE GENICA AD OPERA DI OSSISTEROLI PRESENTI NELLE LDL**

N. Mitro, D. Caruso, M. Crestani, E. De Fabiani, R. Patelli, A. Toia e G. Galli  
Dipartimento di Scienze Farmacologiche, Università degli Studi di Milano.

Gli ossisteroli, derivati ossigenati del colesterolo, giocano diversi ruoli non solo nel metabolismo lipidico ma anche in funzioni cellulari coinvolte nei processi di aterogenesi, anche se con meccanismi in parte ancora sconosciuti. E' noto che gli ossisteroli possono inoltre fungere da ligandi e, di conseguenza, attivare recettori nucleari quali Liver X Receptor (LXR). Tale recettore induce in particolare alcuni geni coinvolti nel trasporto inverso del colesterolo. La presenza degli ossisteroli nelle lesioni aterosclerotiche è indice del fatto che il colesterolo associato alle lipoproteine può essere ossidato ad opera di specie reattive dell'ossigeno generate da cellule della parete arteriosa.

Recentemente nel nostro laboratorio abbiamo dimostrato che in un modello animale di ipercolesterolemia su base genetica quale il coniglio Watanabe, i livelli di ossisteroli sono più elevati rispetto ai conigli New Zealand. Inoltre il 7 $\beta$ -idrossicolesterolo, presente anche in lesioni precoci, tende ad accumularsi con la progressione della placca. Queste evidenze, unitamente alla correlazione tra livelli plasmatici di 7 $\beta$ -idrossicolesterolo e ispessimento dell'intima carotidea riscontrata nell'uomo, ulteriormente supportano il ruolo critico di questo derivato nella genesi e progressione dell'aterosclerosi. Abbiamo inoltre osservato che popolazioni cellulari rilevanti nei processi di formazione della placca, quali cellule endoteliali umane e THP-1 differenziate a macrofagi esprimono il recettore nucleare LXR.

Lo scopo delle nostre successive ricerche è stato quello di determinare il ruolo del recettore nucleare LXR nei processi coinvolti nell'aterogenesi, in risposta ai derivati ossidati del colesterolo, presenti sia nelle lipoproteine ossidate che nella lesione.

Esperimenti preliminari hanno mostrato che in cellule THP-1 differenziate a macrofagi i livelli di LXR aumentano in seguito al trattamento con ligandi di questo recettore. Successivamente, è stata valutata la capacità di LXR di attivare la trascrizione in presenza di LDL, sia native che ossidate, mediante saggi di trasfezione transiente. I risultati ottenuti indicano che solo le LDL ossidate sono in grado di aumentare la trascrizione mediata da LXR in maniera concentrazione-dipendente. Questo effetto è più evidente quando le cellule vengono trattate con simvastatina, probabilmente perchè si previene l'effetto inibitorio sull'attività di LXR di alcuni intermedi della via del mevalonato. Per identificare la componente delle LDL ossidate responsabile dell'attivazione di LXR, la frazione lipidica di tali lipoproteine è stata estratta, analizzata mediante gas cromatografia-spettrometria di massa e ne è stata valutata l'attività biologica con saggi di trasfezione transiente. I dati ottenuti indicano che la capacità delle LDL ossidate di attivare LXR è ascrivibile alla frazione lipidica neutra, contenente principalmente derivati ossidati del colesterolo in posizione 7.

I risultati qui riportati rappresentano una base di partenza per una maggiore comprensione del ruolo di LXR e dei suoi ligandi endogeni nel trasporto inverso del colesterolo e nella genesi della placca aterosclerotica.

## LA CHIMASI MASTOCITARIA DEGRADA L'APOA-I ED INIBISCE L'ABILITA' DELLE HDL DI PROMUOVERE EFFLUSSO DI COLESTEROLO CELLULARE

L. Calabresi, M Lee\*, PT Kovanen\*, G Franceschini

Centro E. Grossi Paoletti, Dipartimento di Scienze Farmacologiche, Milano; \*Wihuri Research Institute, Helsinki, Finlandia

I mastociti umani, presenti anche nelle lesioni ateromasiche, sono una ricca fonte di proteasi neutre, tra cui la chimasi. E' stato precedentemente dimostrato che l'incubazione di HDL<sub>3</sub> con chimasi degrada le apolipoproteine con conseguente perdita della capacità delle HDL di promuovere efflusso di colesterolo cellulare. In questo studio è stato valutato l'effetto della chimasi sulla degradazione di apoA-I e apoA-II in HDL ricostituite (rHDL) e sull'abilità delle rHDL di promuovere efflusso di colesterolo. A tal fine rHDL contenenti apoA-I o apoA-II sono state preparate da apolipoproteine purificate e fosfolipidi sintetici (palmitoil-oleoil-fosfatidilcolina). Le rHDL sono state quindi incubate con chimasi di ratto o con chimasi umana ricombinante per diversi tempi. La chimasi taglia l'apoA-I sia all'ammino-terminale (Tyr18 e Phe33) che al carbossi-terminale (Phe225). La degradazione della proteina non si associa ad alcuna alterazione dell'integrità delle particelle rHDL che non variano dimensione (9.6 nm di diametro) e mobilità elettroforetica su gel di agarosio (pre- $\beta$ ). Le rHDL contenenti apoA-II sono invece totalmente resistenti alla proteasi, infatti durante 6 ore di incubazione non si osserva alcuna degradazione della proteina. L'effetto dell'incubazione con chimasi sulla funzionalità delle rHDL è stato valutato misurando l'abilità delle particelle native e trattate con la proteasi di promuovere efflusso di colesterolo da macrofagi peritoneali di topo. rHDL contenenti apoA-I o apoA-II sono ugualmente efficaci nel captare colesterolo cellulare. La degradazione dell'apoA-I da parte della chimasi riduce del 25-30% l'abilità delle particelle rHDL di promuovere efflusso di colesterolo, suggerendo che una porzione importante nella funzionalità della proteina viene tagliata dalla proteasi. Al contrario, non si osserva alcun effetto della chimasi sulla funzionalità delle rHDL con apoA-II. In conclusione, la proteolisi delle rHDL contenenti apoA-I da parte della chimasi liberata dai mastociti riduce significativamente l'abilità delle particelle di captare colesterolo cellulare. Questi risultati suggeriscono che i mastociti attivati, degranulando e liberando chimasi, possono interferire con la fase iniziale del trasporto inverso del colesterolo.

## REGOLAZIONE DEL TRASPORTO INTRACELLULARE DI COLESTEROLO NEI MONOCITI-MACROFAGI UMANI

A.Cignarella, T.Engel\*, R.Paoletti, P.Cullen\*, G.Assmann\*

Dipartimento di Scienze Farmacologiche, Università di Milano; \*Istituto per la Ricerca sull'Arteriosclerosi, Università di Münster (Germania)

I macrofagi umani in coltura rilasciano colesterolo anche in assenza di accettori esogeni nel terreno di coltura. Questo processo è probabilmente facilitato dall'apolipoproteina (apo)E di origine endogena. In questo lavoro è stata studiata la regolazione farmacologica della secrezione di apoE e dell'efflusso del colesterolo in macrofagi umani convertiti in cellule schiumose. I macrofagi di 10 donatori apoE3/3 sono stati trattati con AcLDL (80 µg/ml) per 24 h e quindi incubati per 24 h in terreno privo di siero per valutare l'efflusso di colesterolo libero (FC). Farmaci che interferiscono con passaggi diversi del trasporto intracellulare del colesterolo, quali l'inibitore dell'ACAT avasimibe, il progesterone e l'atorvastatina, riducono il colesterolo estere (CE) e aumentano il FC intracellulare. L'imipramina, invece, non influenza il livello di CE. L'efflusso di FC raddoppia con avasimibe, aumenta del 20% con progesterone ed imipramina e non varia con atorvastatina. In assenza di farmaci, l'incubazione con un anticorpo anti-apoE riduce l'efflusso di FC del 25%. Inoltre, la secrezione di apoE viene ridotta del 40-85% da tutti i farmaci tranne l'atorvastatina. Per esaminare anche il ruolo dei recettori nucleari in questi processi, i macrofagi sono stati trattati con gli agonisti di LXR 22-idrossi-colesterolo e di RXR acido 9-cis-retinoico. Il FC intracellulare aumenta e il CE diminuisce del 30%; tuttavia, l'efflusso di FC e la secrezione di apoE aumentano rispettivamente del 56% e di quasi 4 volte solo nelle cellule non trattate con AcLDL. In conclusione: 1) una ridotta formazione di CE non stimola necessariamente l'efflusso di FC dai macrofagi; 2) un efflusso netto di FC può non essere associato ad un aumento di apoE nel medium di coltura; 3) l'attivazione di LXR/RXR potenzia la secrezione di apoE e FC in modo più rilevante nelle cellule non caricate di colesterolo; 4) LXR può essere un buon target per nuovi farmaci che prevengano la formazione di cellule schiumose.

## HDL RICOSTITUITE PROTEGGONO IL CUORE DAL DANNO CARDIACO POST-ISCHEMICO

M. Gomaraschi, L. Calabresi, \*G. Rossoni, \*F. Berti, G. Franceschini  
Centro E. Grossi Paoletti, Dipartimento di Scienze Farmacologiche e \*Dipartimento di Farmacologia,  
Chemioterapia e Tossicologia Medica, Università degli Studi di Milano

Alti livelli di HDL si associano ad un ridotto rischio cardiovascolare, un effetto comunemente attribuito al ruolo centrale svolto da questa classe di lipoproteine nel trasporto inverso del colesterolo. Inoltre le HDL esercitano una serie di effetti cellulari addizionali, come l'induzione della sintesi e la stabilizzazione della prostaciclina, che possono contribuire al meccanismo protettivo della parete arteriosa in condizioni non associate all'aumento della deposizione di lipidi. Queste considerazioni ci hanno spinto a valutare l'effetto protettivo diretto delle HDL contro la disfunzione miocardica post-ischemica in un modello di cuore isolato di ratto. Risultati precedentemente ottenuti nel nostro laboratorio mostrano come l'infusione sia pre-ischemica che post-ischemica di HDL separate dal plasma di volontari sani comporti a concentrazioni fisiologiche una protezione dose-dipendente dal danno ischemico, con un recupero pressoché completo della capacità contrattile del ventricolo sinistro durante la riperfusione. Utilizzando lo stesso modello, abbiamo testato l'efficacia di HDL ricostituite (rHDL) a partire da fosfatidilcolina (EPC) e apolipoproteina A-I (apoA-I), infuse alla dose di 2,1, 0.5 mg/ml come contenuto proteico. Sono stati inoltre infusi liposomi di EPC e apoA-I lipid-free. I cuori sono stati perfusi per 30 minuti al flusso costante di 15 ml/min; un'ischemia moderata è stata indotta per riduzione del flusso di perfusione a 1 ml/min per 20 minuti, seguita da 30 minuti di riperfusione al flusso iniziale di 15 ml/min. Nei cuori perfusi con soluzione salina è stata evidenziata alla riperfusione una significativa perdita di capacità contrattile del ventricolo sinistro, con un marcato aumento della pressione di perfusione coronarica (CPP) ed un massiccio rilascio di CK nel perfusato. Nei cuori perfusi con rHDL nei 10 minuti precedenti l'ischemia si è invece registrata una protezione dose-dipendente dal danno ischemico, con un recupero significativo rispetto al veicolo della capacità contrattile del ventricolo sinistro, un incremento minimo di CPP alla riperfusione ed un rilascio di CK nettamente inferiore. L'infusione di liposomi di EPC e di apoA-I lipid-free non comporta invece alcun effetto protettivo. Questi risultati mostrano come anche le rHDL esercitino un effetto protettivo diretto sul cuore contro il danno ischemico in modo dose-dipendente; l'osservazione di tale effetto fornisce indicazioni per un possibile uso terapeutico delle rHDL in una serie di situazioni cliniche in cui è prevedibile l'insorgenza di un moderato episodio ischemico.

## IL TRATTAMENTO CON FARMACI AD ATTIVITA' ANTIOSSIDANTE MIGLIORA LA RISPOSTA VASCOLARE DELL'AORTA DI RATTI FEMMINA SPERIMENTALMENTE DIABETICI PRIMA CHE SI INSTAURI UN DANNO STRUTTURALE.

Christian Pinna, Andrea Cignarella and Lina Puglisi  
Dip. Sci. Farmacologiche - via Balzaretti 9, Milan – Italy

L'endotelio è la prima linea di difesa contro le alterazioni vascolari, perchè rilascia fattori come l'ossido nitrico (NO), di cui sono note le proprietà antiaterosclerotiche. Evidenze indicano inoltre che il diabete altera le risposte vasorilascianti endotelio-dipendenti. Questo è associato all'aumento della produzione di radicali liberi, all'iperglicemia, alla ridotta produzione di prostaciclina ed NO endoteliale. Sono stati studiati gli effetti di due trattamenti con farmaci non correlati chimicamente ma con attività antiossidante, sulla funzione vascolare dell'aorta di ratti sperimentalmente diabetici: la lercanidipina ed il Leucoselect<sup>TM</sup>, miscela di polifenoli naturali, somministrati per os (3 mg/Kg/day) per 1 settimana dopo l'induzione del diabete (streptozotocina: 60 mg/Kg i.v.).

Sono stati formati 4 gruppi per entrambi i sessi: sani, diabetici non trattati, diabetici trattati con lercanidipina o con leucoselect. Sono state studiate le risposte meccaniche di preparati isolati di aorta, indotte da vari agonisti: acetilcolina (ACh), noradrenalina (NA), ilprost (analogo della prostaciclina), superossidodismutasi (SOD), L-nitroarginina metilestere (L-NAME).

Le massime risposte rilascianti NO-mediate (%) indotte da L-NAME:  $130 \pm 3.9$  vs  $118 \pm 3.9$ , SOD:  $71 \pm 6.0$  vs  $57 \pm 7.3$  e ACh:  $92 \pm 4.0$  vs  $84 \pm 6.0$  erano significativamente maggiori nelle femmine rispetto ai maschi non diabetici. Il diabete ha causato un aumento della contractilità (mN/mg) indotta da NA:  $2.30 \pm 0.30$  vs  $1.36 \pm 0.20$  e  $2.30 \pm 0.35$  vs  $1.60 \pm 0.30$  e dal L-NAME:  $155 \pm 10$  vs  $130 \pm 3.9$  e  $158 \pm 13$  vs  $118 \pm 3.9$  nei ratti femmina e maschi rispettivamente, mentre i rilasciamenti indotti da ACh e dall'ilprost erano significativamente attenuati solo nelle femmine. Lercanidipina e Leucoselect hanno riportato alla norma, almeno in parte, le risposte indotte da NA, ACh e ilprost ma non quelle da L-NAME o dal nitroprussiato sodico. Inoltre, entrambi i trattamenti hanno alterato le risposte rilascianti indotte dalla SOD in femmine diabetiche. Questi risultati suggeriscono che l'aorta di ratti femmina è più esposta a danni vascolari causati dal diabete, ma anche più reattiva al trattamento con antiossidanti. Il trattamento con Lercanidipina è risultato più efficace anche in virtù della sua azione calcio-antagonista. L'efficacia del leucoselect può essere in parte spiegata con l'azione sinergica tra i vari componenti la miscela polifenolica.

## **VERCAT: "VALUTAZIONE EPIDEMIOLOGICA DEL RISCHIO CARDIOVASCOLARE ASSOLUTO NELLA POPOLAZIONE DELL'AREA DI TORTONA"**

Dossena C.<sup>°</sup>, Nicoletti M.<sup>#</sup>, Tragni E.<sup>#</sup>, Bennicelli F.<sup>°</sup>.

<sup>°</sup>Reparto di Medicina Interna Ospedale di Tortona, <sup>#</sup>SEFAP, Dipartimento di Scienze Farmacologiche, Università degli Studi di Milano.

È in corso di svolgimento lo studio osservazionale VERCAT svolto in collaborazione con l'ospedale di Tortona, reparto di Medicina Interna, e i Medici di Medicina Generale del territorio, e il coordinamento del Servizio di Epidemiologia e Farmacologia Preventiva (SEFAP), Dipartimento di Scienze Farmacologiche, dell'Università degli Studi di Milano

### **DISEGNO DELLO STUDIO**

Lo studio coinvolge circa 30 Medici di Medicina Generale che stanno arruolando, secondo una lista di randomizzazione, un numero minimo di 30 soggetti dalle loro liste.

Il Medico effettua una visita standardizzata con il rilevamento di dati anamnestici, dei parametri antropometrici e vitali e fa compilare ai soggetti dei questionari sulle loro abitudini alimentari e sullo stato di salute. Inoltre il Medico compila una scheda raccolta dati ed invia ciascun soggetto al Reparto di Medicina Interna dell'Ospedale di Tortona (Centro) per l'esecuzione di un prelievo ematico e di esami diagnostici non invasivi (ECO ed ECO-DOPPLER). Sulla base dei dati raccolti viene calcolato il rischio cardiovascolare assoluto (RCVA) inteso come probabilità percentuale di avere eventi cardiovascolari nei prossimi 10 anni, secondo l'algoritmo di Framingham.

I soggetti che risultano avere un RCVA  $\geq 20\%$  sono indirizzati ad un intervento, mirato alla riduzione dello stesso, in collaborazione con il Medico curante. Il soggetto torna dal Medico ed al Centro a 2 e 6 mesi dalla prima visita per verificare l'efficacia della strategia adottata ed in quella occasione vengono rilevati i principali fattori di rischio modificabili.

A 12 mesi dall'arruolamento, tutti i soggetti tornano dal Medico ed al Centro per una visita di controllo che prevede le stesse indagini effettuate alla prima visita.

### **END POINTS**

- Valutare la distribuzione del RCVA in un campione della popolazione dell'area di Tortona.
- Valutare nei soggetti a medio-basso rischio l'andamento nel tempo del RCVA.
- Valutare in soggetti ad alto rischio l'effetto di interventi mirati alla riduzione del RCVA.

### **CRITERI DI INCLUSIONE ED ESCLUSIONE**

I soggetti, uomini e donne, arruolati devono essere di età compresa tra 45 e 75 anni. Nel caso in cui il soggetto individuato non corrisponda ai criteri di selezione, si contatta il soggetto dell'elenco contrassegnato dal numero successivo, nel caso di numero assegnato pari, o da quello precedente, nel caso di numero assegnato dispari.

Lo studio prevede che vengano arruolati almeno 720 soggetti con RCVA  $< 20\%$  ed almeno 180 soggetti con RCVA  $\geq 20\%$ . Lo studio verrà chiuso quando saranno raggiunti gli obiettivi di numerosità indicati.

Sono esclusi dallo studio quei soggetti che non forniscano il consenso informato o che, per ragioni oggettive, non possono aderire al progetto, quali ad esempio: problemi di deambulazione, presenza di handicap, presenza di tumori, disturbi psichiatrici, ed ogni altra causa secondo il giudizio del medico curante.

*Studio svolto nell'ambito del Progetto RCVA-net della SISA, Sezione Regionale Lombarda*

## L'IPERLIPEMIA POSTPRANDIALE MODIFICA LA RISPOSTA VASCOLARE ENDOTELIO-MEDIATA

S. Raselli<sup>°</sup>, L. Grigore<sup>°</sup>, L. Redaelli<sup>°</sup>, S. Fantappiè<sup>°</sup> e F. M. Maggi<sup>°#</sup>.

<sup>°</sup> Centro ATR, Ospedale Bassini, Cinisello B.mo, Milano

<sup>#</sup> Dip. di Scienze Farmacologiche, Università degli Studi di Milano, Milano

L'iperlipidemia postprandiale, valutata come risposta ad un carico orale di lipidi (OFL), è un fattore di rischio primario ed indipendente per malattie cardiocoronariche. E' stato dimostrato che i remnant lipoproteici si accumulano nelle pareti arteriose e le TGRL di soggetti ipertrigliceridemicici sono in grado di caricare di lipidi i macrofagi, suggerendo che un eccesso di questi tipi di particelle, come si osserva nello stato pp, possa portare allo sviluppo di aterosclerosi. La disfunzione endoteliale è considerata uno degli eventi precoci nello sviluppo dell'aterosclerosi. La funzionalità dell'endotelio può essere valutata in vivo ricorrendo alla misurazione della vasodilatazione endotelio-dipendente, flusso mediata (FMD) dell'arteria brachiale, utilizzando l'ultrasonografia ad alta risoluzione. I dati in letteratura riguardanti gli effetti della lipemia pp sulla FMD sono discordanti.

Scopo del nostro studio è stato quello di valutare le modificazioni indotte dall'iperlipemia conseguente a OFL sulla FMD. Abbiamo studiato 10 pazienti maschi di età compresa tra 31 e 59 anni (COL tot a digiuno  $250 \pm 37.5$  mg/dl, TG a digiuno  $241 \pm 53.9$  mg/dl, HDL  $37.4 \pm 3.6$  mg/dl, apo B  $126 \pm 15.4$  mg/dl) a cui è stato somministrato un OFL la cui composizione rispetto le calorie totali è del 82% in lipidi, 9% in protidi, 9% in glucidi, contenente 892 mg di colesterolo per un totale di 1280 kcal. Il profilo lipidico e lipoproteico dei pazienti in studio è stato valutato prima e 2, 4, 6, 8 ore dopo l'assunzione del pasto lipidico.

Come atteso, in fase postprandiale le trigliceridemia totale aumenta in maniera significativa con un picco alla 4° ora dopo OFL per decrescere all'8° ora a valori vicini a quelli di partenza (Fig.1). Quest'incremento è legato ad un aumento sia del contenuto in trigliceridi delle lipoproteine con  $d < 1.019$  g/ml che della concentrazione di apoB nelle TGRL.

La funzionalità endoteliale, valutata come FMD, si modifica in maniera significativa durante la fase postprandiale come mostrato in Fig.2

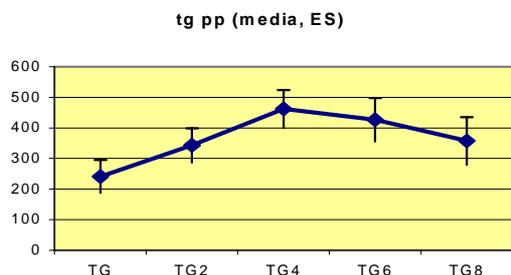


Fig. 1

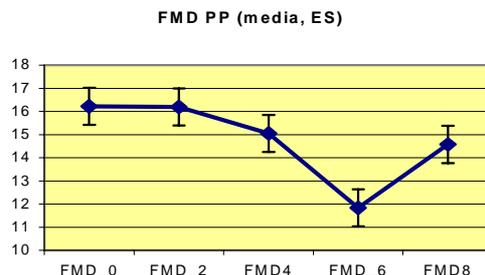


Fig.2

Alla 4° ora si osserva una riduzione del 7.3% della FMD (da 16.2% a digiuno a 15% alla quarta ora) che raggiunge la significatività statistica alla 6° ora dopo OFL (11.8 %, rispetto il valore a digiuno,  $p < 0.05$ ).

La riduzione della FMD non correla con nessuno dei parametri lipidici valutati, suggerendo che sottofrazioni particolari delle lipoproteine (es. remnant lipoproteici) possano essere coinvolte nella modulazione della risposta vascolare endotelio mediata.

## RISPOSTA VASCOLARE ENDOTELIO-MEDIATA E MODIFICAZIONI OSSIDATIVE DELLE LDL IN PAZIENTI DIALIZZATI: EFFETTI DELL'ACIDO FOLICO

S. Fantappiè°, S. Raselli°, F. M. Maggi<sup>§</sup>°, I. Baragetti\*, F. Moscatelli° e G. Buccianti\*.  
Università degli Studi di Milano: °Centro Aterosclerosi, Ospedale Bassini e §Dipartimento di Scienze Farmacologiche; \*Ospedale Bassini: Servizio di Nefrologia e Dialisi, Cinisello Balsamo.

I pazienti con insufficienza renale cronica presentano livelli plasmatici di omocisteina particolarmente elevati; la somministrazione di acido folico o dei suoi metaboliti riduce ma non normalizza questi valori.

L'iperomocisteinemia rappresenta un fattore di rischio indipendente per lo sviluppo dell'arteriosclerosi, ad essa si associa uno stato pro-ossidativo che può condurre alla modificazione delle LDL e ad un danno dell'endotelio vascolare. La funzionalità endoteliale può essere valutata in vivo misurando la risposta vasodilatatoria flusso-mediata (FMD) dell'arteria brachiale, mediante ecografia B-mode.

Scopo della ricerca è stato quello di valutare gli effetti della somministrazione di 5-metiltetraidrofolato (MTHF) alla dose di 45 mg/settimana per 8 settimane, per infusione endovenosa, in 14 pazienti con insufficienza renale cronica, clinicamente stabili, in trattamento emodialitico (HD) con membrana AFB (acetate free biofiltration) sulla vasodilatazione endotelio-dipendente (FMD). Quali indici di ossidazione lipoproteica sono state inoltre misurate le concentrazioni di dieni coniugati e malondialdeide (MDA) nelle LDL plasmatiche ed titoli di immunoglobuline (IgG e IgM) contro LDL modificate con malondialdeide (MDA-LDL).

Il trattamento con folati non modifica il profilo lipidico e apoproteico dei pazienti HD, gli altri parametri presi in esame sono riportati nella tabella che segue:

	Prima della terapia	Dopo la terapia
Omocisteina $\mu\text{moli/L}$	$42.3 \pm 27.1$	$23.1 \pm 7.4$ "
FMD %	$7.03 \pm 6.17$	$12.52 \pm 9.25$ +
Dieni coniugati $\mu\text{moli} / 100 \text{ mg col LDL}$	$2.20 \pm 1.28$	$2.31 \pm 1.04$
MDA nmoli/100 mg col LDL	$1.17 \pm 0.76$	$1.49 \pm 0.70$
IgG anti MDA-LDL	$1.21 \pm 0.68$	$1.55 \pm 0.70$
IgM anti MDA-LDL	$1.15 \pm 0.28$	$1.19 \pm 1.06$
Albumin g/dL	$3.5 \pm 0.1$	$3.9 \pm 0.3$

Medie  $\pm$  SD. \* $p < 0.005$ ; "  $p < 0.01$ ; +  $p < 0.05$ .

I parametri ossidativi valutati non subiscono modificazioni dopo il trattamento con folati. I livelli di omocisteina sono invece ridotti in maniera significativa, mentre l'FMD aumenta, tornando a valori di normalità.

Il miglioramento dell'FMD non correla, però, con la riduzione dei valori di omocisteina circolante.

## EFFETTI DELLA SIMVASTATINA 20 MG SULLA PRESSIONE ARTERIOSA IN PAZIENTI IPERCOLESTEROLEMICI

Emanuela Colombo, Cristina Berra, Anna Maria Fiorenza, Adriana Torri,  
Angelo Rovellini\*, Domenico Sommariva, Adriana Branchi\*

Divisione di Medicina Interna 1, Ospedale G. Salvini, Garbagnate Milanese;

\*Dipartimento di Medicina Interna, Università di Milano, Ospedale Maggiore IRCCS, Milano.

In numerosi studi epidemiologici è stata rilevata una relazione positiva tra colesterolemia e pressione arteriosa (PA). E' possibile che l'incremento dei valori pressori in parallelo con quelli del colesterolo sia sostenuto dagli effetti negativi delle LDL sulla vasodilatazione endotelio- dipendente. Lo scopo di questo studio è stato quello di verificare se alla riduzione della colesterolemia con una statina si associasse una variazione della PA. Sono stati inclusi nello studio 76 pazienti con ipercolesterolemia primitiva in terapia dietetica da oltre 2 mesi. Tutti i pazienti sono stati trattati con Simvastatina alla dose di 10 mg la sera per 6 settimane e poi con una dose di 20 mg per altre 12 settimane. Al termine del periodo di trattamento, la PA sistolica (PAS) si è ridotta in media del 4.0%, la PA diastolica (PAD) del 3.9%. La riduzione è risultata statisticamente significativa solo nel sottogruppo di pazienti ipertesi (PAS $\geq$ 140 mmHg e/o PAD $\geq$ 90 mm/Hg), ma non in quello dei pazienti normotesi. Il colesterolo totale si è ridotto del 26.5%, il colesterolo LDL del 36.6%, i trigliceridi del 12.2%. Il colesterolo HDL è aumentato del 6.8%. Il peso corporeo non ha subito variazioni significative. (da 66.2 $\pm$ 1.60 a 67.4 $\pm$ 1.26 Kg). Le variazioni del quadro lipidico sono risultate sovrapponibili nei pazienti ipertesi e in quelli normotesi. Non è emersa alcuna relazione tra le variazioni del quadro lipidico e del peso corporeo e le variazioni della PA sistolica o diastolica. Il meccanismo attraverso il quale la simvastatina determina una riduzione della PA non è chiaro. Si può ipotizzare che il farmaco migliori la funzione endoteliale, soprattutto nei pazienti, come gli ipertesi, in cui essa è più compromessa. Osservazioni sperimentali hanno infatti dimostrato che le statine aumentano la sintesi di ossido nitrico e bloccano l'influsso di calcio ioni a livello endoteliale, riducono i livelli plasmatici di aldosterone e aumentano la produzione di acido arachidonico. Non è certo comunque se queste azioni siano da attribuire ad un effetto specifico delle statine, diverso dall'attività sul colesterolo. Una riduzione della PA è stata riportata infatti anche con trattamenti ipocolesterolemizzanti diversi dalle statine.

	Normotesi N. 51		Ipertesi N. 25	
	Basale	$\Delta\%$	Basale	$\Delta\%$
PAS mmHg	126.5 $\pm$ 1.50	0.1	155.9 $\pm$ 3.68	-10.7
PAD mmHg	77.5 $\pm$ 0.77	-2.5	89.4 $\pm$ 1.62	-6.5
Peso Kg	64.4 $\pm$ 1.43	1.4	69.8 $\pm$ 3.84	2.7
Colesterolo totale mg/dL	317.3 $\pm$ 4.76	-25.8	311.6 $\pm$ 7.76	-28.2
Colesterolo LDL mg/dL	231.8 $\pm$ 5.09	-35.5	221.9 $\pm$ 7.88	-38.9
Colesterolo HDL mg/dL	56.4 $\pm$ 1.90	4.2	55.0 $\pm$ 2.59	12.1
Trigliceridi mg/dL	145.5 $\pm$ 8.96	-5.8	173.5 $\pm$ 13.86	-23.0

## VARIAZIONI METABOLICHE NEI DIABETICI DI TIPO 2 CAUSATE DA UNA DIFFERENTE TERAPIA IPOGLICEMIZZANTE: CONFRONTO TRA GLIMEPIRIDE E METFORMINA

G. Derosa, A. Mugellini, \*I. Franzetti, G. Crescenzi, D. Daffra e R. Fogari

Dipartimento di Medicina Interna e Terapia Medica, Sezione di Medicina Interna, Malattie Vascolari e Metaboliche, Università degli Studi di Pavia, IRCCS Policlinico S. Matteo, PAVIA; \*U.O. di Diabetologia, Azienda Ospedale di Circolo, VARESE.

Scopo dello studio: tale studio ha confrontato Glimepiride e Metformina in una popolazione di diabetici di tipo 2 ed ha valutato alcuni parametri di compenso glico-metabolico e di rischio cardiovascolare.

Metodi: abbiamo valutato 164 diabetici di tipo 2 (80 maschi ed 84 femmine; 38 maschi e 43 femmine, di età  $56 \pm 10$  con Glimepiride (G); 42 maschi e 41 femmine, di età  $58 \pm 9$  con Metformina (M)) con diagnosi di non più di 6 mesi, non fumatori, normotesi, non cardiopatici, con normale funzionalità renale e non assunti farmaci quali ipolipidizzanti, diuretici,  $\beta$ -bloccanti o tiroxina. È stata somministrata Glimepiride (da 2 a 4 mg/die) o Metformina (da 1000 a 2550 mg/die) in uno studio controllato, randomizzato, in aperto. Abbiamo valutato alcuni parametri metabolici dopo 6 e 12 mesi di tale trattamento.

Risultati: abbiamo osservato una variazione significativa dopo 6 e 12 mesi di questo trattamento nell'emoglobina glicosilata, nella glicemia basale e post-prandiale (gruppo G e M); dopo 6 mesi nell'insulinemia post-prandiale (gruppo M), nella Lp(a) e nella omocisteinemia (gruppo G). Inoltre, abbiamo riscontrato una variazione significativa dopo 12 mesi nell'insulinemia basale e post-prandiale, nell'LDL-colesterolo (gruppo M), nella Lp(a) e nel PAI-1 (gruppo G e M) e nell'omocisteinemia (gruppo G).

Conclusioni: Glimepiride e Metformina non solo hanno migliorato, nei diabetici di tipo 2, il compenso glico-metabolico, verificato con i parametri inerenti il metabolismo glucidico, ma anche altri parametri metabolici di rischio cardiovascolare. È possibile che le riduzioni dei parametri extra-glicemici siano dovuti al miglioramento, verificatosi con tali farmaci, del metabolismo glucidico, anche se non può essere esclusa un'azione diretta di Glimepiride e Metformina.

## POLIMORFISMO T→786C NEL PROMOTORE DI ENOS E RISCHIO DI PLACCHE CAROTIDEE

Simona Leviti \*, Olivia Turri \*,Mara Bernini \*,Davide Gobatti \*\*,Giorgio Ghilardi \*\*,Maria Luisa Biondi \*,Emma Guagnellini \*.

\*Laboratorio Analisi Chimica Clinica e Microbiologia, Azienda Ospedaliera san Paolo

\*\*Dipartimento di Medicina, Chirurgia e Odontoiatria, Ospedale S. Paolo - Clinica Chirurgica Generale - Università degli Studi di Milano

L'ossido nitrico (NO) svolge un ruolo chiave nel processo aterosclerotico. NO è sintetizzato a partire da L-Arginina dall'enzima NOSintasi. Delle tre isoforme quella da noi presa in considerazione è la forma costitutiva endoteliale eNOS.

Recentemente è stata descritta un'associazione tra la mutazione T→786 C nella regione del promotore di eNOS e il danno endoteliale. Questo polimorfismo influenza la sintesi di eNOS in quanto la forma allelica C determina una ridotta produzione di NO.

Scopo di questo studio è stato quello di studiare una possibile associazione tra il polimorfismo T→786 C e il rischio di formazione di placche aterosclerotiche a livello carotideo.

Abbiamo studiato 88 pazienti consecutivamente ricoverati per intervento alle carotidi e 133 soggetti sani. Per rivelare la presenza del polimorfismo abbiamo utilizzato la tecnica di PCR seguita da discriminazione allelica per ibridazione con sonde fluorescenti (7700 Sequence Detection System, Applied Biosystem).

I nostri risultati hanno evidenziato una distribuzione genotipica significativamente differente tra pazienti e controlli; infatti, la frequenza del genotipo CC è rispettivamente del 26% e 13/ (OR 2.26; 95% CI, da 1.14 a 4.46; p=0.018). Inoltre abbiamo riscontrato una frequenza maggiore del genotipo CC in caso di placche ulcerate rispetto a lesioni non ulcerate (44% vs 17%; OR 3.82; 95% IC, da 1.79 a 8.14; p=0.003).L'analisi di regressione logistica multipla utilizzando fattori di rischio ambientale e la variante del gene eNOS ha mostrato che il genotipo CC è un fattore di rischio indipendente per l'ateroma carotideo (p=0.023).

L'omozigosità per l'allele C in posizione 786 del promotore di eNOS sembra essere un fattore di rischio indipendente per lo sviluppo di placche carotidiche, specialmente di lesioni ulcerate, segno di instabilità e quindi di gravità della lesione aterosclerotica. Questo fatto, se confermato da più ampi studi, potrebbe fornire ulteriori informazioni sulla genesi di aterosclerosi a livello carotideo e aprire nuove possibilità di trattamento e prevenzione.

## DETERMINANTI DELLA LIPEMIA POSTPRANDIALE. DIFFERENZE TRA I SESSI

Cristina Berra, Emanuela Colombo, Adriana Torri, Domenico Sommariva, Adriana Branchi\*

Divisione di Medicina Interna 1, Ospedale G. Salvini, Garbagnate Milanese;

\*Dipartimento di Medicina Interna, Università di Milano, Ospedale Maggiore IRCCS, Milano.

La lipemia postprandiale è considerata un importante indice di rischio cardiovascolare. Lo studio della lipemia postprandiale è in generale basato sulla valutazione del quadro lipidico dopo pasto di prova a relativamente alto contenuto in grassi. Il pasto standardizzato, sebbene di grande utilità nelle prove sperimentali, non rispecchia l'effettiva assunzione abituale di nutrienti. Scopo di questo studio, di cui presentiamo i dati preliminari, è stato quello di valutare le modificazioni postprandiali del quadro lipidico in condizioni vicine a quelle usuali di vita. Nello studio sono inclusi 41 soggetti, 20 di sesso maschile e 21 di sesso femminile. In tutti i soggetti è stato eseguito un prelievo di sangue il mattino a digiuno, dopo 2 e dopo 4.30 ore dal pasto principale (14:30 e 17:00) per la determinazione dei parametri biochimici. Per ogni soggetto è stata eseguita un'accurata analisi alimentare che ha permesso di ricostruire la quantità ed il tipo dei nutrienti assunti. Per i maschi l'apporto calorico è risultato essere in media di 1.129 Kcal ripartito in carboidrati 53%, grassi 30%, proteine 17%. Per le donne, l'apporto calorico era di 1030 Kcal con il 51% di carboidrati, il 31% di grassi ed il 18% di proteine. Le fibre alimentari erano 16.5 g per gli uomini e 12.6 g per le donne. In media, i trigliceridi (TGL) basali erano più alti ed il colesterolo HDL più basso negli uomini che nelle donne. Non si sono riscontrate altre differenze significative tra i due gruppi. I TGL hanno raggiunto il loro massimo dopo 4.30 ore dal pasto principale (+44% negli uomini e +23% nelle donne,  $P < 0.03$ ), la glicemia e l'insulinemia dopo 2 ore. Sia negli uomini che nelle donne, il colesterolo LDL (formula di Friedewald) è significativamente diminuito dopo 2 ore dal pasto ed è rimasto più basso del basale anche dopo 4.30 ore (-14% negli uomini e -5% nelle donne). Nei maschi la variazione dei TGL, dopo pasto normale che contemplava quantità equivalenti di nutrienti, è risultata dunque significativamente maggiore che nelle donne. E' da notare che nei maschi i valori basali dei TGL era più alto che nelle donne e l'analisi della regressione multipla ha dimostrato che il livello basale dei TGL era l'unica variabile significativamente associata alla trigliceridemia postprandiale (F parziale 5.652). E' possibile che la differenza della trigliceridemia postprandiale tra i due sessi, sia dovuta al livello basale dei TGL o anche ad un più efficiente metabolismo delle lipoproteine ricche in TGL nelle donne.

	Maschi N. 20			Femmine N. 21		
	h 8:00	h 14:30	h 17:00	h 8:00	h 14:30	h 17:00
Trigliceridi mg/dL	167±17	227±26	241±25	110±10	135±14	136±12
Colesterolo totale mg/dL	210±9	204±8	206±8	211±11	204±11	208±11
Colesterolo LDL mg/dL	138±8	121±7	119±7	136±10	127±10	129±9
Colesterolo HDL mg/dL	39±3	37±3	39±3	54±4	51±3	52±3
Glucosio mg/dL	97±4	113±5	98±5	92±3	114±6	102±3
Insulina (IRI) uU/mL	11±1	57±9	32±6	13±3	58±9	32±7

## EFFETTI DEL FOSINOPRIL SUL PROFILO LIPIDICO E SULLA Lp (a) IN SOGGETTI NORMOTESI, MICROALBUMINURICI E DIABETICI DI TIPO 2

G. Derosa, D. Daffra, A. Mugellini, G. Crescenzi e R. Fogari

Dipartimento di Medicina Interna e Terapia Medica, Sezione di Medicina Interna, Malattie Vascolari e Metaboliche, Università degli Studi di Pavia, IRCCS Policlinico S. Matteo, PAVIA.

Scopo dello studio: i soggetti diabetici spesso presentano altri fattori di rischio cardiovascolari e le alterazioni del profilo lipidico ne rappresentano un importante esempio. Un presidio farmacologico particolarmente importante è costituito dagli ACE-inibitori, soprattutto se i diabetici risultano proteinurici; lo studio ha valutato il profilo lipidico (Colesterolo Totale (TC), LDL-Colesterolo (LDL-C), HDL-Colesterolo, Trigliceridi) e Lp(a) nei pazienti diabetici di tipo 2, normotesi, con microalbuminuria (AER), durante trattamento con Fosinopril e dopo la sua sospensione.

Metodi: abbiamo arruolato 120 pazienti, diabetici di tipo 2, normotesi, con microalbuminuria e con profilo lipidico nella norma ed in compenso glico-metabolico. Abbiamo somministrato Fosinopril, 10 mg/die per un periodo di 6 mesi.

Risultati: abbiamo notato una variazione statisticamente significativa al 6° mese, durante la terapia con Fosinopril in SBP ( $125 \pm 4.1$  vs  $119 \pm 5$  mmHg,  $p < 0.01$ ), DBP ( $80 \pm 4.8$  vs  $74 \pm 4.5$  mmHg,  $p < 0.05$ ), TC ( $186 \pm 11$  vs  $176 \pm 10$  mg/dl,  $p < 0.05$ ), LDL-C ( $124 \pm 10$  vs  $114 \pm 11$  mg/dl,  $p < 0.05$ ), Lp(a) ( $24 \pm 10$  vs  $19 \pm 7.5$  mg/dl,  $p < 0.05$ ) e in AER ( $123 \pm 31$  vs  $68 \pm 21$  mg/24h,  $p < 0.01$ ). Quando abbiamo interrotto tale terapia per 1 mese, si è osservata una tendenza a ritornare ai valori basali.

Conclusioni: il trattamento con Fosinopril ha portato ad una riduzione della microalbuminuria ed ha anche mostrato di migliorare il profilo lipidico e la Lp(a) nei diabetici di tipo 2. Ciò suggerisce che il Fosinopril, riducendo la proteinuria, ha permesso conseguentemente un miglioramento del quadro lipidico e della Lp(a). È anche possibile che questa azione non sia solo in relazione con la riduzione della proteinuria, ma con altri meccanismi più diretti del Fosinopril sul metabolismo lipidico e della Lp(a).

## EFFETTO ANTIOSSIDANTE, IN VIVO, DI UN ESTRATTO DI *VITIS VINIFERA* IN PAZIENTI CON DIABETE NON INSULINO-DIPENDENTE

F. M. Maggi\*<sup>°</sup>, A. Sala<sup>&°</sup>, A. Zoppo\*, E. Tragni<sup>°</sup>, S. Viapiani<sup>°</sup>, S. Zarini<sup>°</sup> e A.L. Catapano<sup>°\*</sup>

\*Centro Aterosclerosi, Osp. Bassini; <sup>°</sup>Dip. Scienze Farmacologiche; <sup>&</sup>Centro di Farmacologia Cardiopolmonare, Università degli Studi di Milano, Milano

Il diabete è una patologia associata con un aumento della perossidazione lipidica e dell'attivazione piastrinica che portano ad una aumentata incidenza di malattie cardiocircolatorie.

Recentemente è stato dimostrato che nei soggetti diabetici è aumentata la produzione di F<sub>2</sub> isoprostani, prodotti di perossidazione non enzimatica dell'acido arachidonico (Davi, G. et Al. *Circulation* **99**(2), 224-229, 1999). Un attento controllo metabolico e l'assunzione di elevate dosi di Vit. E sono in grado di ridurre l'escrezione urinaria di 8-iso-Prostaglandina F<sub>2α</sub>, oltre ad una riduzione della sintesi piastrinica di trombossano B<sub>2</sub> (ibidem). La *Vitis vinifera* (la comune vite da vino) rappresenta una ricca fonte di anti-ossidanti a struttura polifenolica (Maffei Facino R. et Al. *Arzneim-Forsch.* **44**(5), 592-601,1994), con una potenziale capacità di ridurre la perossidazione lipidica in vivo, come suggerito dal cosiddetto "paradosso francese".

Scopo del nostro studio è stato quello di valutare l'attività antiossidante di un estratto standardizzato di *Vitis vinifera* (VV) in un gruppo di soggetti diabetici di tipo II.

Lo studio è stato disegnato in doppio-cieco, randomizzato ed in cross-over contro placebo, ha coinvolto 24 pazienti diabetici in controllo metabolico, non obesi e non in terapia con farmaci o integratori con riconosciuta attività antiossidante. L'estratto di VV è stato somministrato alla dose di 300 mg/die, in liposomi di lecitina di soia, per 4 settimane. Sono stati valutati i livelli di 8-iso-PG F<sub>2α</sub>, nelle urine raccolte al mattino in presenza di antiossidanti, utilizzando una metodica EIA specifica. Sono stati anche valutati: il profilo glicidico e lipidico, l'attività antiossidante del plasma e i titoli di autoanticorpi contro LDL-modificate, come parametro suggestivo della ossidazione tissutale delle LDL.

In accordo con dati già pubblicati, i livelli urinari di 8-iso-PG F<sub>2α</sub> sono più elevati, in condizioni basali, nei pazienti diabetici rispetto a soggetti di controllo. I valori non si modificano sensibilmente durante il trattamento con placebo (64,8 ±27,1 v.s. 62,8±30 pmol/mmol creatinina), mentre si riducono in maniera statisticamente significativa dopo assunzione dell'estratto di VV (55,2±19,8 pmol/mmol creatinina, p<0,04).

Non si è osservata alcuna variazione significativa, invece, negli altri parametri valutati.

Questi dati suggeriscono che l'estratto titolato di VV espliciti una attività antiossidante in vivo, indipendente da eventuali effetti sul metabolismo.

Questa azione potrebbe risultare particolarmente benefica in pazienti, come i diabetici, in cui i processi ossidativi tissutali sono aumentati e si associano ad una accelerata progressione delle malattie aterosclerotiche.

## ABITUDINI ALIMENTARI E ATEROSCLEROSI CAROTIDEA

L. Redaelli°, L. Grigore°, S. Raselli°, F.M. Maggi°\*, e A.L. Catapano°\*

Università degli Studi di Milano: °Centro Aterosclerosi, Osp. Bassini, \*Dip. Scienze Farmacologiche, Milano

Studi epidemiologici hanno evidenziato presso la popolazione mediterranea una minore diffusione di malattie cardiovascolari rispetto ad altri Paesi europei ed agli Stati Uniti. Al di là delle possibili differenze genetiche, un ruolo protettivo nei confronti delle malattie cardiovascolari sembra essere svolto dalla dieta. Lo spessore medio-intimale della carotide comune è un indice della progressione dell'aterosclerosi.

Allo scopo di valutare l'influenza alimentare sull'aterosclerosi carotidea (tramite la misurazione dell'IMT sul cm prossimale della carotide comune dx) sono stati selezionati 41 soggetti, 25 donne e 16 uomini, di età media  $52 \pm 9.4$  anni, con BMI pari a  $28.7 \pm 12.2$  Kg/m<sup>2</sup>, che hanno compilato un diario alimentare settimanale, annotando quotidianamente ogni alimento, bevanda e condimento da loro assunti riportando le rispettive grammature.

I diari sono stati valutati analizzando i componenti alimentari quali la % media pro/die di lipidi, glucidi e protidi rispetto alle Kcal totali e il quantitativo di ac.grassi (AG) saturi e insaturi. Alla consegna del diario, è stato effettuato un prelievo di sangue per la determinazione del profilo lipidico

La tab.A riassume le medie dei profili lipidici (mg/dl  $\pm$  D.S.) e delle valutazioni ecografiche (mm  $\pm$  D.S.) di tutta la popolazione in studio.

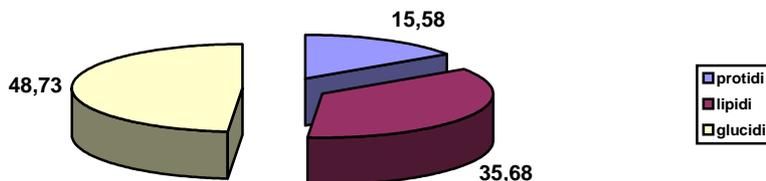
TAB.A:

Col.tot	Col.HDL	TG	Col.LDL	Apo A	Apo B	glicemia	IMT dxm
221.2	57.3	137.2	136.1	159.1	100.5	91.5	0.658
$\pm 43.5$	$\pm 13.3$	$\pm 104.2$	$\pm 46.9$	$\pm 22.0$	$\pm 27.0$	$\pm 18.3$	$\pm 0.13$

Il colesterolo assunto tramite alimenti è pari a  $196.7 \pm 63.89$  mg/die.

La fig.1 riporta le abitudini alimentari (media  $\pm$  SD) dei soggetti in studio:

Fig.1: ASSUNZIONI PRINCIPALI MEDIE/DIE DEI COMPONENTI ALIMENTARI



Il valore medio di IMT dx è risultato pari a  $0.66 \text{ mm} \pm 0.13$ : abbiamo, quindi, considerato come controlli i soggetti con  $\text{IMT} < 0.66 \text{ mm}$  e come patologici i soggetti con  $\text{IMT} \geq 0.66 \text{ mm}$ .

I soggetti ispessiti ( $n=18$ ) mostrano una correlazione significativa tra l'IMT dx e la % di lipidi ( $r=0.66$ ,  $p=0.03$ ), AG monoinsaturi ( $r=0.64$ ,  $p=0.004$ ), glucidi ( $r=-0.55$ ,  $p=0.018$ ), calorie ( $r=-0.43$ ,  $p=0.044$ ) assunti pro die.

I soggetti con  $\text{IMT} < 0.66 \text{ mm}$  non mostrano alcuna correlazione con i parametri sopra indicati.

Questi dati preliminari suggeriscono che modificazioni alimentari anche modeste possono, in soggetti a maggior rischio, influire sullo sviluppo della malattia aterosclerotica.