



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI  
DELL'INSUBRIA**

Corso di Dottorato di ricerca  
in Medicina Clinica e Sperimentale  
e Medical Humanities

**INIBITORI PCSK-9 E INFIAMMAZIONE IN PAZIENTI  
AD ALTO RICHIO CARDIOVASCOLARE**

Relatore:

Pref.ssa Luigina Guasti

Correlatore:

Prof.re Andrea Maria Maresca

Tesi di dottorato di:

Alessandra Lippi

Matricola n. 610865

**Anno accademico 2018-2019**

## Sommario

INTRODUZIONE .....	4
<i>1. Aterosclerosi</i> .....	5
1.1 Definizione .....	5
1.2 Epidemiologia .....	6
1.3 Eziologia.....	7
1.3.1 Iperlipoproteinemie e funzione di PCSK 9 .....	8
1.4 Patogenesi.....	18
1.4.1 Infiammazione e aterosclerosi .....	19
1.4.2 Neutofili e NETs.....	23
<i>2. Statine</i> .....	28
2.1 Statine e infiammazione .....	30
2.2. Statine e NET.....	32
<i>3. Inibitori di PCSK9</i> .....	33
SCOPO .....	37
MATERIALI E METODI .....	39
<i>1. I pazienti</i> .....	40
<i>2. Protocollo di studio</i> .....	41
2.1 Rilevazione dei parametri antropometrici .....	41
2.2 Esami ematochimici .....	41
2.3 Quantificazione dei NETs .....	42
2.4 Rilevazione delle citochine sieriche .....	43
2.5 Analisi statistica .....	43
RISULTATI.....	45
DISCUSSIONE E CONCLUSIONI .....	48
ICONOGRAFIA .....	54
1. Tabelle.....	55
2. Figure.....	59

---

3. Immagini.....	77
BIBLIOGRAFIA .....	88

## **INTRODUZIONE**

## ***1. Aterosclerosi***

### ***1.1 Definizione***

L'aterosclerosi è una condizione patologica caratterizzata da lesioni intimali dette ateromi che protrudono all'interno del lume vasale ostruendo più o meno parzialmente il flusso ematico locale.

Le placche ateromatose consistono in una lesione dotata di un nucleo ricco di lipidi (principalmente colesterolo ed esteri del colesterolo), ricoperta da un solido cappuccio fibroso.

Nonostante molti fattori di rischio sistemici predispongano al suo sviluppo, l'aterosclerosi colpisce di preferenza alcuni parti del circolo con manifestazioni cliniche diverse a seconda del letto vascolare colpito.

L'aterosclerosi delle arterie coronarie determina solitamente angina pectoris e infarto miocardico; l'aterosclerosi delle arterie che vascolarizzano il sistema nervoso centrale provoca di frequente ischemia cerebrale transitoria ed ictus.

Inoltre le lesioni aterosclerotiche spesso si formano in corrispondenza dei punti di ramificazione delle arterie, regioni in cui il flusso ematico è turbolento.

Oltre alle stenosi e alle occlusioni, altre manifestazioni aterosclerotiche possono essere lo sviluppo di ectasie e aneurismi.

L'aterogenesi nell'uomo è un processo che dura molti anni: lesioni aterosclerotiche iniziali sono presenti a livello dell'aorta già nella prima decade di vita, nelle coronarie nella seconda decade e a livello cerebrale dalla terza decade<sup>1</sup>.

Tuttavia, la crescita delle placche aterosclerotiche è un processo discontinuo e non lineare, con periodi di relativa quiescenza alternati ad episodi di rapida evoluzione [Immagine 1].

Dopo un periodo "silente", solitamente prolungato, l'aterosclerosi può divenire clinicamente manifesta.

## ***1.2 Epidemiologia***

L'aterosclerosi rappresenta la principale causa di mortalità e prematura disabilità nei paesi industrializzati.

Secondo i dati del database aggiornato al 2014 della World Health Organization in Europa le malattie cardiovascolari sono responsabili del 46% del totale delle morti (51% nel sesso femminile e 42% in quello maschile), con un andamento molto diverso nei singoli stati. Infatti, mettendo a confronto con il decennio precedente, in dieci paesi occidentali la mortalità per causa cardiovascolare nel sesso maschile è scesa al secondo posto dopo quella per neoplasia, ma in ben quindici paesi queste arrivano ancora ad essere quattro volte quelle per neoplasia.

In Italia, in accordo con i dati registrati nel 2010, la mortalità cardiovascolare ha visto una diminuzione del 33% rispetto ai precedenti 10 anni e, nello specifico, quella per malattia coronarica ha visto una riduzione del 27,5%<sup>2</sup>.

### **1.3 Eziologia**

Nel corso di numerosi studi prospettici sono stati individuati vari fattori di rischio responsabili della diversa prevalenza e gravità dell'aterosclerosi in determinati individui e gruppi di popolazioni.

Tra questi i più noti sono il Framingham Heart Study e l'Atherosclerosis Risk in Communities Study<sup>3</sup> [Immagine 2].

Tali fattori di rischio hanno un effetto moltiplicatore e, quando tre fattori di rischio sono presenti contemporaneamente, la frequenza di infarto miocardico è aumentata di sette volte.

Sono stati riconosciuti fattori di rischio costituzionali e fattori di rischio modificabili.

I primi includono:

- età avanzata
- fattori genetici: sono stati caratterizzati numerosi disturbi mendeliani associati all'aterosclerosi, come l'ipercolesterolemia familiare, anche se malattie genetiche sono responsabili solo di una piccola parte dei casi e più frequentemente vi è una origine multifattoriale legata all'ereditarietà di numerosi polimorfismi genetici
- sesso: le donne in età pre menopausale sono meno a rischio rispetto agli uomini della stessa età, dopo la menopausa, tuttavia, tale rapporto si inverte.

I fattori di rischio modificabili comprendono:

- elevati livelli ematici di LDL
- bassi livelli ematici di HDL (se  $\geq 60$  mg/dL è da considerarsi un fattore protettivo)
- ipertensione arteriosa
- diabete mellito
- fumo
- sedentarietà ed alimentazione scorretta
- sovrappeso ed obesità
- familiarità per patologie cardiovascolari precoci (<55 negli uomini, <65 anni nelle donne)
- patologie infiammatorie
- iperomocisteinemia
- elevati livelli di lipoproteina A, una forma alterata di LDL che contiene l'apolipoproteina B-100 legata all'apolipoproteina A

- elevati livelli di PCR, utile anche come valido biomarker di rischio. Infatti nello studio JUPITER, una specifica analisi mostra che chi raggiunge più bassi livelli di LDL e PCR ha miglior andamento clinico di chi raggiunge uno solo dei due obiettivi<sup>4</sup>
- russamento notturno
- fattori psicosociali
- ipertrigliceridemia (soprattutto nelle donne)
- alcolismo

In base al numero e al tipo di questi fattori, si è in grado di stimare il rischio di sviluppare eventi cardiovascolari a 10 anni di distanza, attraverso un sistema chiamato Heart Score, [Immagine 3] che prevede una serie di tabelle divise secondo il grado di rischio cardiovascolare stimato nei diversi paesi (l'Italia è considerata un paese a basso rischio) valutando: sesso, età, fumo, pressione arteriosa sistolica e livello di colesterolo totale.

Sono considerati Very High Risk pazienti con patologia cardiovascolare documentata, Diabete Mellito di tipo 2 o di tipo 1 con danno d'organo, insufficienza renale cronica (GFR<60 mL/min/1.73 mc) o con Score  $\geq 10\%$  e High Risk quelli con un singolo fattore di rischio elevato (es: ipertensione arteriosa severa) o Score  $\geq 5\%$  e  $<10\%$ .<sup>5</sup>

### ***1.3.1 Iperlipoproteinemie e funzione di PCSK 9***

Le anomalie nelle lipoproteine plasmatiche e i disordini nel metabolismo lipidico sono tra i fattori di rischio per l'aterosclerosi più stabilmente definiti e meglio compresi.

Le linee guida della National Cholesterol Education Project Adult Treatment Panel III (ATP III) stimano il rischio individuale calcolando i fattori di rischio di un individuo ed in base alla categoria di rischio (più basso, moderato, moderatamente alto, alto, molto alto) stabiliscono l'obiettivo LDL (rispettivamente <160 mg/dL, <130 mg/dL, <100 mg/dL, <100 mg/dL o <70 mg/dL se malattia coronarica o equivalenti di rischio per malattia coronarica e <70 mg/dL).

Per i criteri ATP III coloro che presentano livelli di colesterolo LDL >30 mg/dL rispetto all'obiettivo del loro gruppo di rischio sono candidati alla terapia farmacologica.



Le lipoproteine sono grandi complessi macromolecolari che trasportano lipidi idrofobici (principalmente trigliceridi, colesterolo e vitamine liposolubili), che formano un nucleo circondato da lipidi idrofilici (fosfolipidi e colesterolo non esterificato) e proteine.

Le lipoproteine plasmatiche sono divise in cinque classi principali, in base alla loro densità relativa: chilomicroni, lipoproteine a densità molto bassa (VLDL), lipoproteine a densità intermedia (IDL), lipoproteine a bassa densità (LDL) e lipoproteine ad alta densità (HDL).

Le proteine associate alle lipoproteine, denominate apolipoproteine, sono necessarie per un corretto assemblaggio, per la struttura e la funzione delle lipoproteine.

Le apolipoproteine attivano importanti enzimi del metabolismo lipoproteico e agiscono come ligandi dei recettori della superficie cellulare.

L'ApoA-I è presente in tutte le particelle HDL; l'ApoA-II è la seconda apolipoproteina più abbondante delle HDL; l'ApoB è la principale proteina strutturale di chilomicroni, VLDL, IDL e LDL; l'ApoE è presente in multiple copie su chilomicroni, VLDL e IDL.

Fredrikson e Levy hanno classificato le iperlipoproteinemie secondo il tipo di particelle lipoproteiche che si accumulano nel sangue<sup>4</sup>.

Altra classificazione è quella che riconosce forme primitive e forme secondarie. Tra le prime, sono stati identificati numerosi geni responsabili delle forme genetiche di iperlipidemia, pur rimanendo sensibili alle influenze dietetico-comportamentali.

Le alterazioni primarie comprendono:

- Ipercolesterolemia familiare (FH): malattia autosomica codominante causata da un grande numero di mutazioni (>1000) del gene del recettore delle LDL.  
Nella forma omozigote i livelli di colesterolo totale sono generalmente >500 mg/dL essendo l'attività recettoriale di LDL-R compresa tra 0 e 30% e la complicità più devastante è l'aterosclerosi accelerata.
- ApoB-100 difettiva familiare (FDB): causata da mutazione di ApoB-100 nel dominio di legame al recettore delle LDL che determina una ridotta affinità di legame delle LDL al loro recettore e quindi una riduzione della velocità con cui le LDL vengono rimosse dal circolo.

- Ipercolesterolemia autosomica dominante dovuta a mutazioni di PCSK9 (ADH-PCSK9 o ADH3): rara patologia a trasmissione autosomica dominante causata da mutazione con guadagno di funzione di PCSK9, proteina di secrezione che si lega a LDL-R, provocandone la sua degradazione.  
Le mutazioni missenso di PCSK9 che causano ipercolesterolemia aumentano l'attività della pro proteina. Come conseguenza, il numero di recettori epatici per le LDL si riduce. I pazienti con ADH-PCSK9 sono clinicamente indistinguibili dai pazienti con FH.
- Ipercolesterolemia autosomica recessiva (ARH): patologia rara, dovuta a mutazioni in una proteina coinvolta nel processo di endocitosi delle LDL mediata dal recettore epatico delle LDL, tale per cui le LDL si legano al loro recettore ma il complesso non viene internalizzato.
- Sitosterolemia: malattia autosomica recessiva causata da mutazioni di uno dei due membri della famiglia di trasportatori transmembrana ABC (ATP-binding cassette), ABCG5 e ABCG8.  
Nella sitosterolemia l'assorbimento intestinale di steroli vegetali è aumentato e la loro escrezione biliare ridotta, ciò comporta un aumentato livello plasmatico e tissutale sia di steroli vegetali che di colesterolo. L'incorporazione degli steroli vegetali a livello delle membrane cellulari comporta la deformazione degli eritrociti e la formazione di megatrombociti. Episodi di emolisi sono una caratteristica clinica di questa patologia.
- Ipercolesterolemia poligenica: ipercolesterolemia con alto LDL-C con normali livelli di trigliceridi.  
Lo studio dei familiari è utile per differenziare l'ipercolesterolemia poligenica dalle forme monogeniche precedenti, infatti metà dei parenti di primo grado dei pazienti con FH e FDB sono ipercolesterolemici, mentre meno del 10% dei parenti di primo grado dei pazienti con ipercolesterolemia poligenica hanno ipercolesterolemia.
- Deficit di lipasi epatica: l'HL idrolizza trigliceridi e fosfolipidi in residui lipoproteici e HDL.  
E' una malattia autosomica recessiva molto rara, caratterizzata da elevati livelli di colesterolo e trigliceridi dovuti all'accumulo di residui lipoproteici circolanti con livelli di HDL-C normali o elevati.

- Disbetalipoproteinemia familiare (iperlipoproteinemia di tipo III): iperlipidemia mista dovuta all'accumulo di particelle di residui lipoproteici.  
E' causata da variazioni genetiche della ApoE che interferiscono con la sua capacità di legare i recettori lipoproteici.
- Ipertrigliceridemia familiare: patologia autosomica dominante, relativamente comune (circa 1 su 500). E' caratterizzata da quantitativi moderatamente elevati di trigliceridi accompagnati da un più modesto incremento di colesterolo. Le VLDL sono la principale classe di lipoproteine presenti a elevati livelli in questa malattia per un aumento della loro produzione, un loro alterato catabolismo o una combinazione di questi meccanismi.
- Iperlipidemia familiare combinata: la forma più frequente, caratterizzata dall'aumento di colesterolemia e trigliceridemia in più componenti della stessa famiglia con un elevato rischio di sviluppare aterosclerosi in età giovanile per mutazioni poligeniche che portano ad avere VLDL e LDL di piccole dimensioni e maggiore densità per maggiore sintesi epatica di VLDL-apoB.

Le forme secondarie, invece, sono causate da una malattia che alteri il metabolismo lipidico, come obesità, diabete mellito, ipotiroidismo, sindrome di Cushing, malattie da accumulo lisosomiale, sindrome nefrosica e insufficienza renale terminale, o dall'utilizzo di sostanze esogene che interferiscono sui livelli lipidici plasmatici, tra cui l'abuso di alcol, gli estrogeni, l'uso di corticosteroidi.

L'origine dei lipidi plasmatici si può dividere in esogena ed endogena.

La prima costituisce la via d'ingresso con l'alimentazione, per cui i lipidi sono scissi e assorbiti a livello intestinale, dove, mentre una piccola parte di questi è indirizzata direttamente al fegato attraverso il sistema portale, il resto viene risintetizzato in trigliceridi negli enterociti e incorporato, insieme a piccole quantità di proteine, colesterolo e fosfolipidi, nei chilomicroni che entreranno nel circolo dei vasi linfatici e poi in quello venoso, dove andranno incontro a scissione per opera di specifiche lipasi. La destinazione finale dei chilomicroni è il fegato, dove il colesterolo contenuto può essere utilizzato per la sintesi degli acidi biliari, e quindi eliminato, oppure per la sintesi di lipoproteine.

L'altra via di ingresso dei lipidi è quella endogena, responsabile di circa metà del colesterolo totale e avviene principalmente a livello epatico, grazie all'enzima HMG-CoA reduttasi (3 hydroxy-3 methylglutaryl-coenzymeA). Da qui il trasporto è affidato alle VLDL che verranno continuamente rimaneggiate risultando via via più piccole, più povere in trigliceridi e più ricche in colesterolo esterificato, trasformandosi nei cosiddetti remnants delle VLDL o IDL, che in parte sono captate dal fegato e in parte sono trasformate, dopo aver ceduto le apoproteine C ed E alla HDL, in LDL.

Le LDL per circa i due terzi sono captate dai tessuti in periferia, captazione mediata da recettori di membrana che riconoscono l'apoproteina B. Questi recettori tissutali sono soggetti a modulazione, tendendo ad essere più rappresentati in caso le cellule necessitino di colesterolo e a diradarsi al contrario. Una riduzione dei recettori di membrana si verifica anche in presenza di un eccesso di molecole in grado di legarsi ad essi.

Per quanto attiene alla clearance del colesterolo plasmatico, le LDL circolanti possono essere captate dal fegato attraverso recettori di superficie leganti le apolipoproteine B100 presenti in esse e, una volta internalizzate dagli epatociti, essere scomposte per il riciclo o l'eliminazione del colesterolo in esse contenuto.

Altra via di clearance è attuata dai macrofagi del sistema reticolo-endoteliale e dai monociti circolanti, attraverso un recettore detto "scavenger" che ha una elevata affinità per le LDL ossidate: i macrofagi che fagocitano le lipoproteine LDL alterate si caricano di goccioline lipidiche assumendo l'aspetto di "cellule schiumose", evento di grande importanza per la patogenesi dell'aterosclerosi.

Un altro importante meccanismo è il trasporto del colesterolo da parte delle HDL: queste lipoproteine che si formano a partire da colesterolo, apoA1, apoC2 ed apoE in un continuo scambio con le VLDL (sono responsabili del passaggio da un tipo di lipoproteina ad un altro) hanno l'importante funzione di raccogliere il colesterolo non esterificato dalle cellule in periferia e di cederlo, dopo esterificazione attraverso la lecitina-colesteroloaciltransferasi, ad altre lipoproteine circolanti, agli epatociti o ad organi steroidogenici.

Recentemente è emerso il ruolo chiave nel metabolismo lipidico di PCSK9 (Protein Convertase Subtilisin/Kexin 9) che è stata inizialmente scoperta come una proteina la cui espressione veniva indotta in neuroni cerebellari primari in seguito all'attivazione del processo di apoptosi e per questa ragione chiamata Neural Apoptosis Regulated Convertase 1 (NARC-1)<sup>6</sup>.

Successivamente sono state descritte due mutazioni nel gene codificante per PCSK9 associate con Ipercolesterolemia Autosomica Dominante (ADH).

In seguito, altre mutazioni nel gene codificante per PCSK9 sono state associate con bassi livelli di colesterolo LDL (LDL-C) e ridotto rischio cardiovascolare, rilevando un ruolo importante di PCSK9 nella regolazione dei livelli di LDL-C<sup>7</sup>.

Studi di tipo funzionale hanno infatti dimostrato come PCSK9 sia in grado di regolare i livelli circolanti di LDL-C andando ad indurre nel fegato la degradazione del recettore per le LDL (LDLR) piuttosto che il loro riciclaggio.

Mutazioni di PCSK9 con guadagno di funzione riducono infatti i livelli di LDLR nel fegato, aumentando così i livelli di LDL-C plasmatici ed il rischio cardiovascolare<sup>7</sup>.

Al contrario soggetti con mutazioni con perdita di funzione presentano ridotti livelli di LDL-C e protezione verso eventi cardiovascolari ischemici<sup>78</sup>.

Queste osservazioni hanno reso PCSK9 uno dei più promettenti target per il trattamento dell'ipercolesterolemia<sup>9</sup>.

PCSK9 è una proteina di 692 aminoacidi appartenente alla famiglia delle pro proteine convertasi, alla quale appartengono 9 serino-proteasi responsabili della maturazione proteolitica di proteine secrete, come ormoni, citochine, fattori di crescita oltre che di proteine di membrana come recettori ed integrine. Nell'uomo il gene per PCSK9 è localizzato sul cromosoma 1p32.3 e codifica per una proteina di 692 aminoacidi.<sup>9</sup>

PCSK9 è maggiormente espressa nel fegato, nell'intestino tenue, nel rene e nel sistema nervoso centrale, in misura minore in polmoni ed encefalo.

E' presente anche a livello extracellulare, target dei nuovi farmaci biologici [Immagine 4]<sup>9</sup>.

Dopo il rilascio, PCSK9 è presente in circolo in forma monomerica, ma può anche associarsi in omodimeri ed omotrimeri; la formazione di queste forme multimeriche, che sono associate con una maggiore capacità di degradare LDLR, è favorita dalla presenza di lipoproteine ricche in trigliceridi ed inibita da lipoproteine ad alta densità (HDL)<sup>9 10</sup>.

PCSK9 è presente in circolo come proteina libera e legata alle proteine plasmatiche.

In seguito a separazione delle diverse frazioni lipoproteiche tramite centrifugazione su gradiente di densità è stato possibile determinare che in soggetti normo-colesteriolemici circa il 30-40% di PCSK9 circolante è associato con la frazione LDL e che le LDL circolanti competono con PCSK9 per il legame con LDLR<sup>9 11</sup>.

Vari studi dimostrano come PCSK9 possa legare LDLR, in modo indipendente dall'attività catalitica della proteina matura, sia all'interno della cellula sia sulla membrana degli epatociti<sup>9 12 13</sup>.

L'espressione contemporanea del dominio di PCSK9 e di una forma inattiva dal punto di vista catalitico porta infatti ad un corretto folding e alla secrezione di una proteina in grado di riconoscere e degradare LDLR<sup>9 14</sup>.

L'interazione di PCSK9 con il recettore avviene con una stechiometria 1:1; l'esatto sito di legame è localizzato a livello del primo EGF-like repeat (EGF-A) presente nella porzione extracellulare delle LDLR<sup>9 15</sup>.

In seguito alla sua formazione a livello della membrana plasmatica, il complesso PCSK9-LDLR va incontro ad endocitosi clatrina-dipendente e, in seguito all'abbassamento del pH nell'endosoma, il residuo C-terminale di PCSK9 lega il "ligand binding domain" del recettore stabilizzando il legame tra le due proteine<sup>9 16</sup>.

LDLR sono legati da PCSK9 indipendentemente dall'endocitosi anche a livello intracellulare, infatti l'over espressione di PCSK9 promuove la degradazione di LDLR nel reticolo endoplasmatico<sup>9 17</sup>.

La degradazione di LDLR mediata da PCSK9 richiede fattori espressi in modo selettivo solo in alcuni tessuti<sup>9 18 19</sup>.

Il rilascio di lipoproteine contenenti ApoB in epatociti in coltura non è alterata dalla down-regulation di PCSK9 mentre, nel topo, l'over espressione di PCSK9 nella sua forma wild-type determina l'aumento dei trigliceridi plasmatici nel digiuno<sup>9 20</sup>.

PCSK9 interagisce direttamente con ApoB a livello delle cellule epatiche e ne riduce la degradazione intracellulare a livello del reticolo endoplasmatico, determinando l'aumento del rilascio di ApoB indipendentemente dall'attività e dai livelli di LDLR<sup>9 21</sup>.

Tutte queste considerazioni suggeriscono che il metabolismo delle lipoproteine contenenti ApoB possa essere modulato da PCSK9 indipendentemente da quello delle LDL.

L'espressione genica di PCSK9 è regolata principalmente dal colesterolo intracellulare attraverso l'attivazione e la traslocazione nel nucleo dei fattori di traslocazione Sterol Responsive Protein-2 (SREBP-2)<sup>9 21</sup> [Immagine 5].

La concentrazione plasmatica di PCSK9 nella popolazione generale è molto variabile, con livelli compresi tra 20-30 ng/mL e 10 µg/mL.

Queste differenze sono probabilmente dovute, oltre che alla effettiva variabilità biologica delle popolazioni in cui è stata effettuata la misurazione, anche a problemi metodologici in relazione all'utilizzo dei saggi ELISA con anticorpi con diversa specificità di legame.

Data l'importanza fisiopatologica dell'attività della proteina, misurare i livelli plasmatici di PCSK9 nella popolazione generale ed in pazienti sotto trattamento

farmacologico o caratterizzati da elevato rischio cardiovascolare risulta di notevole rilevanza.

Questo è stato recentemente dimostrato: i livelli di PCSK9 circolanti predicono la ricorrenza di eventi clinici in pazienti con coronaropatia stabile trattati con basse dosi di atorvastatina<sup>9 22</sup>.

I principali fattori che regolano l'espressione di PCSK9 e risultano essere quindi anche il maggior determinante dei livelli circolanti della proteina sono la variazione dei livelli e della biosintesi endogena di colesterolo nel tessuto epatico<sup>9 23</sup>.

I farmaci ipocolesterolemizzanti stimolano quindi la produzione di PCSK9 a causa della deplezione di colesterolo nell'epatocita<sup>9 24</sup>.

I livelli di PCSK9 sono influenzati anche dallo stato nutrizionale ed ormonale, infatti sono fortemente ridotti sia dal glucagone, dall'ormone della crescita e dal digiuno<sup>9 25</sup>.

Inoltre risultano aumentati nelle donne adulte nel periodo pre-menopausale mentre sono più alti nei maschi durante la pubertà suggerendo un possibile effetto degli ormoni sessuali sull'espressione di PCSK9.

Il fegato è allo stesso tempo il tessuto che regola i livelli di PCSK9 nel plasma ed il principale target dell'attività della proteina (da studi effettuati con generazione di topi PCSK9 knockout).

Anche altri tessuti sono però in grado di sintetizzare PCSK9, in particolare il rene, l'intestino tenue, il pancreas endocrino ed il sistema nervoso centrale<sup>26</sup>.

L'attività di PCSK9 non è inoltre ristretta alla degradazione di LDLR ma contribuisce alla regolazione di recettori come VLDLR e ApoER2, modulando così importanti funzioni cellulari a livello del tessuto adiposo, muscolo cardiaco, macrofagi e cellule tumorali [Immagine 6]<sup>9</sup>.



Anche altri importanti processi cellulari come la proliferazione, l'apoptosi e l'infiammazione sono regolati dall'over espressione di PCSK9, che quindi non regola solo geni coinvolti nel metabolismo del colesterolo. Ciò è stato dimostrato in studi di espressione genica in cellule epatiche<sup>27</sup>.

Inoltre, in seguito alla degradazione di ApoER2, nei neuroni cerebellari, è stato dimostrato come PCSK9 abbia un effetto pro apoptotico<sup>9 28</sup>.

Anche se l'assenza di PCSK9 non determina differenze nell'estensione della lesione a livello del parenchima cerebrale sembra che, nel topo, un'ischemia cerebrale induca l'espressione di PCSK9<sup>29</sup>.

L'omeostasi del colesterolo e il metabolismo dei chilomicroni è modulata anche a livello delle cellule dell'epitelio intestinale: tali cellule esprimono infatti PCSK9 che è in grado di degradare LDLR a livello della membrana baso-laterale.

In seguito a somministrazione di un bolo di olio d'oliva nel topo PCSK9 knockout si osserva un migliorato profilo lipidico post-prandiale con una riduzione significativa dei trigliceridi plasmatici, riduzione probabilmente provocata da una ridotta secrezione di ApoB intestinale oltre che dall'aumentata capacità di rimozione dei chilomicroni dal circolo<sup>9 30</sup>.

PCSK9 è espresso nell'uomo anche a livello del pancreas endocrino, in particolare nelle cellule  $\delta$ .

Nel topo PCSK9 altera la funzione del pancreas endocrino: la carenza della proteina è stata associata ad anomalie morfologiche delle isole di Langerhans e riduce la secrezione di insulina portando a iperglicemia dopo i primi cinque mesi di vita<sup>9 31 32</sup>.

PCSK9 non è espressa a livello degli adipociti che però presentano alti livelli LDLR e VLDLR. Quest'ultimo gioca un ruolo fondamentale nel legame e nella successiva idrolisi delle lipoproteine ricche in trigliceridi e quindi nell'accumulo degli acidi grassi nel tessuto adiposo.

PCSK9 circolante regola negativamente, nel topo, i livelli di VLDLR nel tessuto adiposo e di conseguenza topi PCSK9 knockout mostrano aumentati livelli

di VLDLR e all'età di sei mesi mostrano un aumento dell'80% della massa di tessuto adiposo viscerale rispetto ai topi controllo<sup>9 33</sup>.

Recentemente è stata anche riportata la presenza di PCSK9 in lesioni aterosclerotiche carotidee.

Le cellule muscolari lisce sembrano essere, tra i diversi tipi cellulari presenti a livello della placca aterosclerotica, quelle che contribuiscono maggiormente alla produzione di PCSK9.

In queste cellule PCSK9 è metabolizzato e secreto in modo simile a quanto avviene negli epatociti ed è capace di indurre la degradazione di LDLR nei macrofagi e di regolare in questo modo il legame e l'uptake di lipoproteine aterogene<sup>26</sup>.

Queste scoperte suggeriscono che la componente cellulare della lesione aterosclerotica possa essere modulata da PCSK9 sia di origine vascolare che epatica.

Infine, in un modello animale di carcinoma colonrettale ed in molti tessuti tumorali umani, come nel cancro cervicale, nell'adenocarcinoma esofageo e nel carcinoma renale PCSK9 risulta essere up-regolata.

PCSK9 sembra essere implicato nella progressione di specifici tipi di tumore: ciò è suggerito dalla sua ridotta espressione nel cancro della prostata e della mammella<sup>9 34</sup>.

## ***1.4 Patogenesi***

Il modello attuale riguardante la patogenesi dell'aterosclerosi è quello che considera l'ipotesi della reazione al danno, secondo cui l'aterosclerosi è la risposta infiammatoria cronica e ripartiva della parete arteriosa da un danno a carico dell'endotelio.

In base a questo modello, l'aterosclerosi è il risultato di alcuni eventi patogeni, per cui all'iniziale danno endoteliale che provoca una maggiore permeabilità vascolare segue un accumulo di lipoproteine nella parete del vaso e una adesione dei monociti all'endotelio con conseguente loro trasformazione in macrofagi e cellule schiumose.

La liberazione di fattori dalle piastrine attivate, dai macrofagi e dalle cellule vascolari causa un reclutamento delle cellule muscolari lisce e produzione di ECM.

La lesione che si forma inizialmente, la stria lipidica, è potenzialmente reversibile ed è il risultato dell'accumulo sottointimale di cellule schiumose. Macroscopicamente si presenta come l'insieme di piccole macule giallastre piatte che tendono a convergere in strie allungate di circa 1 cm o più ed essendo piatte non influiscono con il flusso sanguigno.

La stria lipidica può evolvere in placca ateromatosa, non più reversibile, di colore giallo-biancastro e con dimensioni comprese tra 0.3 e 1.5 cm di diametro. In genere interessa solo una parte della parete apparendo eccentrica in sezione trasversa.

I componenti principali di queste placche sono elementi cellulari tra cui cellule muscolari lisce, monociti-macrofagi e linfociti T, matrice extracellulare formata da collagene, fibre elastiche e proteoglicani e depositi intra ed extracellulari di lipidi, tutti in proporzioni variabili in base alla lesione.

Generalmente, questi componenti sono organizzati in tre strati: un nucleo necrotico profondo contenete lipidi, cellule schiumose, detriti cellulari e fibrina; un'area intermedia denominata "spalla della lesione" costituita da macrofagi, cellule T e cellule muscolari lisce; un cappuccio fibroso di rivestimento, composto da cellule muscolari lisce e collagene relativamente denso.

Le principali complicanze a cui può andare incontro ogni placca ateromatosa sono la rottura, l'ulcerazione, l'erosione, la calcificazione, la formazione di emorragie all'interno dell'ateroma e, conseguentemente, la liberazione di frammenti nel circolo e alterazioni in senso aneurismatico della parete.

#### ***1.4.1 Infiammazione e aterosclerosi***

Nel 1970 Ross, nella sua teoria "Response to injury" fu il primo a mettere in dubbio la "teoria lipidica" secondo cui la placca aterosclerotica fosse causata da un accumulo di colesterolo all'interno del vaso.

In particolare, Ross fu il primo a sostenere che la placca aterosclerotica nasce da una lesione a livello dell'endotelio arterioso, seguita dall'adesione e aggregazione delle piastrine<sup>35</sup>.

Il successivo rilascio del fattore di crescita piastrinico (platelet-derived growth factor, PDGF) da parte delle piastrine, promuove la risposta proliferativa delle cellule muscolari lisce (smooth muscle cells, SCM), la cui eccessiva proliferazione può causare un'eventuale occlusione dell'arteria.

Già nel 1958, Poole e Florey erano stati i primi a sostenere che a seguito della deposizione di colesterolo, i monociti aderivano all'endotelio e migravano attraverso l'endotelio dell'aorta di coniglio<sup>36</sup>.

Parecchi anni dopo, Micheal Gimbrone per primo propose il concetto di disfunzione endoteliale sottolineando il ruolo principale dell'endotelio sano nel proteggere contro l'aterosclerosi, a sostegno del fatto che un'alterazione della sua normale funzionalità fosse alla base della patologia aterosclerotica<sup>37</sup>.

Nel 1986 Ross rivide la sua teoria "Response to injury" sostenendo che il danneggiamento dell'endotelio è il primo evento importante che porta all'aterosclerosi<sup>38</sup> e nel 1999 pubblicò una review importante nella quale sosteneva per la prima volta che l'aterosclerosi è una malattia infiammatoria cronica nella quale le cellule del sistema immunitario hanno un ruolo di rilevante importanza<sup>39</sup>.

Tale constatazione secondo cui l'aterosclerosi sia da considerare affine ad altri processi infiammatori ad evoluzione cronico-sclerotica, come la cirrosi epatica, la fibrosi polmonare, la pancreatite cronica e l'artrite reumatoide, spiegherebbe il maggior rischio di formazione di lesioni aterosclerotiche nelle sedi dove va ad attenuarsi il cosiddetto "shear stress", cioè lo stress longitudinale di parete, quindi a livello delle biforcazioni e delle curvature delle arterie.

In tali sedi infatti il flusso arterioso di sangue tende ad essere turbolento determinando una maggior attivazione dei geni che condizionano l'infiammazione<sup>40</sup>.

In particolare, i principali "protagonisti" dei meccanismi infiammatori che contribuiscono all'esordio, alla progressione e allo sviluppo delle complicanze delle lesioni aterosclerotiche sono:

- le cellule endoteliali arteriose, che fisiologicamente possiedono un ruolo centrale nella regolazione della vasocostrizione grazie all'equilibrio nella secrezione di ossido nitrico, endotelina-1 e angiotensina II e nella prevenzione della formazione locale di trombi mediante la produzione di prostacicline che inibiscono l'aggregazione piastrinica.

Nelle prime fasi dell'aterogenesi, le cellule endoteliali arteriose che presentano disfunzione esprimono molecole di adesione che favoriscono il legame dei leucociti, in particolare la molecola di adesione cellulare vascolare di tipo 1

(Vascular Cell Adhesion Molecule-1, VCAM-1) lega specificamente monociti e cellule T.

Dopo che queste cellule hanno aderito all'endotelio migrano nella tonaca intima sotto l'influenza delle chemochine prodotte a livello locale.

La disfunzione a cui vanno incontro le cellule endoteliali quale esito del processo infiammatorio causa inoltre un'aumentata permeabilità alle macromolecole, tra cui soprattutto le lipoproteine. Queste si accumulano nell'intima del vaso e vanno incontro ad ossidazione causando la formazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) a livello della parete.

- I monociti, che si trasformano in macrofagi e si infarcano di lipoproteine, soprattutto le LDL ossidate, le quali si legano ai recettori scavenger dei macrofagi determinando così la formazione di cellule schiumose<sup>41</sup>.

Tale reclutamento dei monociti e la loro successiva differenziazione in macrofagi grazie alla secrezione di Macrophage Colony-Stimulating Factor (M-CSF) da parte delle cellule endoteliali alterate ed infine in cellule schiumose ha, in teoria, un ruolo protettivo in quanto queste cellule rimuovono particelle lipidiche potenzialmente dannose.

Tuttavia le LDL ossidate aumentano l'attività dei macrofagi e la produzione di citochine (es.: TNF), provocando un ulteriore incremento dell'adesione dei leucociti e della produzione di chemochine, come la proteina chemotattica per i monociti di tipo 1, dando luogo ad uno stimolo per il reclutamento delle cellule infiammatorie mononucleate.

I macrofagi attivati, inoltre, producono specie reattive dell'ossigeno che peggiorano l'ossidazione delle LDL e vari fattori di crescita che contribuiscono alla proliferazione delle cellule muscolari lisce.

- I linfociti T, soprattutto TCD4, che vengono reclutati nell'intima ed interagiscono con i macrofagi e possono generare uno stato infiammatorio cronico.

Non è chiaro se le cellule T rispondano ad antigeni specifici, quali antigeni batterici e virali o antigeni generati attraverso la modificazione di alcuni costituenti della parete arteriosa o delle lipoproteine, oppure siano attivati in modo aspecifico dal quadro infiammatorio locale. Tuttavia, le cellule T attivate nelle lesioni intimali in crescita producono citochine infiammatorie (INF-gamma e TNF), che possono stimolare i macrofagi, nonché le cellule endoteliali e le cellule muscolari lisce.

- Le cellule muscolari lisce, la cui proliferazione è promossa dallo stato infiammatorio cronico in seguito all'attivazione dei leucociti e rilascio di fattori di crescita da parte delle cellule della parete vascolare, tra cui il PDGF (rilasciato da piastrine localmente aderenti, macrofagi, cellule endoteliali e cellule muscolari lisce), il FGF e il TGF $\alpha$ . A ciò si aggiunge una migrazione delle cellule muscolari lisce dalla tonaca media verso l'intima, promossa da proteasi infiammatorie che vanno a degradare le fibre di collagene I e III il quale agisce inibendo la capacità proliferativa delle cellule muscolari lisce.

In tal modo, anche le cellule muscolari lisce migrate nell'intima possono interiorizzare lipoproteine nelle lesioni aterosclerotiche e contribuire al processo infiammatorio.

- Le piastrine, che contribuiscono secernendo fattori pro-infiammatori ed esprimendo sulla loro superficie il CD40-ligando, una molecola in grado di legare il CD40 presente su linfociti B, monociti-macrofagi e cellule endoteliali, dando luogo a diverse riposte complesse, come all'induzione dell'espressione sulle cellule endoteliali di molecole di adesione per il passaggio di monociti e linfociti T<sup>42</sup>.

In pazienti affetti da aterosclerosi sono rilevabili livelli più alti di TNF- $\alpha$ , citochina inducente l'espressione di TLR, di fattore tissutale e di molecole di adesione come le VCAM-1<sup>43</sup>.

Negli stessi pazienti, sono stati rilevati più elevati anche i fattori immunogeno-infiammatori come metalloproteasi di matrice (MMP2 e MMP9) in grado di accelerare la progressione della placca e di promuoverne la destabilizzazione, interferone alfa e gamma, interleuchine (tra cui IL-8, IL-6 e IL-17), metaboliti reattivi dell'ossigeno (ROS), fibrinogeno e inibitore dell'attivatore del plasminogeno 1 (PAI-1)<sup>44</sup>.

A questi meccanismi si possono correlare fattori come il danno ateromasico, l'alterazione della riparazione endoteliale, l'irrigidimento arterioso, lo stimolo all'insulino resistenza, lo stato di ipercoagulabilità e anche l'elevazione dell'omocisteina<sup>45 46</sup>.

Tra i numerosi marker circolanti dei processi di infiammazione che correlano con il rischio di cardiopatia ischemica, la proteina C reattiva si è rilevata uno dei più semplici e sensibili<sup>47</sup>.

Quando la proteina C reattiva viene secreta all'interno dell'intima aterosclerotica può attivare le cellule endoteliali locali, indurre uno stato protrombotico e aumentare il livello di adesività dell'endotelio per i leucociti. Inoltre è in grado di prevedere in modo marcato ed indipendente il rischio di infarto miocardico, ictus, malattia arteriosa periferica e morte cardiaca improvvisa, infatti i livelli di proteina C reattiva sono stati di recente inseriti negli algoritmi di stratificazione del rischio<sup>48</sup>.

Sebbene non vi siano ancora evidenze dirette che l'abbassamento dei livelli di proteina C reattiva riduca il rischio cardiovascolare, la cessazione dell'abitudine al fumo, la perdita di peso e l'attività fisica abbassano la proteina C reattiva; inoltre le statine riducono i livelli di proteina C reattiva indipendentemente dai loro effetti sul colesterolo LDL.

Infine un'elevata concentrazione di proteina C reattiva nel siero correla con una propensione alla cardiopatia ischemica, poiché essa risulta essere direttamente implicata nell'aumento della produzione di metalloproteasi di matrice e nel decremento della liberazione di ossido nitrico, fattore vasodilatante<sup>49</sup>.

#### ***1.4.2 Neutrofili e NETs***

Tra le cellule immunitarie che infiltrano le lesioni aterosclerotiche, i leucociti neutrofili polimorfonucleati (PMN) sono stati identificati solo di recente come fattori chiave per la patogenesi e la progressione dell'aterosclerosi.

Infatti i PMN sono i produttori dell'enzima elastasi, che contribuisce alla degradazione della matrice e all'indebolimento della parete del vaso; di IL-8, una potente chemochina proinfiammatoria e di VEGF, fattore con effetti proangiogenici e attività chemotattica verso le cellule infiammatorie, come i monociti/macrofagi e PMN stessi<sup>50</sup>.

Quindi nelle primissime fasi i neutrofili sono responsabili dell'aggravamento della disfunzione endoteliale, del reclutamento di monociti e di promuovere la formazione di cellule schiumose. Nella lesione più avanzata possono portare ad instabilità di placca a causa delle diverse proteasi e dei ROS rilasciati in sede di lesione<sup>51</sup>.

Molte di queste funzioni sembrano essere correlate alla loro capacità di rilasciare trappole extracellulari di neutrofilo (NETs, Neutrophil Extracellular Traps), reti di fibre extracellulari composte principalmente dal DNA dei neutrofilo complessato con proteine ed istoni. La dimostrazione che i NETs siano costituiti soprattutto da DNA si è avuta trattando le cellule con DNAsi.

Utilizzando un approccio proteomico, sono state identificate 24 proteine associate ai NET.

L'analisi quantitativa di queste proteine e la microscopia elettronica ad alta risoluzione hanno dimostrato che i NET consistono di nucleosomi modificati<sup>52</sup>.

La scoperta di questo processo risale al 2004, quando in vitro si osservò che i neutrofilo sono in grado di appiattirsi e formare delle protrusioni filamentose molto fragili, dal diametro di circa 15-17 nm e non ricoperte da membrana se vengono sottoposti a specifici stimoli (interleuchina 8, phorbol myristate acetate e lipopolisaccaride).

In seguito tecniche di immunofluorescenza hanno evidenziato che queste reti sono costituite soprattutto da catepsina G, elastasi, mieloperossidasi, granuli di lattoferrina e gelatinasi, al contrario non contengono actina, tubulina e varie altre proteine citoplasmatiche.

I NET sono rilasciati dai neutrofilo attivati in seguito a numerosi altri stimoli, tra cui recentemente è stato dimostrato il ruolo di hBD-1 derivata dalle piastrine, che, oltre ad avere una attività antimicrobica classica, segnala ai PMN di estrarre i reticoli di DNA che catturano e uccidono i batteri<sup>53</sup>.

Altri stimoli per rilascio dei NET sono forniti dall'attività di MPO, elastasi neutrofila e peptidilarginina deiminasi di tipo IV (PAD4), poiché la carenza o l'inibizione di uno qualsiasi di questi enzimi influenza negativamente la produzione dei NET<sup>54</sup>.

I NETs sono rilasciati dai neutrofilo attivati con estroflessione dipendente dall'intensità dello stimolo fornito, dopo circa 10 minuti dall'esposizione allo stesso. La loro funzione è quella di avvolgere il patogeno per ucciderlo con le proteasi legate e di creare una barriera fisica alla diffusione dell'infezione e delle sostanze enzimatiche rilasciate così da evitare che danneggino i tessuti circostanti<sup>55</sup>.



Il processo di liberazione di questa rete di cromatina e proteine è stato chiamato da Steinberg e Grinstein NETosi, paragonandolo ad altre forme di morte cellulare programmata<sup>56</sup>. Molti stimoli sono stati segnalati per indurre la NETosis: Gram positivi, negativi e funghi, LPS, citochine infiammatorie come IL-6 e IL-8, il calcio, ionoforo, ionomicina, PMA<sup>57</sup> <sup>58</sup>. Al contrario la rTM (trombomodulina ricombinante umana solubile) è in grado di inibire completamente la NETosis<sup>59</sup>.

Dopo l'estroffessione del materiale proteico la cellula può andare incontro a due diversi destini a seconda dello stimolo a cui è sottoposta: suicidal NETosis o vital NETosis.

La prima è stata descritta per la prima volta nel 2007 e porta alla morte dei neutrofili attraverso una via diversa rispetto all'apoptosi o alla necrosi. Si ha rottura della membrana plasmatica e gli stimoli che possono avviare tale percorso possono essere l'attivazione di Toll Like Receptor, recettori Fc e recettori del complemento, in seguito al quale si ha rilascio di calcio dal reticolo endoplasmatico che attiva a sua volta la NADPH ossidasi.

Mentre la suicidal NETosis può richiedere ore, la vital NETosis può essere completata in pochi minuti e viene conservata l'integrità della membrana citoplasmatica.

E' stata descritta una terza forma di NETosis (NETOS mitocondriale) dipendente dalla produzione di ROS, in cui viene rilasciato il DNA mitocondriale invece del DNA nucleare<sup>60</sup>.

Tra gli stimoli che inducono la vital NETosis abbiamo l'attivazione del Toll Like Receptor-2 per esposizione ad un battere gram-positivo, la cellula perde interamente il materiale nucleico ma resta in vita; o l'attivazione del Toll Like Receptor-4 piastrinico, dopo esposizione ad un battere gram-negativo o ad LPS, per cui, in seguito ad adesione del neutrofilo alle piastrine attivate, avviene il rilascio di materiale nucleico pur mantenendo la vitalità cellulare.

Al contrario il trattamento in vitro con PMA induce i neutrofili alla lisi e alla morte per formazione di specie reattive dell'ossigeno<sup>61</sup>.

La formazione dei NET inizia con la liberazione di elastasi neutrofila e mieloperossidasi dai granuli azzurrofilo e loro successiva migrazione nel nucleo, dove sono responsabili

della decondensazione della cromatina attraverso il clivaggio dei suoi istoni. A questo punto la cromatina decondensata viene liberata per lisi della parete nucleare e va a mischiarsi con il materiale citosolico andando poi a perforare, in modo più o meno importante in base alla strada intrapresa, la membrana plasmatica con il rilascio di NETs verso l'esterno.

Tutto questo avviene soprattutto in risposta alla formazione di ROS in seguito all'attivazione neutrofila e di NADPH ossidasi<sup>62 63</sup>. Il ruolo dei NET nell'inizio e nel mantenimento del processo infiammatorio cronico in aterosclerosi può coinvolgere tre meccanismi principali:

- 1) Formazione di complessi immunostimolatori associati alla NETosis che consistono in proteine, peptidi e acido nucleico
- 2) Rilascio di citochine proinfiammatorie da cellule immunitarie contemporaneamente a NETosis
- 3) Rilascio di una serie di proteine con proprietà di auto antigeni durante NETosis.

Gli studi condotti da Knight (2014) hanno dimostrato che i neutrofili isolati da topi con aterosclerosi sono più suscettibili alla formazione di NET e l'inibizione con PAD4 porta non solo ad una riduzione nella formazione dei NET, ma anche protegge contro lo sviluppo di aterosclerosi e di tromboembolismo<sup>64</sup>.

Peptidi LL-37 e Cramp (l'analogo murino di LL-37) sono stati identificati nelle placche aterosclerotiche dei vasi sanguigni in umani e topi<sup>65</sup>. Questa proteina possiede una carica positiva che le permette di formare dei complessi insolubili con il DNA dei NETs e, a contatto con le cellule dendritiche plasmacitoidi, di legarsi al gruppo anionico dei proteoglicani di membrana, inducendo in esse la sintesi di interferone alfa che è in grado di reclutare APC, macrofagi e altre cellule dendritiche<sup>66</sup>.

Inoltre i NETs possono stimolare i macrofagi a rilasciare citochine, attivando Th17 e potenziando così il reclutamento delle cellule immuni.

Oltre ad un aumento di LL-37/DNA nei vasi danneggiati<sup>67 68</sup> a livello delle lesioni coronariche sono stati trovati complessi di mieloperossidasi/DNA e nucleosomi (istoni/DNA). Un alto livello di nucleosomi circolanti è stato visto essere correlato a più alto rischio di stenosi coronarica ed un alto livello di MPO/DNA (markers di NETosi) al

numero di vasi coinvolti in lesioni aterosclerotiche e la loro possibile evoluzione<sup>68</sup>, tanto da pensare che la formazione di NETs possa precedere i cambiamenti in senso litico della lesione.

In aggiunta alla funzione legata al rilascio del peptide LL-37, i NETs sembrano avere un'azione citotossica diretta sull'endotelio per la presenza di metalloproteasi di matrice-9 (MMP9) che induce attivazione della MMP2 endoteliale con disfunzione e apoptosi di queste cellule<sup>69</sup>.

Inoltre la formazione di lesioni aterosclerotiche può avvenire anche indipendentemente dalla stimolazione delle cellule dendritiche: anche solo l'esposizione ad elevate quantità di cristalli di colesterolo può portare all'attivazione dei neutrofili con rilascio di NETs che indurranno la sintesi di IL-1beta da parte dei macrofagi con attivazione di cellule Th17 e quindi ad importante amplificazione del segnale infiammatorio, grazie alla comunicazione tra neutrofili e macrofagi attraverso i NETs<sup>70 71</sup>.

In studi recenti è stato visto che il processo dei NET non è esclusivo dei neutrofili, ma si può osservare anche in eosinofili, mastcellule e monociti/macrofagi ed è stato chiamato in questi casi ET (Extracellular Trap)<sup>66 72</sup>. Infine i NETs sono rimossi per fagocitosi da macrofagi attivati dagli stessi, con tempistiche diverse in base alla subpopolazione M1 o M2<sup>73</sup>.

La presenza di NETs è stata osservata anche in infezioni, quali polmoniti comunitarie<sup>74</sup>, ed in stati infiammatori cronici come l'artrite reumatoide, la psoriasi, il lupus eritematoso sistemico, il diabete mellito<sup>66</sup> ed i processi tromboembolici<sup>61 75 76</sup>.

I neutrofili hanno un ruolo significativo nella formazione della fibrina e nel processo di coagulazione attraverso la loro interazione con le cellule endoteliali danneggiate tramite il legame con le molecole di adesione LFA-1/ICAM-1. La stretta correlazione tra aterosclerosi e tromboembolismo è stata analizzata in diversi studi<sup>77 78 79</sup>, ma a parte la condivisione dei fattori di rischio implicati in entrambe le patologie, non è stato trovato un diretto collegamento tra le due.

Il fatto che nel processo trombotico siano presenti in tempi diversi neutrofili nelle fasi iniziali e macrofagi in quelle finali fa pensare che abbiano un ruolo specifico nella sua evoluzione<sup>80</sup>.

Inoltre, l'intervento dei neutrofili sembra potrebbe dare inizio al processo proprio tramite NETs<sup>75 81</sup>: infatti, questi sono stati trovati a livello della lesione iniziale (e non nei trombi organizzati), sembrando essere il collegamento chiave tra risposta immunitaria e trombotosi. Infatti, nella triade di Virchow alla base della formazione del trombo, ci sono danno endoteliale, stasi ed ipercoagulabilità: in seguito alla stasi che porta ipossia, può essere attivato l'endotelio che induce il rilascio di NETs da parte dei neutrofili<sup>82</sup>.

L'elastasi neutrofila presente in questi attiva il fattore tissutale e il rilascio di fattori pro-coagulanti che porteranno anche all'attivazione piastrinica<sup>83</sup>, tra questi IL-17, come visto a livello di trombi coronarici<sup>84</sup>. E' proprio questa la fase che agisce da collegamento tra infiammazione e coagulazione: il DNA dei NETs ha sia azione citotossica attivante la risposta infiammatoria, sia pro-coagulante<sup>83 85</sup> [Immagine 7 e 8].

Tutti questi fattori fanno in modo che i NETs possano essere considerati potenziali biomarcatori di rischio cardiovascolare<sup>86</sup>.

In conclusione possiamo dire che il processo di formazione ed eliminazione dei NETs deve essere strettamente regolato: se prodotti in eccesso possono contribuire al danno endoteliale e all'incontrollata formazione dei trombi all'interno del lume<sup>64</sup>.

## **2. Statine**

Attualmente i farmaci più impiegati per il trattamento dell'ipercolesterolemia sono le statine, inibitori competitivi e reversibili dell'3-idrossi-3metilglutaril-CoA reduttasi, enzima responsabile della conversione del HMG-CoA in mevalonato, il precursore del colesterolo.

La loro scoperta avvenne dopo lo screening di circa 6000 ceppi batterici iniziata nel 1971 per trovare un efficace inibitore della sintesi del colesterolo e la prima molecola identificata fu la mevastatina, precursore della lovastatina.

Da qui è iniziata la ricerca di molecole più tollerabili e con minori effetti avversi, alcune ottenute per fermentazione (come lovastatina, simvastatina e pravastatina – definite di

prima generazione), altre per sintesi (come fluvastatina – di seconda generazione, e atorvastatina, rosuvastatina e cerivastatina – di terza generazione).

Assunte per bocca, si accumulano e sono metabolizzate a livello epatico, organo target, con una ridotta biodisponibilità a meno di interazioni a carico del CYP450, responsabile del metabolismo di diversi farmaci tra cui le stesse<sup>87</sup>.

Da queste caratteristiche si comprende perché la monoterapia con statina sia tendenzialmente ben tollerata dalla maggior parte dei pazienti, con effetti avversi più diffusi come lievi miopatie e aumento asintomatico delle transaminasi, ma nel caso di assunzione concomitante di altri farmaci come fenofibrato, warfarin e antifungini imidazolici, può esserci un aumento della sua biodisponibilità e quindi della sua tossicità fino al manifestarsi di effetti avversi gravi come la rabdomiolisi<sup>88</sup>.

La riduzione della sintesi epatica di colesterolo in seguito all'assunzione di statine provoca un aumento dell'esposizione di recettori delle LDL sugli epatociti, diminuendo così ulteriormente il livello di colesterolo circolante per aumentata captazione e clearance epatica.

Questa azione è dipendente dalla dose di farmaco assunta e varia sia in base al tipo di statina che alla risposta dell'individuo ad essa.

Una ridotta risposta al farmaco può essere imputabile o ad una bassa compliance da parte del paziente o a mutazioni genetiche a livello del metabolismo epatico<sup>5</sup>. Oltre ad una riduzione dei valori di LDL che in genere, dopo 4 settimane di terapia, scendono dal 20 al 60%, l'assunzione di statine porta anche ad una diminuzione dei livelli di trigliceridi tra il 10 e il 30% e ad un piccolo incremento delle HDL tra il 4 e l'8%.

La clearance del colesterolo è molto attiva per quanto riguarda i recettori LDL, ma le statine sono anche in grado di stimolare la rimozione di VLDL, IDL e LDL con un maggiore effetto sulle molecole più ricche di colesterolo e più povere di ApoB.

Questa loro azione su più livelli rende la statina il farmaco di prima scelta nei diversi tipi di iperlipoproteinemia.

Come già anticipato, le principali reazioni avverse riguardano fegato e muscoli con rialzo asintomatico delle transaminasi e dolori muscolari localizzati con innalzamento

della creatinfosfochinasi, motivo per cui servono controlli periodici del danno epatico e il farmaco non può essere assunto da pazienti con grave epatopatia.

Il rischio di rhabdmiolisi e conseguente insufficienza renale è comunque molto bassa e resta inferiore allo 0.01%<sup>87</sup>.

## ***2.1 Statine e infiammazione***

L'azione antiaterosclerotica delle statine non consiste solo nel diminuire la sintesi e la presenza in circolo di colesterolo, ma anche nel ridurre il processo infiammatorio alla base dell'aterosclerosi.

In numerosi studi è stato evidenziato il beneficio della statina nella prevenzione cardiovascolare sia primaria che secondaria<sup>89 90</sup> e, tra questi, molti riguardano proprio la sua azione pleiotropica.

Infatti, in soggetti con diversi fattori di rischio cardiovascolare si è dimostrato come la terapia con statine riduca sia i livelli di proteina C reattiva (PCR), sia quelli delle citochine pro-infiammatorie<sup>91</sup> e che sia anche in grado di ridurre consistentemente la produzione di specie reattive dell'ossigeno a livello della parete vasale<sup>92</sup>.

Altri evidenti aspetti sono quelli di migliorare lo stato delle cellule endoteliali e ridurre l'attivazione di cellule T, l'infiltrazione di macrofagi e di promuovere così la stabilizzazione della placca ateromasica<sup>93</sup>.

Il cosiddetto effetto pleiotropico è proprio legato all'inibizione della sintesi di acido mevalonico che, oltre ad essere precursore della molecola di colesterolo, è alla base della sintesi di importanti intermedi isoprenoidi come il farnesilpirofosfato (FPP) e il geranylgeranylpirofosfato (GGPP), responsabili della modificazione post-traduzionale di proteine (per isoprenilazione) che vanno ad agire nei diversi meccanismi della risposta infiammatoria.

Tra queste proteine è rilevante il gruppo di quelle leganti GTP, come Rho, Rac e Ras<sup>93</sup>: Rho è coinvolta nell'espressione di citochine pro-infiammatorie e nella formazione del citoscheletro di actina, Ras regola la proliferazione cellulare e stimola l'ipertrofia tissutale, mentre Rac modula la generazione di ROS<sup>94</sup>.

Nello specifico, a livello vasale le statine agiscono:

- Sull'endotelio con un aumento della sintesi di ossido nitrico endoteliale (eNO) che durante l'infiammazione è inibito dalle chinasi Rho, con una riduzione della dimetilarginina asimmetrica (ADMA) che causa disfunzione endoteliale<sup>95</sup>, con una diminuzione dell'espressione delle molecole di adesione il cui aumento è sempre controllato dalle chinasi Rho, con una down-regolazione dell'espressione di fattore di Von Willebrand, indotto dalle proteine GTPasiche e con una riduzione delle metalloproteasi di matrice 9.

La capacità delle statine di ridurre i processi di ossidoriduzione delle cellule endoteliali riduce direttamente l'espressione di geni pro-infiammatori sensibili a questi processi (come NF-Kb) sia in queste cellule che in quelle muscolari lisce vasali<sup>96 97</sup> e sono anche in grado aumentare l'espressione di enzimi anti-ossidanti come le catalasi, superossido dismutasi e tioredoxina.

- Sulle cellule muscolari, dove riducono il rimodellamento della matrice extracellulare da parte di MMP9 e l'attivazione di angiotensina II che ha azione pro-fibrotica sulla parete<sup>98</sup>.
- Sull'immunità cellulare, essendo stata dimostrata in vitro la capacità di diminuire sia l'interazione tra cellule muscolari lisce e monociti sia la loro produzione di citochine pro-infiammatorie come IL-6, sia di aumentare il numero di linfociti Th e Treg; inoltre, proprio su cellule T isolate da soggetti sani, si è studiata l'azione di lovastatina che si è dimostrata in grado di inibire il rilascio di IL-2, IL-4 e IFN-gamma con meccanismo dose-dipendente<sup>99</sup>, mentre sulle cellule B ne inibisce la proliferazione e la differenziazione, portandole all'apoptosi<sup>100</sup>. Sui macrofagi, invece, si è dimostrato come simvastatina riduca l'espressione di citochine come IL-6, IL-8 e MCP-1, legati anche qui alla riduzione dell'attivazione di NF-kB, in pazienti affetti da ipercolesterolemia<sup>101</sup>.
- Sulle piastrine, dove, con studi in vitro successivamente ad incubazione con atorvastatina, si è denotata una riduzione di ciclossigenasi-2 per riduzione dell'espressione di CD40 ligando sulla superficie<sup>102</sup> oltre ad una diminuzione della loro aggregazione per alterazione dello stato di ossidoriduzione.

Un'importante valutazione degli effetti antinfiammatori delle statine è stato fatto attraverso lo studio PRINCE (Pravastatin inflammation CRP evaluation), che ha

dimostrato come con una somministrazione giornaliera di 40 mg di pravastatina per 24 settimane sia stata significativamente ridotta la PCR sierica in soggetti con e senza patologia cardiovascolare, indipendentemente dai valori di LDL<sup>103</sup>.

Ma l'azione delle statine non è importante solo per quanto riguarda aterosclerosi e rischio cardiovascolare, infatti, si è dimostrato come il trattamento con statina migliori l'outcome e la mortalità in pazienti in stato infettivo<sup>104 105</sup> e come il trattamento in acuto con atorvastatina (40 mg/die) diminuisca la progressione della sepsi in sepsi severa (The ASEPSIS trial)<sup>106</sup>.

## ***2.2. Statine e NET***

Recentemente si è visto come pazienti in terapia con statine abbiano una riduzione della mortalità per severa infezione batterica come polmonite, batteriemia e sepsi rispetto al resto della popolazione<sup>107 108 109</sup>.

Investigandone il processo in vitro, si è visto che, in seguito ad infezione da *Staphylococcus Aureus*, in neutrofili incubati in terreno contenente mevastatina a concentrazioni non direttamente tossiche risultavano inibite sia la capacità fagocitica che quella ossidativa, mentre risultava fortemente aumentata la produzione di trappole extracellulari di cromatina visualizzabili all'immunofluorescenza.

La causa di questa azione sembra essere legata sempre all'inibizione della sintesi di acido mevalonico e oltre alla mevastatina, anche lovastatina, simvastatina e fluvastatina hanno ottenuto lo stesso risultato<sup>110</sup>.

Dato che il trattamento con statina è in grado di ridurre la produzione da parte dei neutrofili di specie reattive dell'ossigeno che sono stimolo alla sintesi di NETs, il fatto che questi ultimi aumentino sembra essere proprio legato ad un'azione diretta della statina sulla cellula, che ne induce la formazione a livelli più bassi di ROS.

All'interno dello stesso studio, si è valutata la relazione statina-NETs anche in vivo, sottoponendo un gruppo di topi a terapia con simvastatina andando poi a prelevare cellule peritoneali stimulate con tioglicolato e, come per i dati in vitro, si è evidenziata una maggiore produzione di NETs in quelle del gruppo in trattamento con statina rispetto ad un altro gruppo non in trattamento.



Altro dato interessante si è ottenuto studiando neutrofili e NETs a livello alveolare dopo inoculazione intranasale di *Staphylococcus Aureus* nei due gruppi di topi, uno trattato con statina e uno no: si è notato che le cellule infiammatorie reclutate nelle lesioni erano pressoché uguali, mentre il numero di NETs era nettamente superiore nel gruppo trattato e la lesione macroscopica alveolare molto più localizzata, dimostrando un controllo maggiore della risposta infiammatoria umorale<sup>110</sup>.

### **3. Inibitori di PCSK9**

L'osservazione che PCSK9 è in grado di regolare i livelli di LDL-C degradando i recettori per le LDL (LDLR) a livello epatico ha suggerito lo sviluppo di inibitori di questa proteina per il trattamento delle ipercolestolemie.

Gli inibitori di PCSK9 possono essere divisi in 2 categorie: quelli che agiscono a livello intracellulare andando ad inibire la sintesi o il processo di maturazione della proteina e quelli in grado di bloccare l'interazione con il recettore a livello extra-cellulare.

Della prima categoria fanno parte ASO e siRNA, che inducono la degradazione dell'RNA messaggero codificante per PCSK9 e piccole molecole in grado di bloccare il processo di maturazione e rilascio della proteina.

Nella seconda categoria si trovano invece peptidi e molecole in grado di inibire la formazione del complesso PCSK9-LDLR sulla membrana plasmatica e gli anticorpi monoclonali in grado di legare PCSK9 circolante bloccandone l'attività, questi ultimi rappresentano le molecole in stato di sperimentazione clinica più avanzato.

Il primo studio fu del 2007, quando venne proposto l'uso di oligonucleotidi antisenso inibitori di PCSK9 portando ad una riduzione del colesterolo totale di circa il 53% e in un raddoppiamento dell'espressione di LDLR a livello epatico nei topi<sup>111</sup>, poi osservato anche in primati umani<sup>112</sup>.

Nel 2009 si passò allo studio di anticorpi monoclonali contro PCSK9<sup>113</sup> e si dimostrò l'effetto e la sicurezza della terapia su primati non umani, dimostrando come tali incoraggianti risultati legati al beneficio ipolipidizzante aumentassero in modo sinergico se associati a statina<sup>114</sup> [Immagine 9].

Ad oggi, gli anticorpi monoclonali più studiati come inibitori di PCSK9 sono tre:

- Alirocumab, anticorpo monoclonale umano IgG1 approvato dalla FDA nel luglio 2015,
- Evolocumab, anticorpo monoclonale umano IgG2 approvato dalla FDA nell'agosto 2015,
- Bococizumab, anticorpo monoclonale umanizzato IgG2delta, il cui utilizzo è stato interrotto a novembre 2016, alle soglie della sua approvazione, per diminuzione dell'efficacia legata all'elevata immunogenicità e alle reazioni sul sito di iniezione.

Studi pre-clinici in topi hanno mostrato che una singola somministrazione endovenosa di Evolocumab raddoppia i livelli di LDLR nel fegato e diminuisce i livelli di colesterolo totali circolanti fino al 36%, mentre in scimmie cynomolgus lo stesso anticorpo riduce i livelli di LDLC fino all'80%, un effetto che permane per 10 giorni<sup>114</sup>.

I risultati dei trials clinici di fase I con anticorpi monoclonali contro PCSK9 sono stati incoraggianti.

Il trattamento con Alirocumab iniettato sottocute in soggetti sani con livelli di LDLC superiori a 100 mg/dL porta ad una riduzione media dei livelli di LDLC pari al 65%, un effetto che alla dose più alta viene mantenuto fino a trenta giorni dalla somministrazione. Anche in pazienti ipercolesterolemici, sottoposti a restrizioni dietetiche ma non a trattamento farmacologico ipolipidemizzante, il trattamento con Alirocumab ha portato ad una riduzione dei livelli di LDLC pari al 57%<sup>115</sup>.

In pazienti sottoposti a terapia con statina, sia affetti da ipercolesterolemia di natura non genetica che pazienti affetti da ADH, l'associazione con Alirocumab porta rispettivamente ad ulteriore riduzione dei livelli di LDLC del 38-65% e del 41-58%<sup>116</sup>. Una singola somministrazione dell'anticorpo Evolocumab per via sottocutanea o endovenosa in soggetti sani con livelli di LDLC tra 100 e 200 mg/dL porta ad una riduzione dei livelli di LDLC fino al 64%. Evolocumab è stato anche testato in soggetti con livelli di LDLC compresi tra 70 e 200 mg/dL in combinazione con statine. Evolocumab ha in questo caso dimostrato la capacità di ridurre i livelli di LDLC in modo

---

dose dipendente fino ad una riduzione massima del 75% rispetto ai valori iniziali<sup>117</sup>.

In tutti gli studi di fase I sopra descritti gli anticorpi monoclonali sono stati ben tollerati, sia dopo singola somministrazione che dopo somministrazioni ripetute.

Nella maggior parte dei casi gli eventi avversi riportati sono stati la comparsa di emicrania e, nel caso specifico della posologia sottocutanea, reazioni nel sito di somministrazione di natura per lo più lieve e transitoria.

Il trattamento con Alirocumab è stato testato su pazienti affetti da ipercolesterolemia in terapia con Atorvastatina a diverse dosi (10, 20, 40 e 80 mg) ed in pazienti ADH eterozigoti in terapia con statina ed Ezetimibe<sup>116 118</sup> [Immagine 10].

In pazienti con ipercolesterolemia primaria Alirocumab 50-300 mg dopo 12 settimane di trattamento abbassa i livelli di LDLC del 40-72% indipendentemente dalla dose di Atorvastatina.

Il trattamento dei pazienti in terapia con Atorvastatina al dosaggio di 80 mg con una somministrazione sottocutanea di Alirocumab ogni 2 settimane ha mostrato dopo 8 settimane una riduzione di livelli di LDLC pari al 72% rispetto ad una riduzione del 18% ottenuta con il trattamento con la sola statina.

In pazienti con ADH eterozigoti il trattamento con Alirocumab è stato testato a dosi diverse di 150, 200 e 300 mg con somministrazione ogni 4 settimane e ad una dose di 150 mg con somministrazione ogni 2 settimane contro placebo.

Il trattamento ha portato ad una riduzione dose dipendente dei livelli di LDLC variabile dal 28,9% al 67,9%.

Studi clinici di fase II con Evolocumab hanno mostrato risultati simili in combinazione con dosi massimali di statina ed anche in monoterapia, in soggetti ipercolesterolemici, inclusi pazienti ADH eterozigoti, ed in pazienti intolleranti alle statine<sup>119 120</sup>.

Nel complesso i risultati mostrano che l'utilizzo di anticorpi monoclonali porta ad una riduzione media dei livelli di colesterolo pari al 50-60% sia in monoterapia che quando somministrata in combinazione con una statina.

La posologia migliore sembra essere quella di due somministrazioni sottocutanee al mese, che permettono una maggiore stabilità nella riduzione della colesterolemia ed evitano i picchi di LDLC che si presentano nel caso di somministrazioni a distanza di un mese.

Assumendo un beneficio che, come dimostrato da numerosi studi epidemiologici e meta-analisi, è proporzionale alla riduzione dei livelli di LDLC il trattamento con anticorpi monoclonali potrebbe portare ad una riduzione del 40-50% del rischio cardiovascolare relativo.

Nello studio OSLER (Open-label Study of Long-Term Evaluation Against LDLC Randomized trial) pazienti con ipercolesterolemia sono stati mantenuti in terapia con Evolocumab 420 mg ogni 4 settimane in combinazione con terapia ipolipidemizzante, oppure riportati alla sola terapia ipolipidemizzante, e monitorati per 52 settimane<sup>121</sup>.

I risultati mostrano un'efficacia prolungata di Evolocumab, associata con una buona tollerabilità.

Nei pazienti in trattamento con Evolocumab è stata infatti mantenuta una riduzione dei livelli di LDLC pari al 52,1%, simile a quella ottenuta negli studi di fase II, mentre nei pazienti riportati alla sola terapia ipolipidemizzante i valori di LDLC sono ritornati ai valori basali osservati al momento dell'arruolamento negli studi di fase II.

## **SCOPO**

In letteratura è stato più volte dimostrato come le statine, oltre al più noto effetto ipolipidemizzante, svolgano un'importante azione sia sul progredire del danno vascolare, sia sulla risposta infiammatoria correlata all'aterosclerosi. Non sono invece presenti finora dati che abbiano verificato l'effetto diretto di inibitori di PCSK9 sul quadro infiammatorio in modelli umani.

L'obiettivo che ci siamo proposti in questo studio è stato quello di valutare la risposta infiammatoria cellulo-mediata in pazienti dislipidemicici ad alto rischio cardiovascolare che assumessero inibitori di PCSK9 in associazione a statina in confronto con quella relativa ad un gruppo di controllo di pazienti dislipidemicici solo in terapia con statina.

## **MATERIALI E METODI**

## 1. I pazienti

I pazienti sono stati selezionati tra gli afferenti al Centro Dislipidemie dell' U.O. di Medicina Interna I dell'Azienda Ospedaliera ASST Sette Laghi, Ospedale di Circolo Fondazione Macchi. Nello specifico, i pazienti che hanno avuto possibilità di assumere inibitori di PCSK9 sono stati scelti all'interno di una popolazione maggiorenne in terapia con la massima dose di terapia farmacologica convenzionale (definita come Rosuvastatina 20 o 40 mg, Atorvastatina 40 o 80 mg, o Simvastatina 80 mg, o la massima dose tollerata di uno dei tre farmaci) e con:

- Ipercolesterolemia familiare con  $LDL \geq 160$  mg/dL
- Ipercolesterolemia familiare con  $LDL \geq 130$  mg/dL e due o più dei seguenti fattori di rischio tra:
  - $LDL > 250$  mg/dL alla diagnosi
  - parente di primo grado con evento cardiovascolare precoce
  - sindrome metabolica
  - $HDL < 40$  mg/dL
  - ipertensione arteriosa
  - lipoproteina a  $\geq 50$  mg/dL
  - xantoma tendineo
- Ipercolesterolemia familiare con  $LDL \geq 130$  mg/dL e uno e uno dei seguenti fattori:
  - patologia cardiovascolare
  - diabete mellito di tipo 2 in terapia o di tipo 1 con danno d'organo
  - familiarità per eventi cardiovascolari molto precoci
- Patologia cardiovascolare e  $LDL \geq 130$  mg/dL
- Patologia cardiovascolare pregressa documentata e  $LDL \geq 100$  mg/dL.

Sono stati esclusi pazienti:

- in terapia con il dosaggio massimo tollerato da meno di quattro settimane prima dello screening
- in terapia con un fibrato (non fenofibrato) nelle quattro settimane prima dello screening
- dosaggio di statina inferiore al massimo tollerato
- uso di una statina diversa da quelle segnalate
- trigliceridemia a digiuno superiore a 400 mg/dL alla visita di screening
- ipertensione incontrollata alla visita di screening
- scompenso cardiaco di classe 3 o 4 secondo la New York Heart Association
- pregresso ictus emorragico
- valori di transaminasi o di CPK tre volte il limite superiore alla visita di screening
- infezione da HBV o HCV
- $GFR < 30$  ml/min alla visita di screening



- donne fertili senza appropriato metodo contraccettivo, in gravidanza o durante l'allattamento
- ipersensibilità ad inibitori di PCSK9 o ai loro eccipienti.

In particolare, otto pazienti sono stati trattati con Alirocumab al dosaggio di 75 mg inizialmente, poi titolato a 150 mg dopo la dodicesima settimana per cinque di questi per il mancato raggiungimento del target secondo il proprio profilo di rischio cardiovascolare e cinque pazienti sono stati trattati con Evolocumab al dosaggio di 140 mg, entrambi somministrati per iniezione sottocutanea attraverso penne pre-riempite da 1 ml una volta ogni due settimane.

Parallelamente a questo gruppo, è stata selezionata un'altra popolazione con uguale distribuzione di età e sesso, rappresentata da pazienti ad alto rischio cardiovascolare secondo Heart SCORE, ma con valori lipidemici a target (LDL <70 mg/dl) solo in terapia con statine.

## ***2. Protocollo di studio***

Ogni paziente è stato sottoposto a rilevazione dei parametri antropometrici e a prelievo di sangue sia per l'esecuzione di esami ematochimici che per la separazione in laboratorio di siero e cellule per lo studio dei markers di infiammazione.

### ***2.1 Rilevazione dei parametri antropometrici***

I parametri antropometrici misurati sono stati peso (kg) e altezza (m) con calcolo dell'indice di massa corporea (kg/m<sup>2</sup>).

### ***2.2 Esami ematochimici***

I pazienti in terapia con inibitori di PCSK9 sono stati sottoposti alla determinazione di emocromo con formula con valutazione del rapporto neutrofili/linfociti, glicemia, colesterolemia totale, HDL, LDL, trigliceridemia, uricemia e creatinemia a tempo zero e, in seguito, trascorsi uno, tre e sei mesi, appena prima della nuova iniezione di farmaco.

Alla popolazione di controllo a target solo con terapia convenzionale sono stati eseguiti esami ematici con valutazione della colesterolemia totale, HDL, LDL e trigliceridemia,

a tempo zero e a sei mesi e dell'emocromo con formula per la valutazione del N/L ratio, uricemia e creatinemia a tempo zero.

### ***2.3 Quantificazione dei NETs***

Per la valutazione quantitativa dei NETs, si è deciso di misurare la concentrazione dell'elastasi neutrofila utilizzando un kit (NETosis AssayKit, Cayman Chemical) che permettesse, dopo separazione e messa in coltura dei neutrofili ad una concentrazione di 1 milione di cellule per millilitro con cinque diversi terreni fornenti o meno stimoli farmacologici al rilascio di NETs, di tagliare con una nucleasi il DNA e, tolta la componente cellulata attraverso centrifugazione, di fornire un substrato che legandosi all'elastasi presente nelle reti di acido nucleico ne permettesse la lettura a 450 nm con apposito lettore di micro piastre .

I campioni ematici sono stati prelevati a tempo zero, uno, tre e sei mesi nei pazienti in terapia con inibitori di PCSK9 e a zero e sei mesi nei pazienti assumenti solo statina; sono stati raccolti in provette contenenti EDTA (acido etilen-diammino-tetraacetico) e trattati attraverso diversi passaggi per permettere la separazione e la quantificazione dei neutrofili di ogni paziente, in modo da poter distribuire esattamente 1 milione di cellule per pozzetto di coltura.

Il terreno utilizzato per la messa in coltura è stato il Net Assay Buffer, costituito, come da indicazioni del kit, con RPMI 1650 base medium, albumine di siero bovino e cloruro di calcio.

I pozzetti sono stati divisi in:

- solo terreno RPMI,
- terreno e cellule (Resting),
- terreno con cellule e PMA (Phorbol Myristate Acetate),
- terreno con cellule e FMLP (N-Formylmethionine-leucyl-phenylalanine),
- terreno con cellule e interleuchina 8,
- terreno con cellule e LPS (lipopolisaccaride).

La messa in coltura è stata effettuata interamente sotto cappa.

La lettura, infine, è stata effettuata con un lettore di piastre in grado di misurare l'assorbanza intorno ai 450 nm e la valutazione dei risultati è stata eseguita rapportando in modo lineare l'assorbanza alla concentrazione di elastasi.

## ***2.4 Rilevazione delle citochine sieriche***

Per valutare il pattern infiammatorio umorale, si è deciso di misurare la concentrazione sierica di cinque specifiche citochine: IL-8, IL-1beta, IL-17A, TNF-alfa e IL-10.

Il procedimento ha previsto l'utilizzo di kit ELISA (Invitrogen, Technofisher) [Immagine 11] scelti con livelli di sensibilità idonei alle concentrazioni sieriche documentate in letteratura per ciascuna citochina, utilizzando come campione il siero raccolto in provette contenenti Separgel a tempo zero, uno, tre e sei mesi per i pazienti in terapia con inibitori di PCSK9 e a zero e sei mesi per i pazienti assunti solo statina.

Separato il siero dalla parte corpuscolata del sangue per centrifugazione, si è provveduto all'esecuzione di un kit ELISA per citochina, con lettura finale attraverso lettore di micro piastre per assorbanza a 450 nm ed elaborazione dei dati riportando l'assorbanza calcolata alla concentrazione in pg/ml in modo lineare.

Il kit ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) diretto o a "sandwich" è una tecnica immuno enzimatica che sfrutta la presenza di anticorpi per la rilevazione di determinati antigeni; in questo caso, sul fondo di ogni pozzetto della piastra fornita dal kit, sono presenti anticorpi primari specifici per ogni antigene-citochina da cercare.

Ponendo nel pozzetto il siero del paziente (contenente o meno la citochina), questa andrà a legarsi all'anticorpo primario.

Dopo il lavaggio degli antigeni in eccesso, viene aggiunta al pozzetto una soluzione contenente un anticorpo secondario specifico, in grado di legare anch'esso la citochina, coniugato con un enzima che, dopo un ulteriore lavaggio e l'aggiunta di una soluzione contenente il substrato di quest'enzima, convertirà il colore del substrato da azzurro-blu a giallo, rendendolo leggibile dallo spettrofotometro.

## ***2.5 Analisi statistica***

I dati per le variabili continue sono stati espressi come media  $\pm$  deviazione standard (DS).

I confronti tra le variabili continue sono stati eseguiti con il test *t di Student*.

I dati con distribuzione non normale nell'ambito della popolazione in esame sono stati analizzati ed espressi come mediana e range interquartile. I confronti tra queste variabili sono stati eseguiti con il test *Mann-Whitney*.

Le variabili categoriche sono state confrontate con test del chi-quadro o con il Test di *Fisher*.

L'analisi univariata è stata realizzata utilizzando il coefficiente di correlazione lineare di Pearson o Spearman.

È stato considerato significativo un valore di  $p < 0,05$ .

Le analisi statistiche sono state condotte utilizzando il software SPSS versione 11 (Chicago, IL, USA).

## **RISULTATI**

In questo studio sono stati arruolati 19 pazienti di cui 9 maschi e 10 femmine con un'età media di  $59.4 \pm 7.1$  anni.

Come atteso dai criteri di inclusione, i due gruppi sono sovrapponibili per età, sesso, indici antropometrici e profilo di rischio cardiovascolare [Tabella 1 e Tabella 2].

Il primo gruppo di pazienti, in terapia con inibitori di PCSK9 e statina, al momento del reclutamento presentava valori di LDL superiori al target determinato in base al profilo di rischio cardiovascolare secondo Heart SCORE, valori che hanno subito un'importante diminuzione al controllo del profilo lipidico eseguito ad un mese, poi riconfermato nei successivi accertamenti a tre e sei mesi dall'inizio della terapia [Figura 1].

Il secondo gruppo di pazienti, in terapia con sola statina, invece, presentava valori di colesterolo LDL a target secondo il proprio profilo di rischio cardiovascolare già all'inizio dello studio, valori che sono rimasti pressoché costanti nel successivo controllo a sei mesi [Figura 2].

Dall'analisi dei parametri biochimici rilevati all'inizio dello studio e a sei mesi non sono emerse differenze statisticamente significative tra i due gruppi, ad eccezione dei valori di colesterolemia totale e di colesterolo LDL a tempo zero, risultati significativamente più alti nel gruppo di studio prima dell'inizio della terapia con inibitori di PCSK9 [Tabella 3, Tabella 4, Figura 3].

Analizzando l'andamento della concentrazione di elastasi nel tempo, non si sono evidenziate notevoli differenze né tra i due diversi gruppi di pazienti né all'interno del gruppo in terapia con inibitori di PCSK9 e statina: valutando nello specifico la variabilità dei diversi stimoli forniti alla secrezione di NETs da parte dei neutrofili, non è stata rilevata alcuna differenza statisticamente significativa per le sole cellule in coltura, né per stimolazione in vitro con PMA, FMLP, IL-8 e LPS [Figure 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10].

Nemmeno nei pazienti del gruppo di controllo si sono rilevati valori di elastasi significativamente differenti tra la prima rilevazione e quella a sei mesi [Figura 9].

Inoltre, non è stata trovata alcuna correlazione tra l'andamento della concentrazione di elastasi nel tempo e quello delle LDL plasmatiche né nei pazienti con inibitori di PCSK9 e statina, né in quelli solo con statina [Figura 11].

Il secondo punto focale del nostro studio è stato rilevare la concentrazione delle citochine sieriche indagando la presenza di tumor necrosis factor alpha, interleuchina 8, interleuchina 10, interleuchina 17A e interleuchina 1beta, confrontando i valori rilevati a tempo zero e a sei mesi.

Per le citochine IL8, IL-10, IL-17, IL-1beta e TNF-alfa non sono state trovate differenze statisticamente significative né tra prima e dopo la somministrazione di inibitori di PCSK9 nel primo gruppo [Figura 12], né all'interno del gruppo in terapia solo con statina [Figura 13,14].

Infine, non sono state trovate correlazioni statisticamente significative tra l'andamento nel tempo del colesterolo LDL e la concentrazione sierica di IL-8 e IL-17 [Figure 15 e 17], né tra questo e il rapporto neutrofili-linfociti [Figura 18] sia nel gruppo di studio in terapia con inibitori di PCSK9 e statina che nel gruppo di controllo con sola statina. Nonostante l'esiguità del campione, è stata trovata una correlazione statisticamente significativa tra l'andamento nel tempo del colesterolo LDL e la concentrazione sierica di TNF-alfa sia nel gruppo di studio in terapia con inibitori di PCSK9 e statina che nel gruppo di controllo con sola statina [Figura 16].

## **DISCUSSIONE E CONCLUSIONI**



In questo studio ci siamo proposti di valutare le concentrazioni di elastasi, indicatore della presenza di NETs, e di quella di alcune citochine sieriche per valutare il profilo infiammatorio in due gruppi distinti di pazienti: uno in terapia con inibitori di PCSK9 e statina ed uno solo in terapia con statina.

I valori che abbiamo ricavato evidenziano la mancanza di una significativa differenza nei livelli di elastasi tra prima e dopo l'inizio della terapia con inibitori di PCSK9, differenza che non è emersa nemmeno nel confronto di questi con i valori rilevati nei pazienti del gruppo di controllo.

Altra importante valutazione è stata fatta analizzando le concentrazioni delle diverse citochine sieriche in tutti i pazienti, senza trovare rilevanti differenze né nel tempo né tra i due diversi gruppi e nemmeno alcuna correlazione statisticamente significativa tra l'andamento di queste e la diminuzione del colesterolo LDL, ad eccezione di TNF-alfa.

La popolazione del nostro studio è costituita da soggetti ad alto rischio cardiovascolare che inizialmente, senza il farmaco biologico e con la massima dose tollerata di statina, non risultavano a target secondo il proprio profilo di rischio cardiovascolare Heart SCORE, con valori di colesterolo LDL in media intorno ai  $153.08 \pm 55.71$  mg/dl a tempo zero, per poi risultare per la maggior parte controllati poco dopo l'introduzione in terapia di inibitori di PCSK9, con valori di colesterolo LDL a sei mesi in media intorno ai  $69.30 \pm 39.32$  mg/dl ( $P=0.44$ ), con una riduzione quindi di oltre il 50% rispetto il valore iniziale. La seconda popolazione, invece, costituita sempre da soggetti ad alto rischio cardiovascolare ma già a target in terapia con sola statina, ha avuto valori di LDL pressoché stabili intorno ai  $68.83 \pm 28.69$  mg/dl a tempo zero e ai  $55.3 \pm 19.4$  mg/dl a distanza di sei mesi.

Gli studi che hanno dimostrato l'efficacia e la sicurezza di inibitori di PCSK9 nel diminuire i livelli di colesterolo sono numerosi, ma quello che più si avvicina al nostro lavoro per tipo di pazienti reclutati e durata è lo studio ODYSSEY COMBO I in cui è stata valutata l'efficacia di alirocumab su 316 pazienti ad alto rischio cardiovascolare non a target nonostante la terapia con la massima dose tollerata di statina.

Di questi, al primo gruppo è stato somministrato alirocumab in associazione a statina, al secondo placebo e statina, trovando a 6 mesi una diminuzione del 48.2% del colesterolo

LDL nel primo gruppo e del 2.3% nel secondo gruppo, con circa il 75% dei pazienti in terapia con alirocumab a target, con valori di LDL sotto i 70 mg/dl<sup>122</sup>.

Nel nostro studio, invece, la riduzione del colesterolo LDL a sei mesi è stata del 56.44% nei pazienti in terapia con inibitori di PCSK9 e statina e del 19,61% nei pazienti in sola terapia con statina, con il raggiungimento del target LDL  $\leq 70$  mg/dl nel 50% dei pazienti in terapia con inibitori di PCSK9 e statina.

In letteratura si trovano diversi studi che hanno valutato lo stato infiammatorio in soggetti affetti da ipercolesterolemia e aterosclerosi<sup>144 123</sup> trovando nei neutrofili e in particolare nei NETs uno dei componenti fondamentali di questo processo<sup>124 51 125</sup>.

Altrettanti studi hanno poi analizzato l'effetto svolto dalle statine sull'infiammazione cellulo-mediata, umorale e più recentemente anche sulla sintesi di NETs<sup>126 110 127</sup>, ma nessuno finora ha mai valutato direttamente nell'uomo la possibilità che inibitori di PCSK9 possano essere in grado di agire sulla risposta infiammatoria, in particolare sul rilascio di NETs.

Ad oggi, l'unico dato in letteratura che metta in relazione gli inibitori di PCSK9 al processo infiammatorio è un recente studio di metanalisi che ha provato a correlare la terapia con anticorpi monoclonali anti-PCSK9 con i livelli di proteina C reattiva senza trovare alcun dato significativo<sup>128</sup>.

Quello che abbiamo fatto è stato prima di tutto valutare se gli inibitori di PCSK9 fossero in grado di alterare il comportamento dei neutrofili nel rilasciare le loro trappole extracellulari e questo è stato effettuato misurando la concentrazione di elastasi dopo loro incubazione con diversi stimoli pro-infiammatori; infatti, il contenuto dei granuli citoplasmatici che viene rilasciato al di fuori della cellula insieme ai filamenti di cromatina e istoni in seguito ad uno stimolo esterno di diversa natura, è composto da mieloperossidasi ed elastasi che possono perciò essere usati come indici diretti della formazione di NETs<sup>63</sup>.

Nella valutazione della concentrazione di elastasi all'interno dei due gruppi di pazienti nei diversi momenti dello studio non si sono rilevate differenze statisticamente

significative dei suoi livelli, ciò fa pensare che gli inibitori di PCSK9 non influiscano sul rilascio di elastasi e quindi di NETs da parte dei neutrofili di pazienti già in terapia con statina.

Inoltre, non sono state rilevate correlazioni tra i livelli di elastasi e l'andamento delle LDL plasmatiche né all'interno del gruppo di studio né in quello di controllo. Quindi, sia in pazienti in terapia con statina ed inibitori di PCSK9 che in pazienti in terapia con sola statina, una diminuzione anche importante del valore di LDL circolanti non influisce, a distanza di sei mesi, sul rilascio di NETs da parte dei neutrofili.

Il secondo obiettivo dello studio è stato quello di misurare la concentrazione di alcune citochine infiammatorie: IL-1beta, IL-17A, IL-8, TNF-alfa e IL-10, per valutarne il livello e l'andamento nel tempo.

Nello specifico, dalla letteratura si evince come IL-1beta ricopra un duplice ruolo nel processo aterosclerotico: protettivo nei confronti dell'instabilità di placca, ma inducente rimodellamento della parete vasale<sup>129</sup>; la sua sintesi è indotta dalla presenza di LDL modificate e cristalli di colesterolo in maniera dose-dipendente<sup>70 130 131 132</sup>.

IL-17, invece, è secreta soprattutto da linfociti Th2 e Th17, il suo compito è di attivare cellule endoteliali, epiteliali, fibroblasti, macrofagi e cellule dendritiche<sup>133</sup> [Immagine 12] e sul suo rilascio si è già visto l'effetto positivo delle statine che, sempre tramite la diminuzione della sintesi di mevalonato, viene inibita dal rilascio di IFN-gamma, IL-4 e IL-27 da parte dei monociti e dall'inibizione dell'espressione del retinoic acid-related orphan nuclear hormone receptor C, fattore di trascrizione dei TCD4+<sup>134</sup>.

Abbiamo analizzato anche la presenza di IL-8 in quanto come citochina pro-infiammatoria svolge diverse azioni nell'aterogenesi come reclutare neutrofili e cellule T, aumentare l'adesione dei monociti all'endotelio e la migrazione di cellule muscolari lisce nell'intima<sup>135</sup>. Inoltre, si è recentemente dimostrato come in pazienti dislipidemicici IL-8 subisca un'importante diminuzione in seguito ad un anno di terapia con simvastatina<sup>127</sup>.

TNF-alfa, invece, è prodotto soprattutto dai macrofagi e promuove l'induzione di molecole di adesione sulla parete vascolare, il reclutamento e la diffusione di monociti/macrofagi e l'aumento della sintesi di VLDL<sup>43 136 137</sup>.

L'azione di simvastatina sulla sua sintesi è stata studiata su miofibroblasti cardiaci dove

si è evidenziata un'importante diminuzione della sua secrezione attraverso la via delle Rho-chinasi<sup>138</sup>.

Era nostro interesse andare anche a cercare se vi fossero alterazioni nella sintesi di citochine modulatrici l'infiammazione come IL-10 che, insieme a TGF-beta, è in grado di regolare positivamente l'evoluzione della placca: infatti, in letteratura si è visto come in topi privati del gene per IL-10 la suscettibilità per lesioni aterosclerotiche fosse 30 volte superiore rispetto al gruppo di controllo<sup>139</sup>.

Ciò che è stato ricavato dall'analisi della concentrazione di queste citochine nei vari momenti all'interno dei due gruppi di pazienti è che non sono presenti differenze statisticamente significative né tra prima e dopo l'assunzione di inibitori di PCSK9, né tra il gruppo di studio e quello di controllo, risultati che fanno pensare che gli inibitori di PCSK9 non influiscano sulla regolazione della sintesi di citochine infiammatorie in pazienti già in terapia con statina.

Inoltre, dai dati raccolti non si evince una correlazione tra la diminuzione delle LDL circolanti indotta dagli inibitori di PCSK9 e i vari livelli di citochine misurate nel siero, ad eccezione di TNF-alfa, dato che fa pensare non ci sia una rilevante variazione della sintesi di citochine infiammatorie sieriche in seguito ad un'importante diminuzione di LDL a distanza di sei mesi in pazienti già terapia con statina.

I limiti di questo studio sono stati per lo più legati al ridotto numero di pazienti che potesse assumere gli inibitori di PCSK9 al momento del reclutamento (anno 2017- 2018); infatti, i criteri di accesso alla terapia con il farmaco biologico risultano molto restrittivi, imponendo di somministrare il farmaco solo a pazienti con valori di colesterolo LDL molto elevato nonostante il dosaggio massimo di statina tollerato e la presenza di specifici fattori di rischio cardiovascolare.

In aggiunta a quello che abbiamo studiato, sarebbe stato interessante riuscire a valutare l'azione degli inibitori di PCSK9 sul pattern infiammatorio di pazienti che non fossero già in terapia con statina. La popolazione ideale per questa valutazione è composta da pazienti intolleranti alla statina, gruppo all'interno del quale ad oggi siamo stati in grado di reclutare solo due pazienti, sempre a causa dei restrittivi criteri di accesso al farmaco.

In conclusione, alla fine della nostra analisi siamo in grado di dire che la somministrazione degli inibitori di PCSK9 in pazienti ad alto rischio cardiovascolare ed

in terapia con statina a distanza di sei mesi non influisce sulla capacità dei neutrofilii di rilasciare NETs né sulla sintesi e la regolazione delle principali citochine infiammatorie. Inoltre, ad eccezione di TNF-alfa, non è stato trovato alcun indice infiammatorio che correli significativamente con la diminuzione del colesterolo LDL in pazienti già in terapia con statina nell'arco di sei mesi.

## **ICONOGRAFIA**

## 1. Tabelle

Tabella 1: Parametri demografici ed antropometrici dei pazienti nei due gruppi.

	PCSK9i + Statina (N=13)	Statina (N=6)	P
Età [Anni]	59.5±7.7	59±6.2	0.883
Sesso femminile [%]	6 [46]	3 [50]	0.885
Peso [kg]	76.1±12.3	74.2±19.2	0.795
Altezza [cm]	164.2±10.3	168±10.1	0.468
IMC [kg/m <sup>2</sup> ]	28.3±3.5	25.9±5.2	0.25
Sovrappeso per IMC (>25kg/m <sup>2</sup> ) [%]	7 [54]	2 [34]	0.434
Obesità per IMC (>30kg/m <sup>2</sup> ) [%]	3 [24]	1 [17]	0.767

Tabella 2: Fattori di rischio cardiovascolari nei pazienti dei due gruppi.

	<b>PCSK9i + Statina (N=13)</b>	<b>Statina (N=6)</b>	<b>P</b>
Cardiopatìa ischemica [%]	6 [46]	1 [17]	0.239
Stroke [%]	4 [31]	1 [17]	0.544
Diabete [%]	0 [0]	2 [33]	0.028
IFG [%]	4 [31]	3 [50]	0.448
Arteriopatìa periferica [%]	1 [8]	0 [0]	0.513
Ipertensione [%]	8 [62]	4 [67]	0.841



Tabella 3: Parametri infiammatori, profilo lipidico e di tossicità all'inizio dello studio nei pazienti dei due gruppi.

	PCSK9i + Statina (N=13)	Statina (N=6)	P
Rapporto Neutrofili/Linfociti	1.9±0.9	1.7±0.3	0.562
Glicemia basale [mg/dL]	96.7±14.9	115.2±41.8	0.167
Colesterolo totale [mg/dL]	242.5±59.3	149.2±22.4	0.002
Colesterolo HDL [mg/dL]	54.7±9.1	59.7±26.2	0.541
Trigliceridi [mg/dL]	136.3±66.7	159.7±112.4	0.576
Colesterolo LDL [mg/dL]	153.1±55.7	68.8±28.7	0.003
CPK [U/L]	162.3±102.8	120.8±30.1	0.353
GOT-AST [U/L]	25.2±5.9	31.5±17.9	0.26
GPT-ALT [U/L]	27.9±15.6	33±15.2	0.516
Creatinina [mg/dL]	0.84±0.16	0.86±0.12	0.7
Urato [mg/dL]	5.2±1	5.0±2.2	0.9

**Tabella 4:** Profilo lipidico e di tossicità a 6 mesi nei pazienti dei due gruppi.

	<b>PCSK9i + Statina (N=13)</b>	<b>Statina (N=6)</b>	<b>P</b>
Colesterolo totale [mg/dL]	150.1±47.5	134.5±26.9	0.477
Colesterolo HDL [mg/dL]	58.1±13.3	54.5±20.4	0.674
Trigliceridi [mg/dL]	114.2±60.6	124.2±45.7	0.735
Colesterolo LDL [mg/dL]	69.3±39.3	55.3±19.4	0.435
CPK [U/L]	184.2±145.9	157.7±72.5	0.687
GOT-AST [U/L]	29.3±11.7	30.5±13.7	0.855
GPT-ALT [U/L]	33.6±13.5	30.7±13.2	0.679

## 2. Figure

Figura 1: Variazione nel tempo dei valori di colesterolo LDL nel gruppo di pazienti in terapia con inibitori di PCSK9 e statina

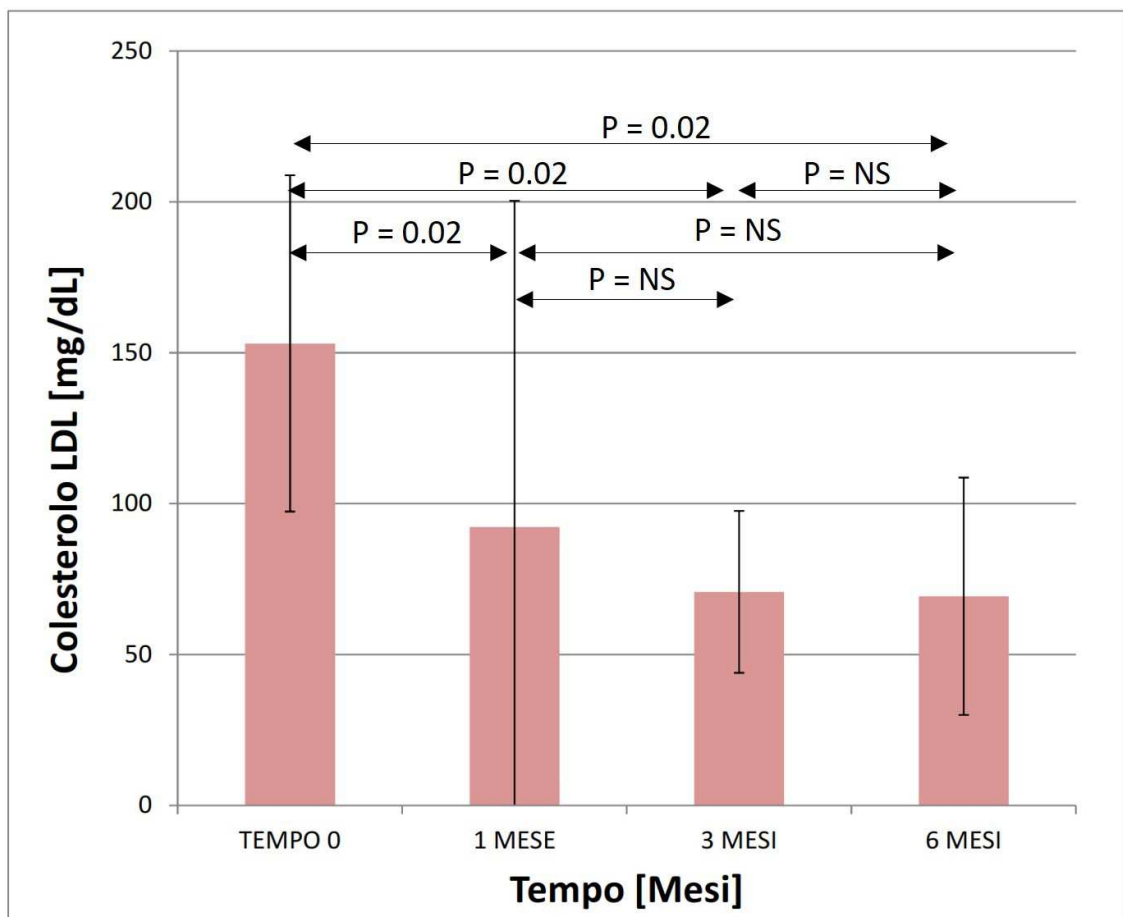
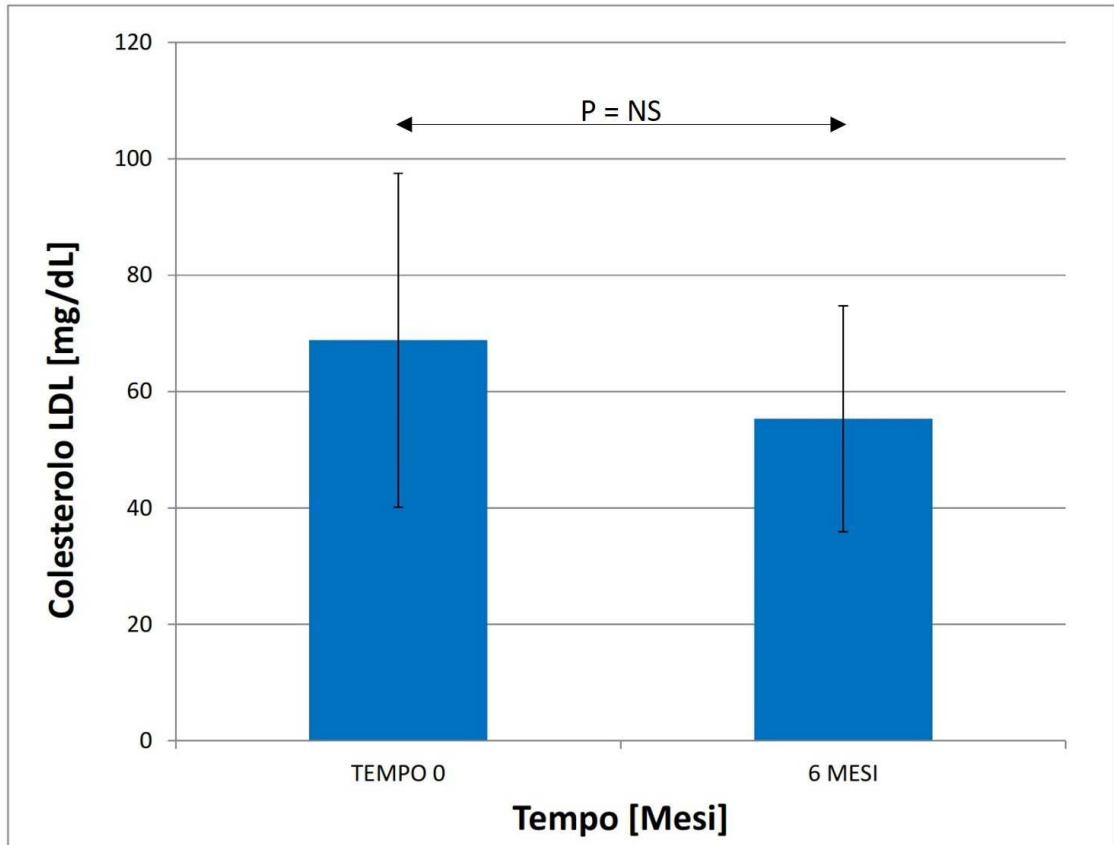
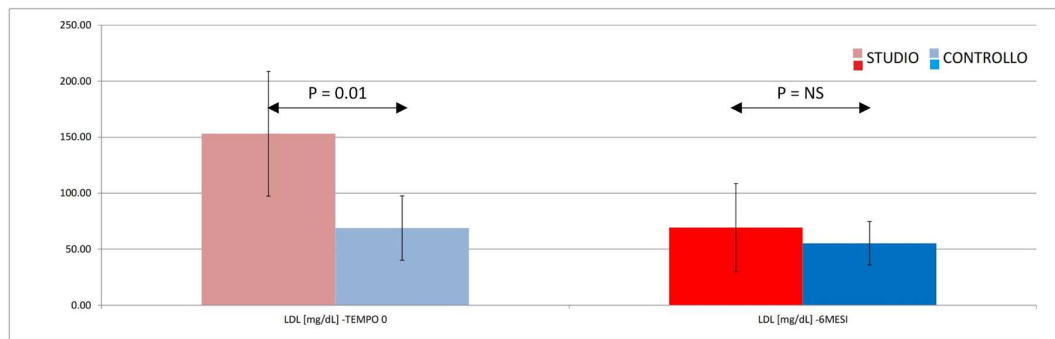


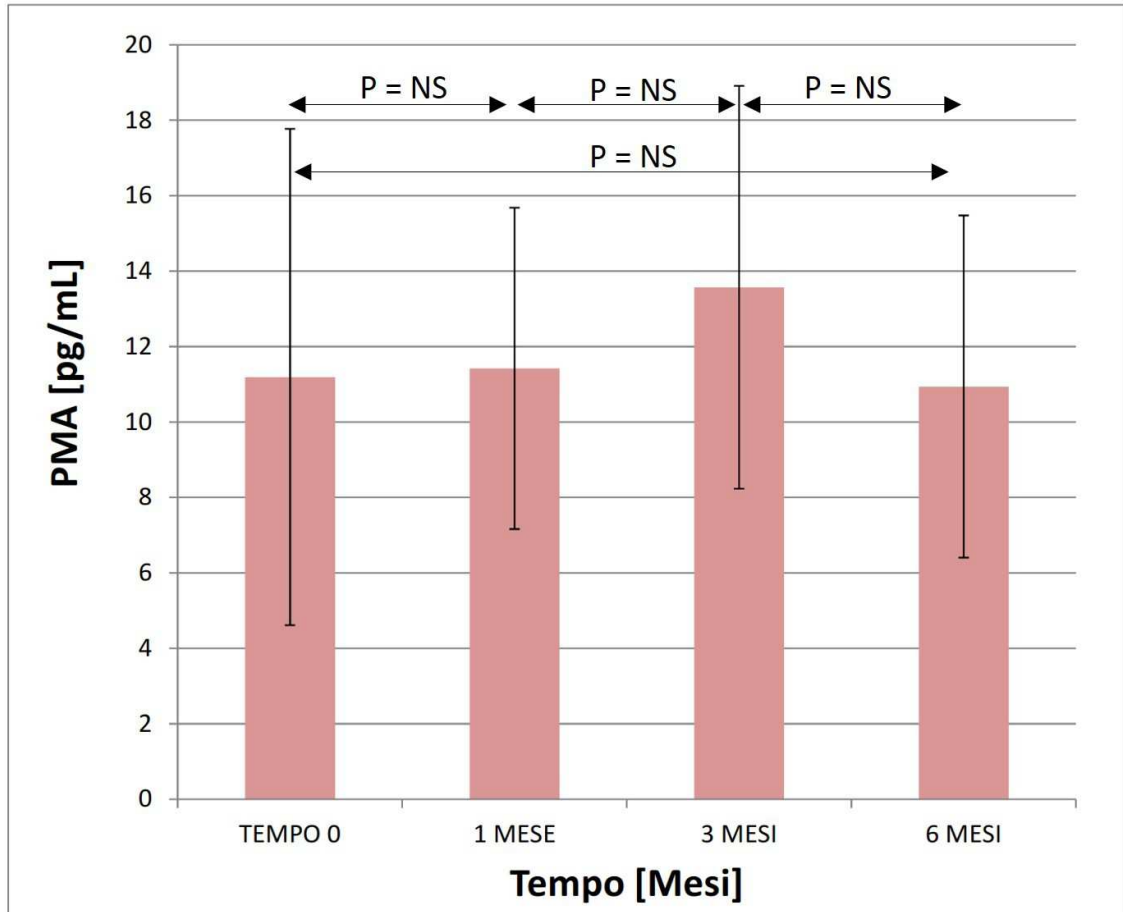
Figura 2: Variazione nel tempo dei valori di colesterolo LDL nel gruppo di pazienti in terapia con sola statina.



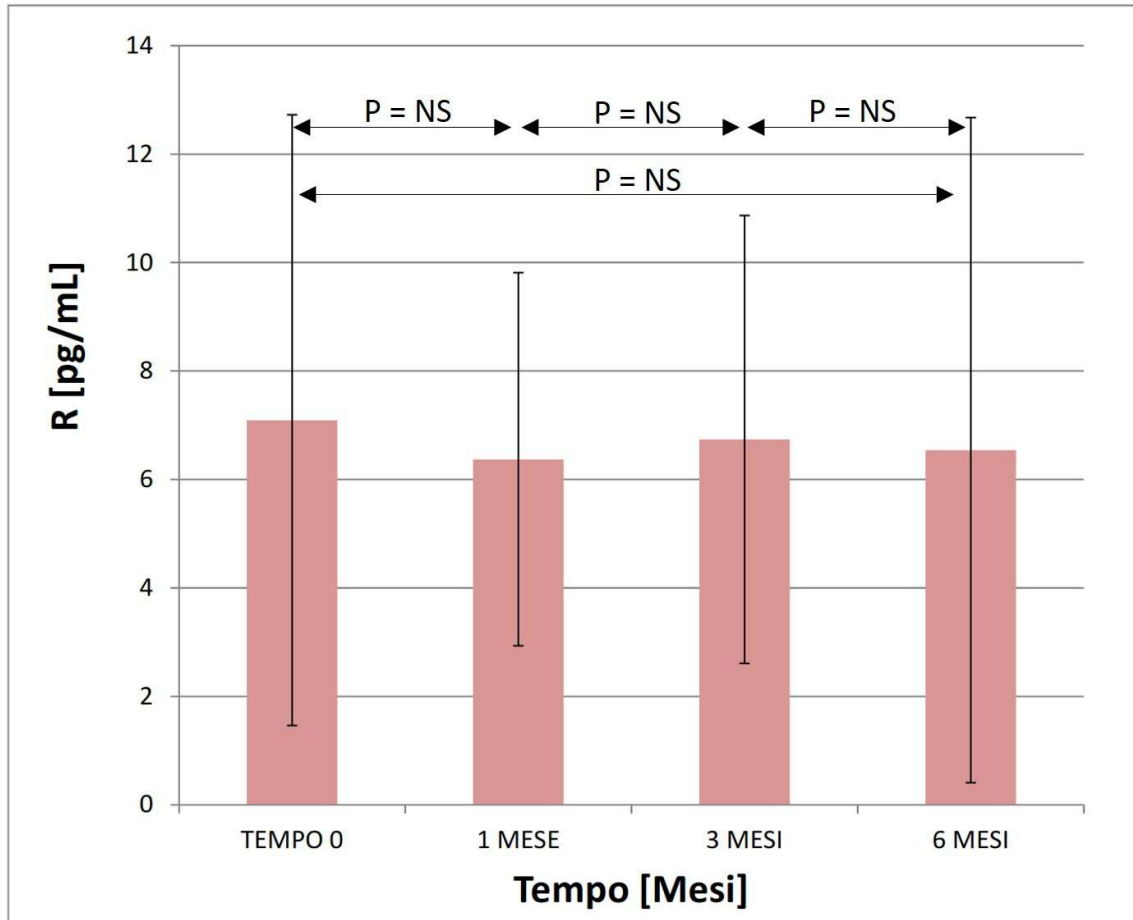
**Figura 3:** Confronto nel tempo dei valori di colesterolo LDL a zero e sei mesi in entrambi i gruppi di pazienti.



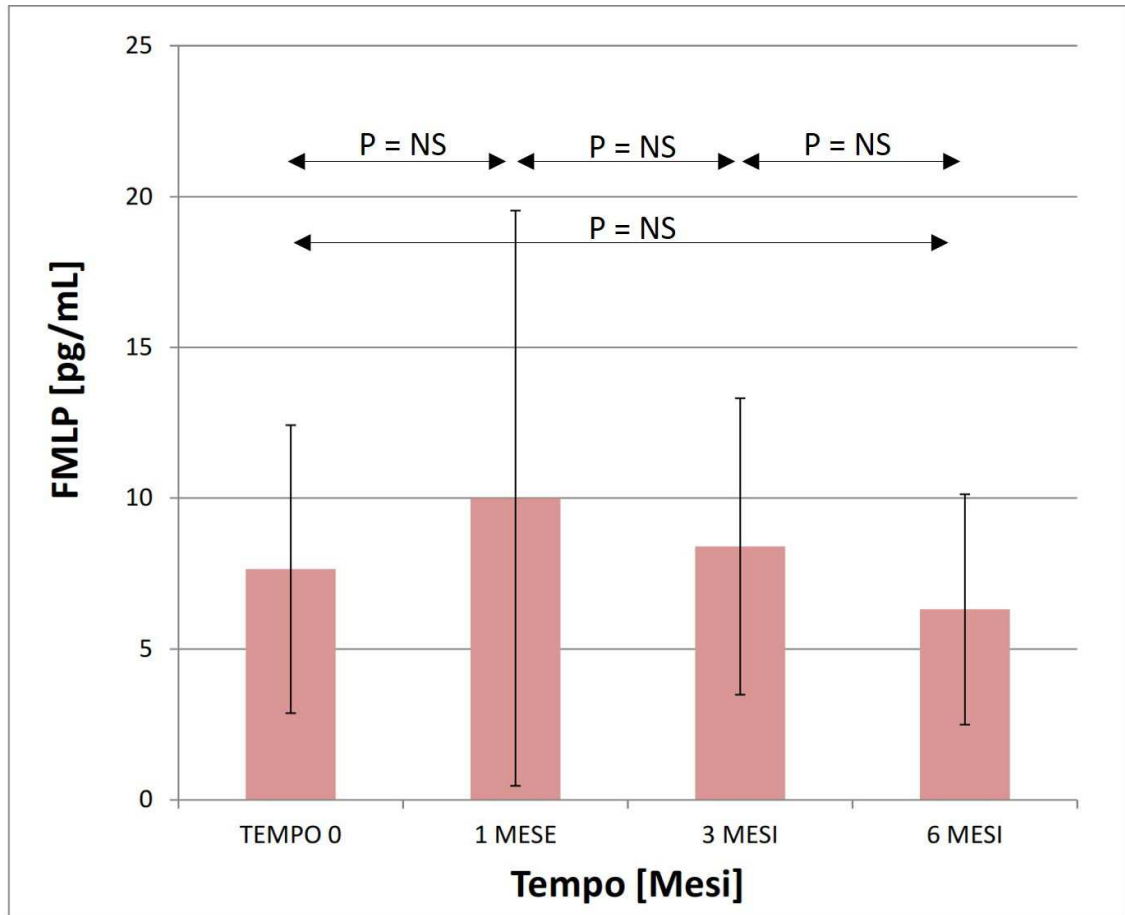
**Figura 4:** Variazione nel tempo dei valori di elastasi nei pazienti in terapia con inibitori di PCSK9 e statina in seguito a stimolazione in vitro con PMA.



**Figura 5:** Variazione nel tempo dei valori di elastasi nei pazienti in terapia con inibitori di PCSK9 e statina senza stimoli farmacologici (resting).

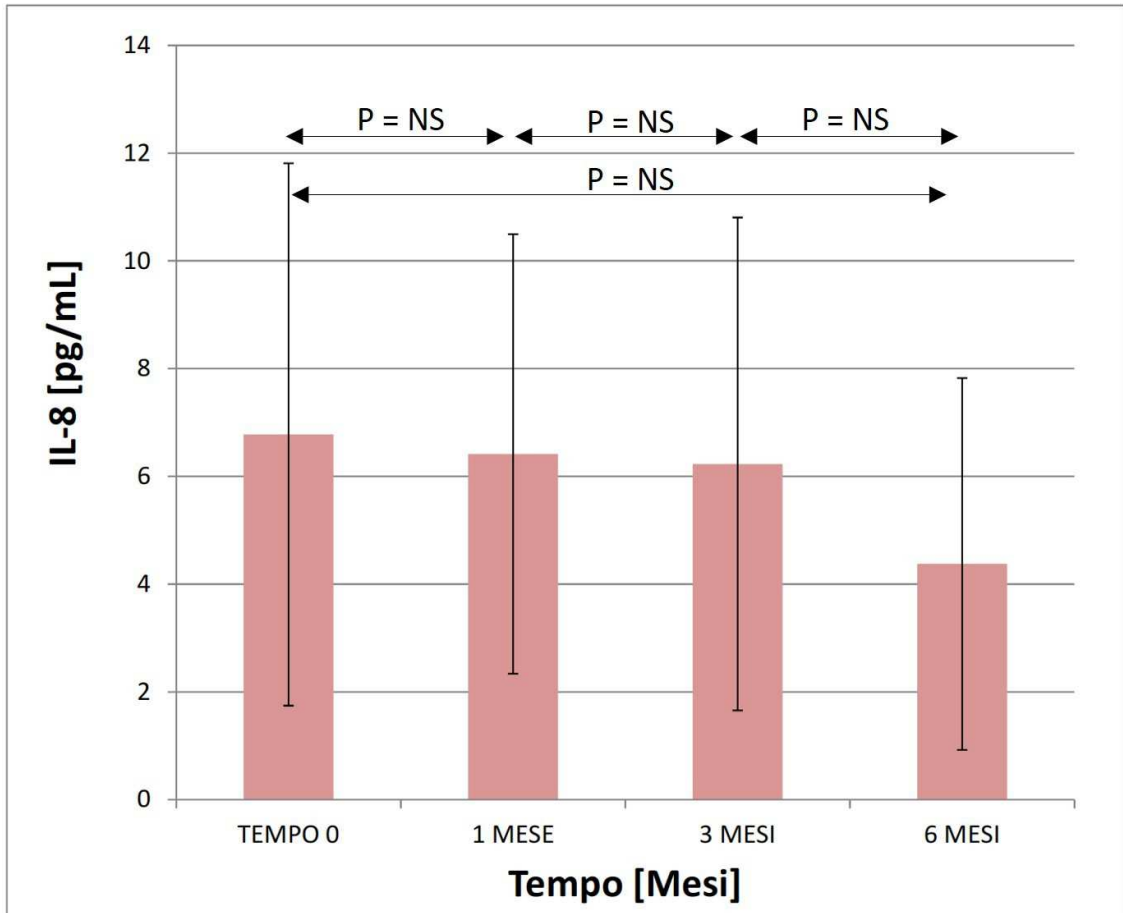


**Figura 6:** Variazione nel tempo dei valori di elastasi nei pazienti in terapia con inibitori di PCSK9 e statina in seguito a stimolazione in vitro con FMLP.

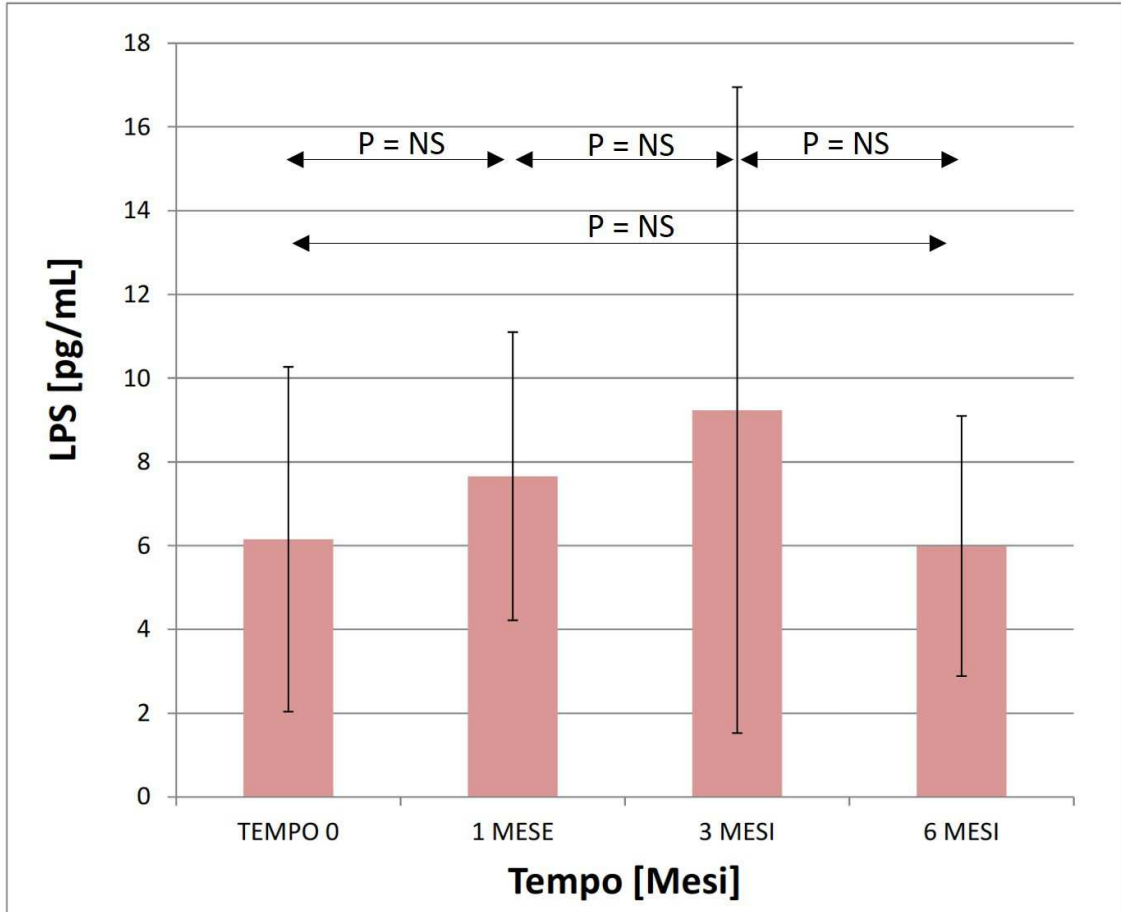




**Figura 7:** Variazione nel tempo dei valori di elastasi nei pazienti in terapia con inibitori di PCSK9 e statina in seguito a stimolazione in vitro con IL-8.



**Figura 8:** Variazione nel tempo dei valori di elastasi nei pazienti in terapia con inibitori di PCSK9 e statina in seguito a stimolazione in vitro con LPS.



**Figura 9:** Variazione nel tempo dei valori di elastasi nei pazienti del gruppo in terapia con sola statina in seguito alle diverse stimolazioni farmacologiche.

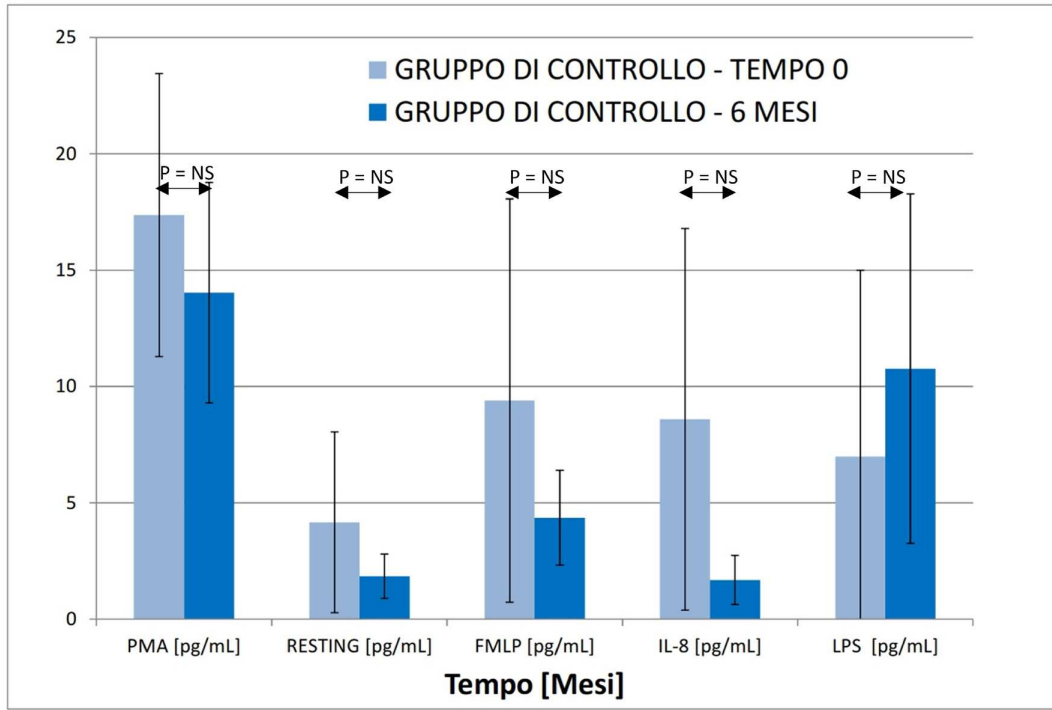


Figura 10: Confronto nel tempo dei valori di elastasi a zero e a sei mesi in entrambi i gruppi di pazienti in seguito alle diverse stimolazioni farmacologiche.

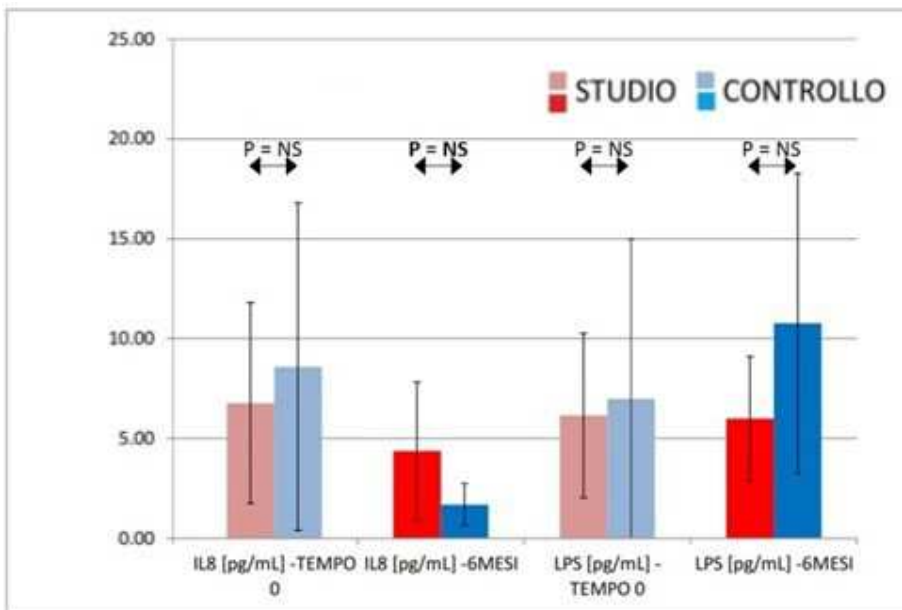
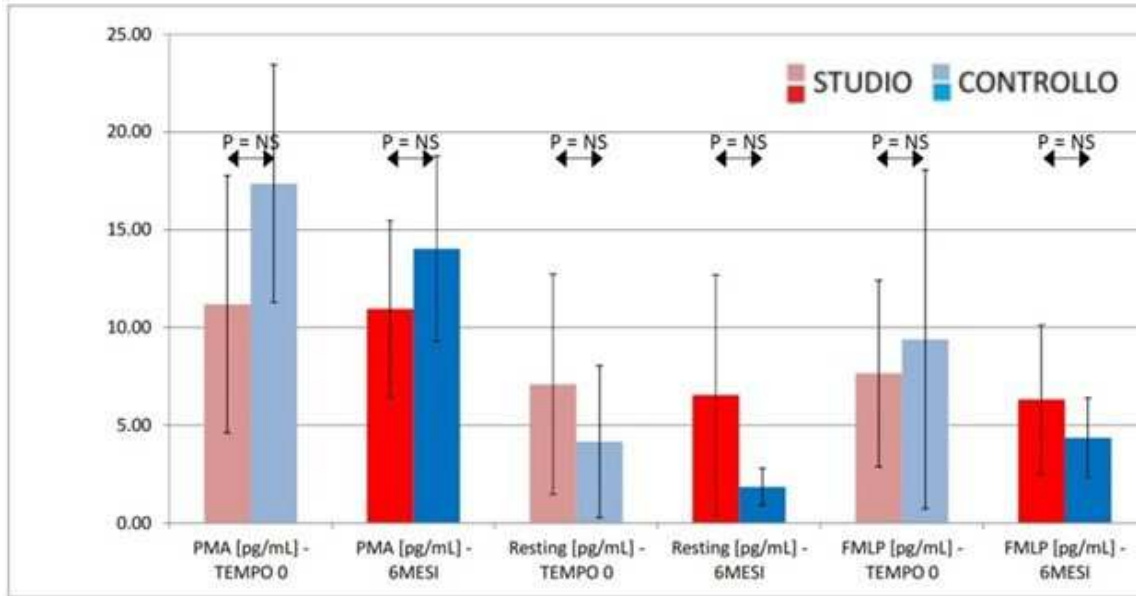
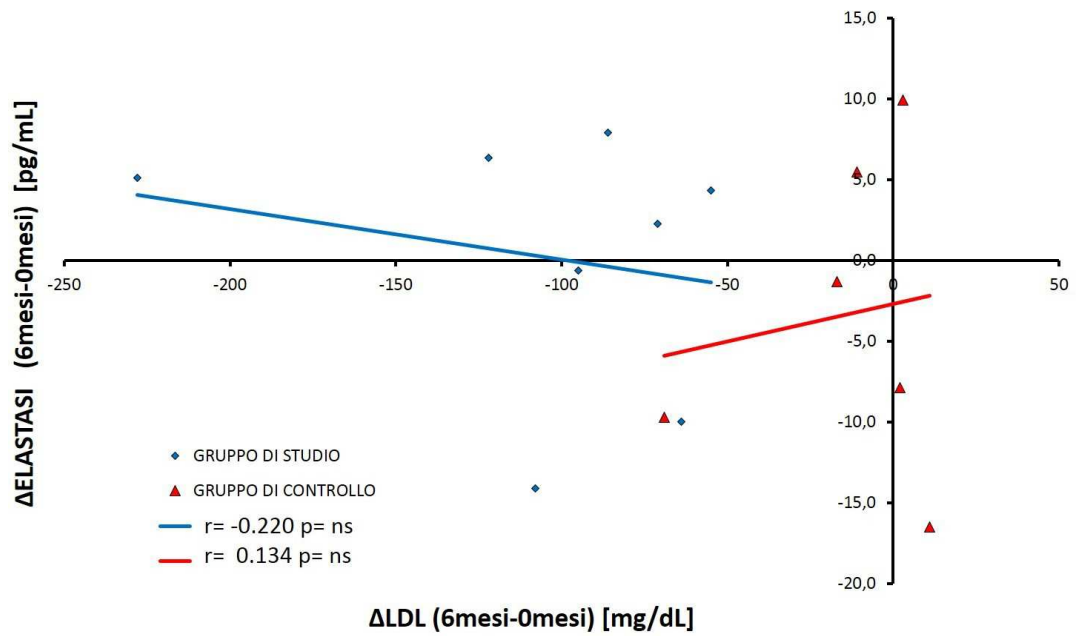
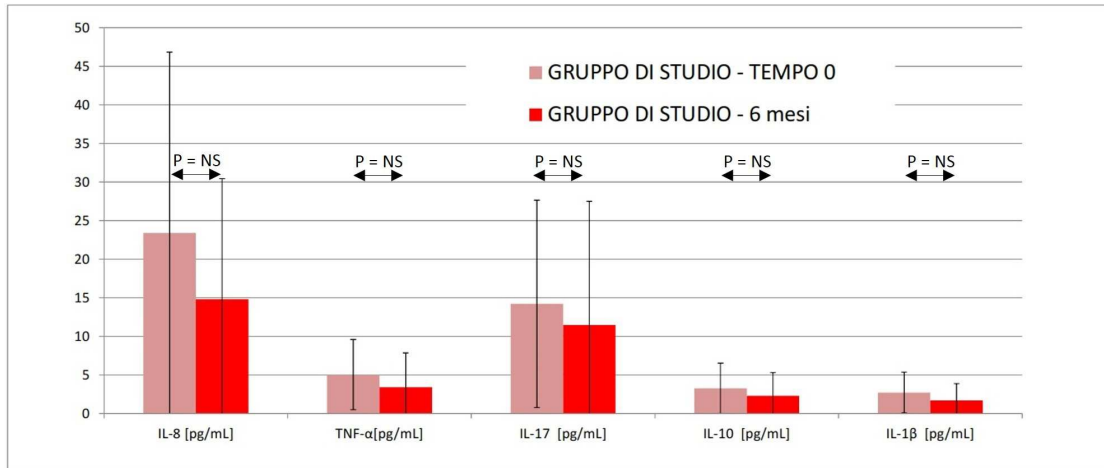


Figura 11: Correlazione tra la differenza a zero e a sei mesi della concentrazione di LDL con quella di elastasi dopo stimolazione con PMA in entrambi i gruppi di pazienti.



**Figura 12:** Variazione nel tempo della concentrazione di citochine sieriche a zero e sei mesi nel gruppo di pazienti in terapia con inibitori di PCSK9 e statina.



**Figura 13:** Variazione nel tempo della concentrazione di citochine sieriche a zero e sei mesi nel gruppo di pazienti in terapia con sola statina.

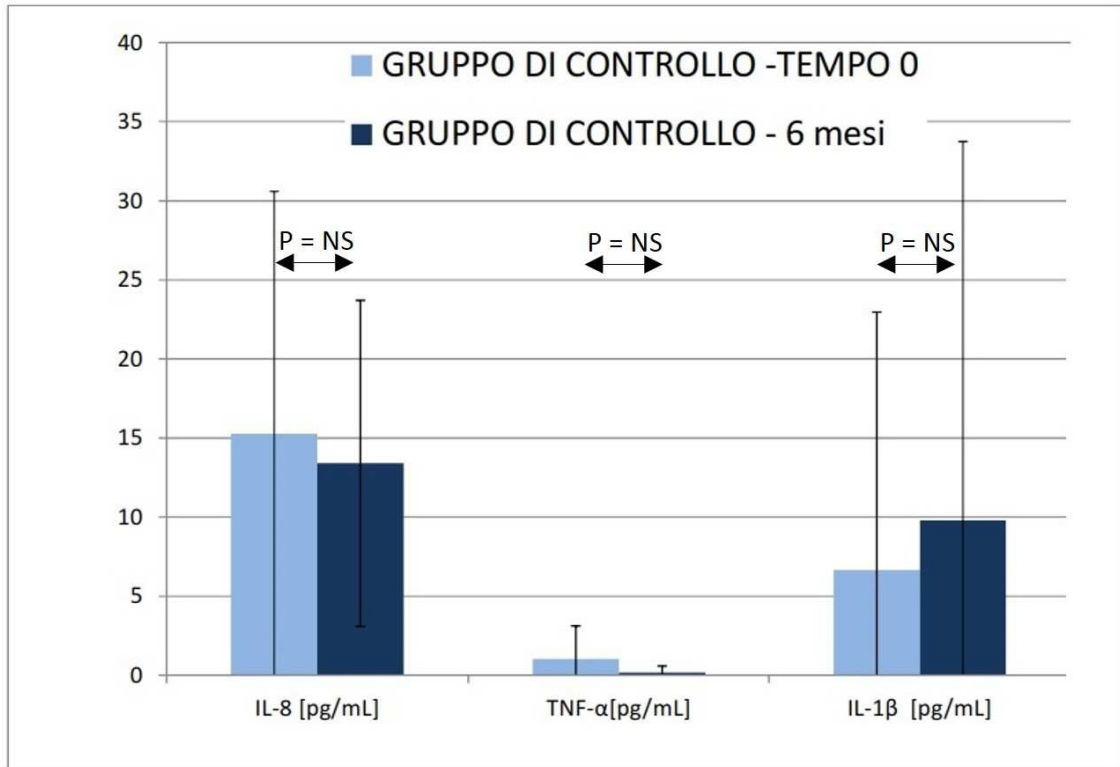


Figura 14: Confronto nel tempo della concentrazione di citochine sieriche a zero e sei mesi in entrambi i gruppi di pazienti.

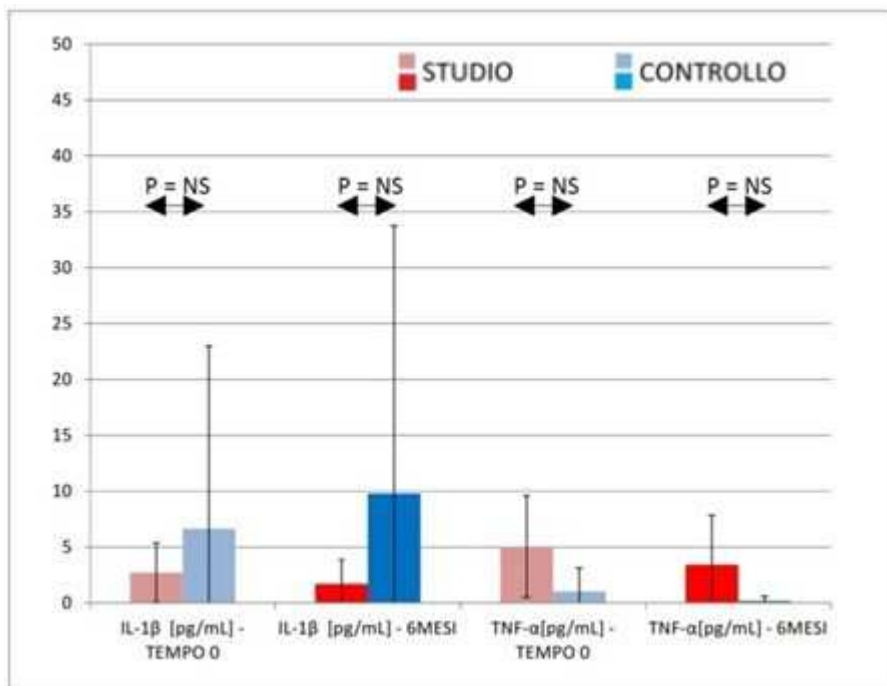
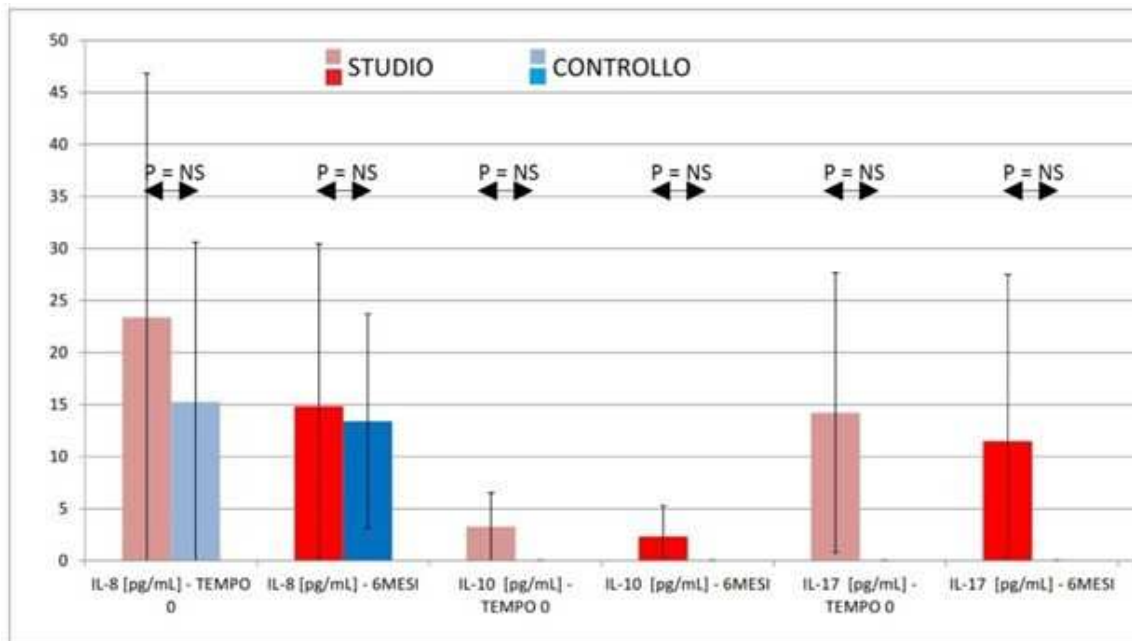




Figura 15: Correlazione tra la differenza a zero e a sei mesi della concentrazione di LDL con quella di IL-8 in entrambi i gruppi di pazienti.

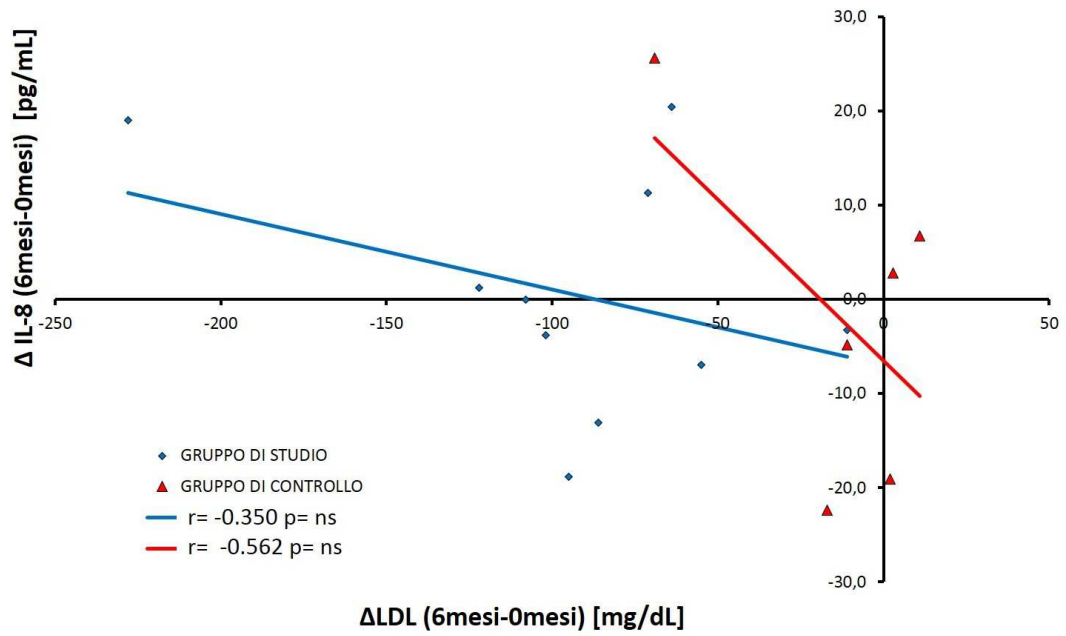


Figura 16: Correlazione tra la differenza a zero e a sei mesi della concentrazione di LDL con quella di TNF-alfa in entrambi i gruppi di pazienti.

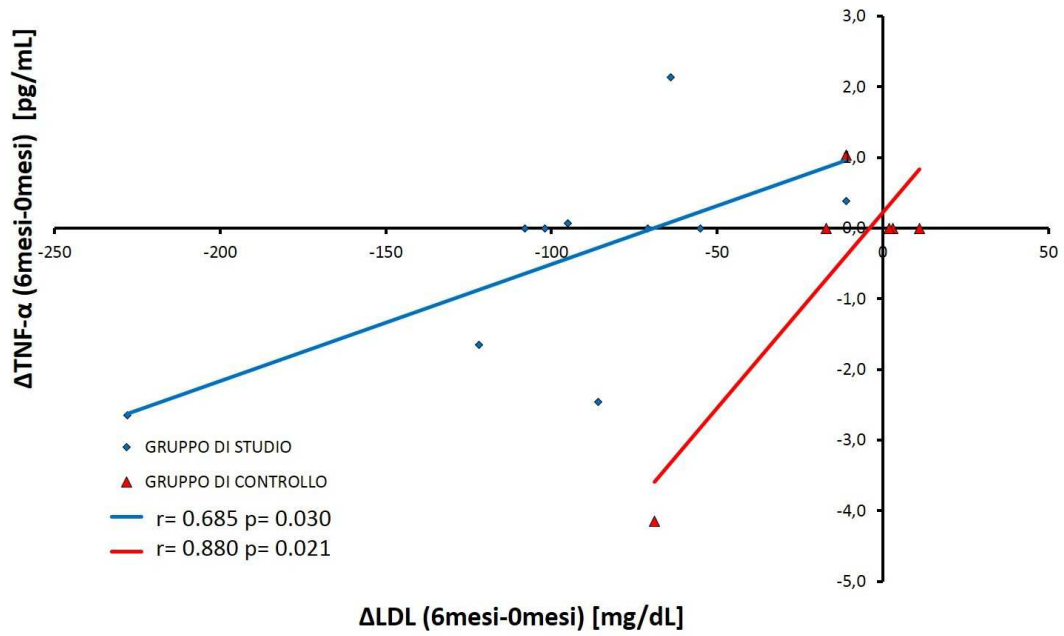


Figura 17: Correlazione tra la differenza a zero e a sei mesi della concentrazione di LDL con quella di IL-17 in entrambi i gruppi di pazienti.

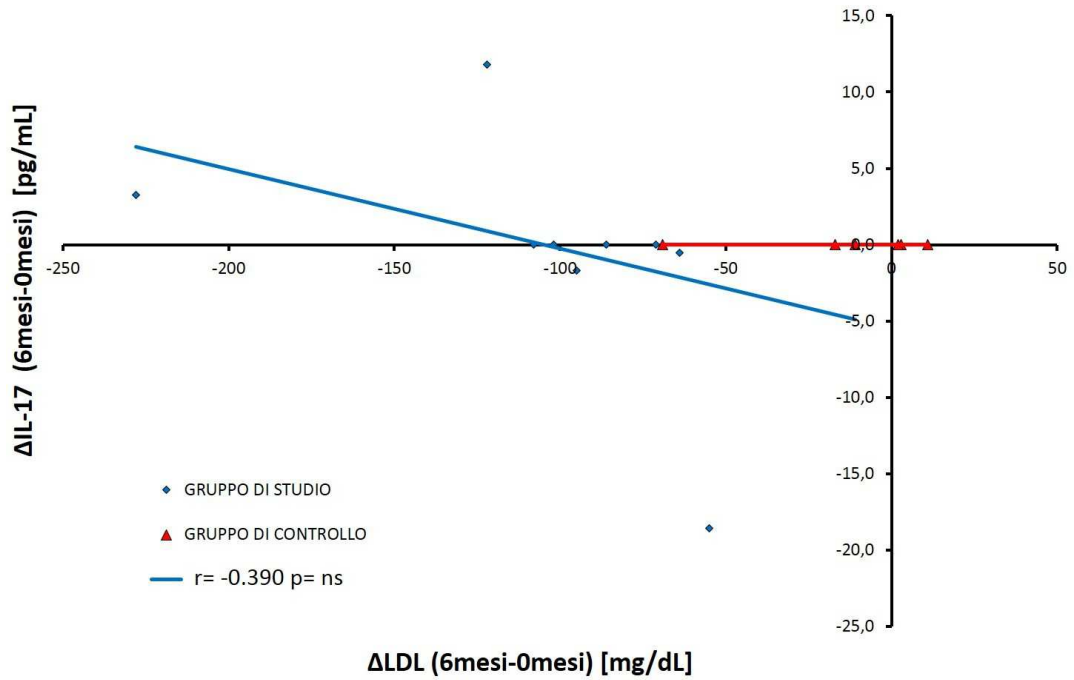
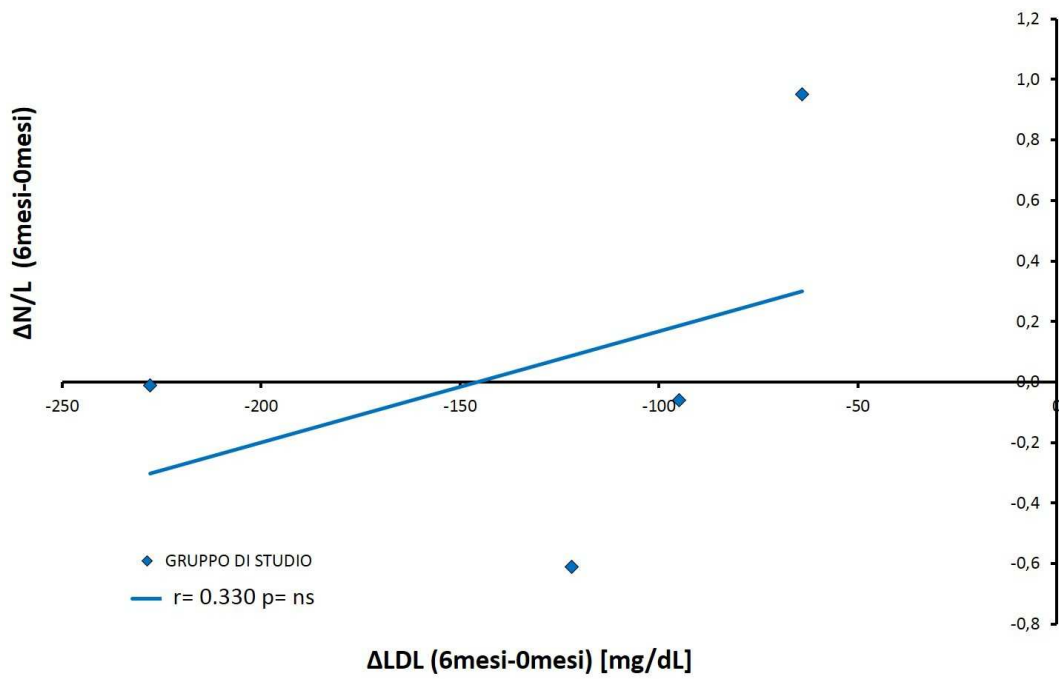


Figura 18: Correlazione tra la differenza a zero e a sei mesi della concentrazione di LDL con i valori di N/L ratio nel gruppo di pazienti di controllo.



### 3. Immagini

Immagine 1 (Infant Born with Intrauterine Growth Restriction: Renal and Cardiovascular follow-up)

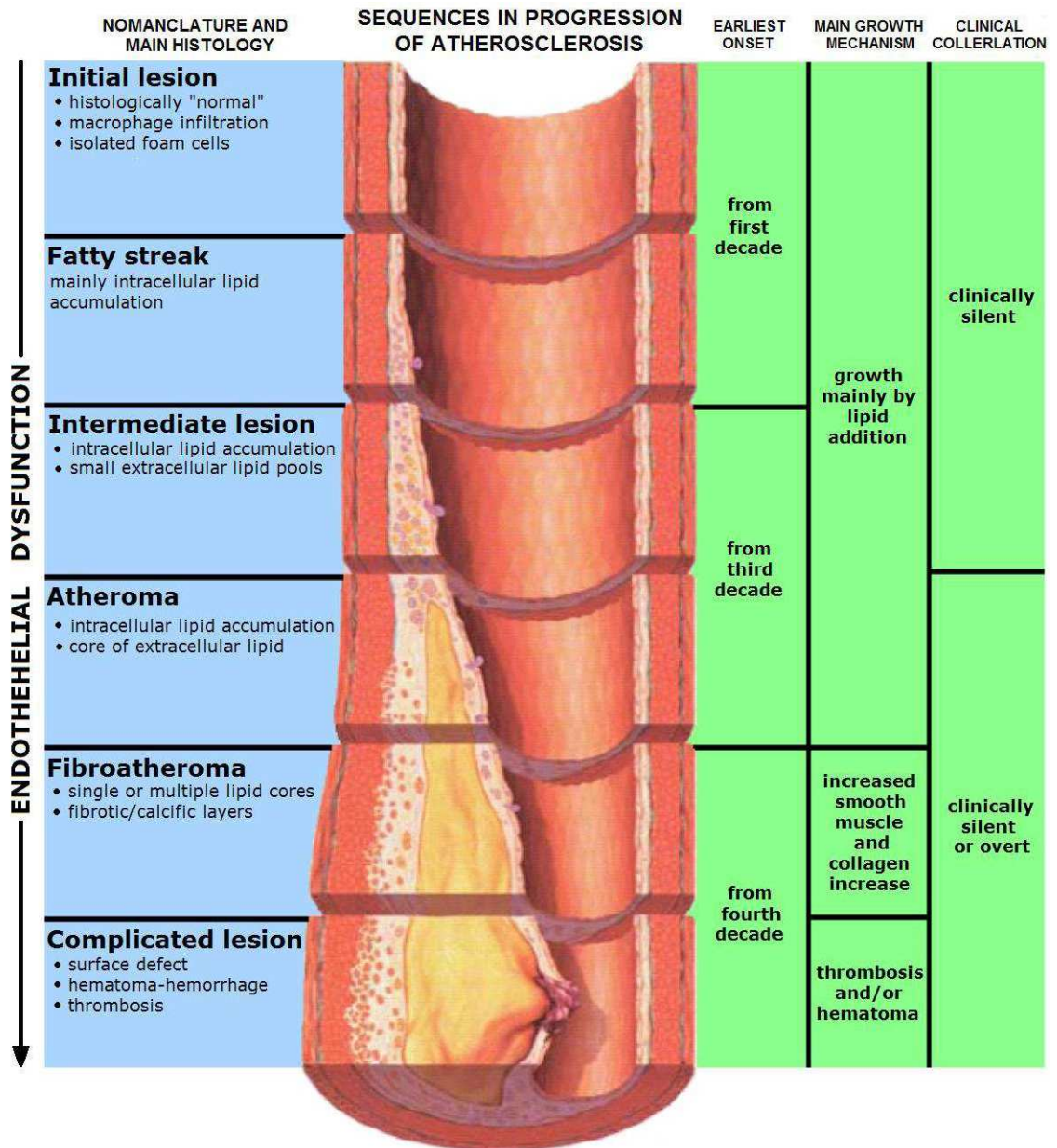


Immagine 2: Rischio stimato a 10 anni di malattia coronarica in una popolazione ipotetica di uomini e donne di 55 anni di età, in rapporto ai tradizionali fattori di rischio (iperlipidemia, ipertensione, fumo e diabete).

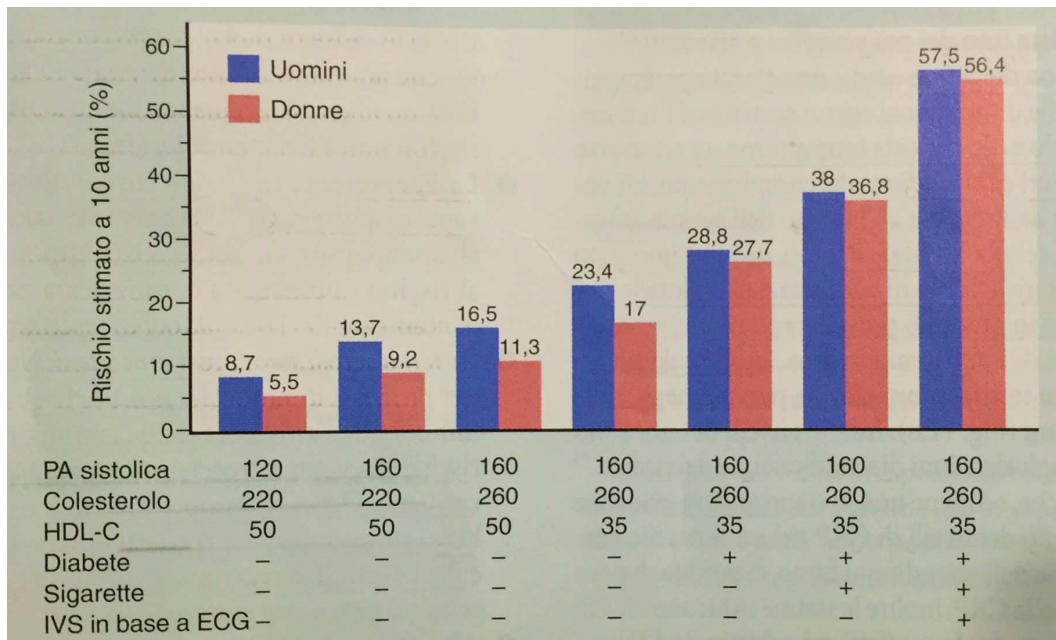


Immagine 3

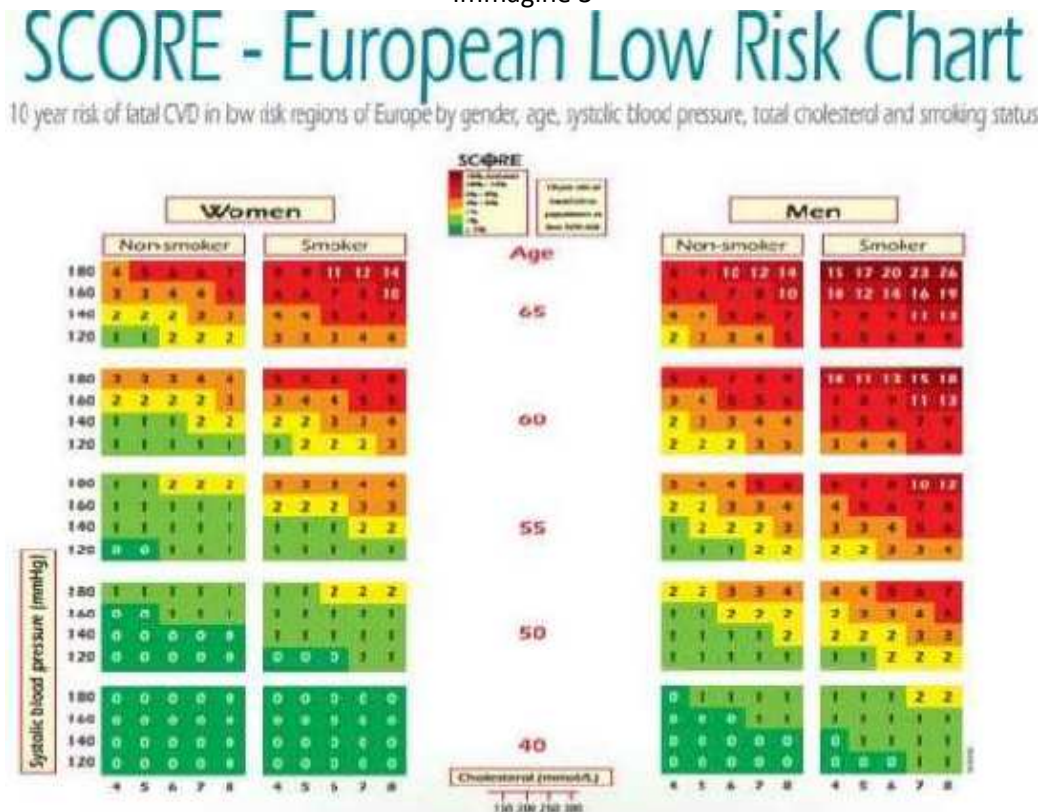


Immagine 4 (PCSK9: from the functional characterization to the therapeutic inhibition)

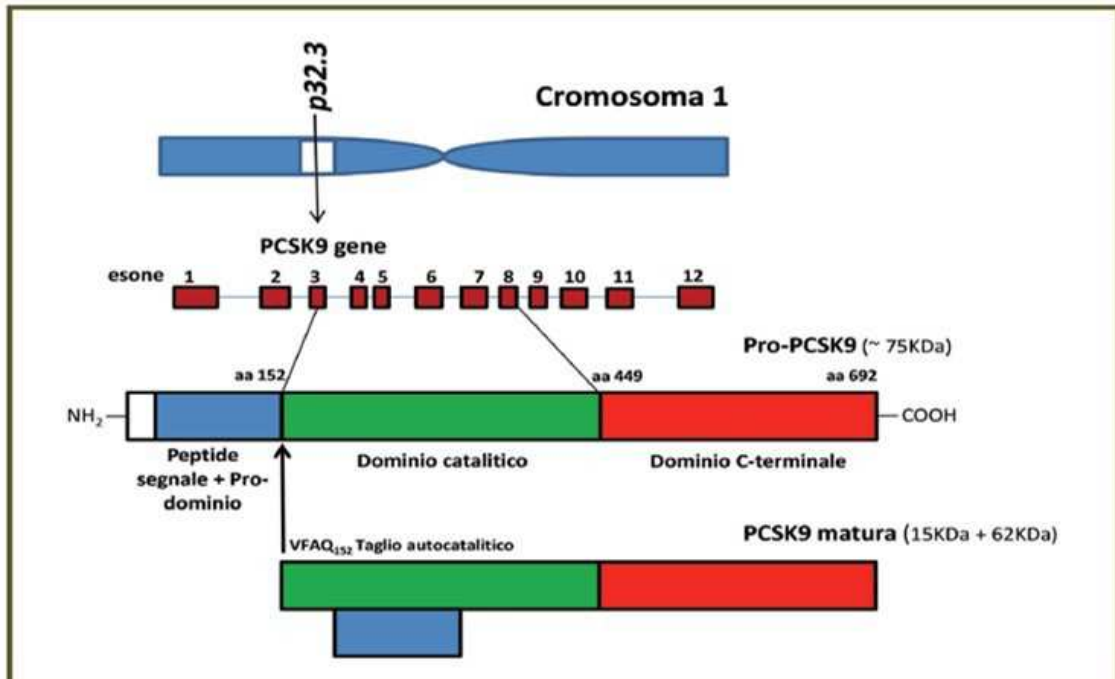


Immagine 5 (PCSK9: from the functional characterization to the therapeutic inhibition)

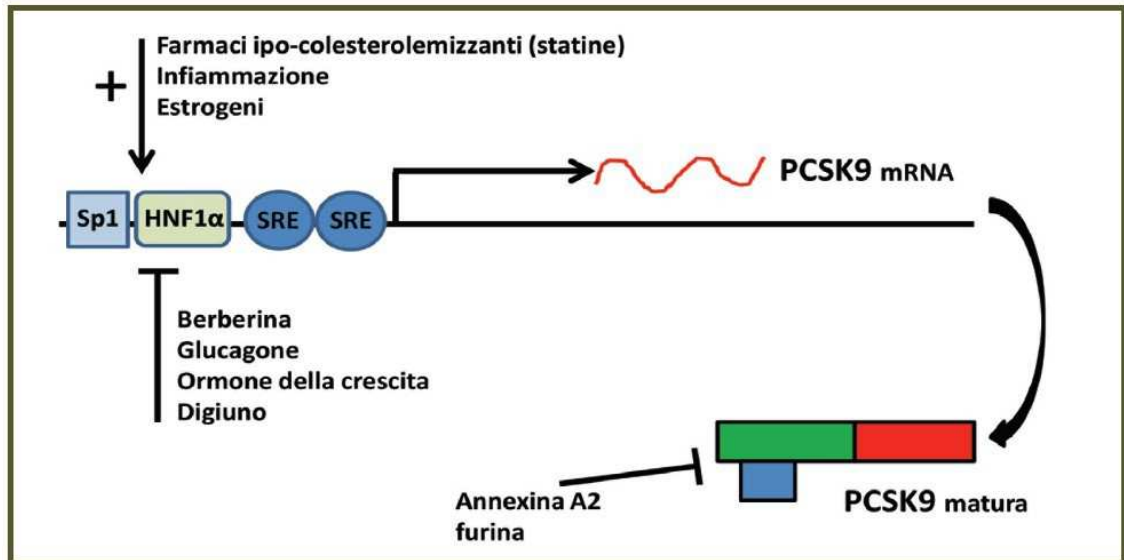




Immagine 6 (PCSK9: from the functional characterization to the therapeutic inhibition)

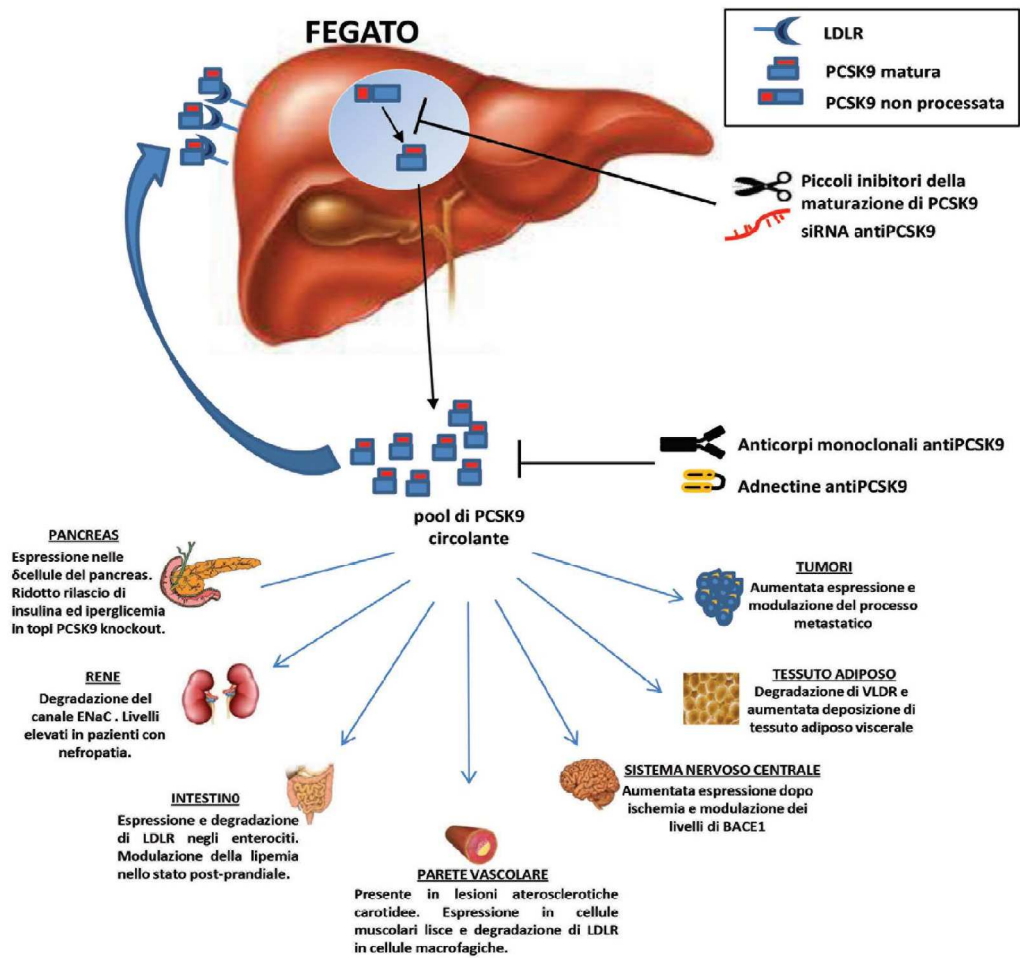


Immagine 7 (Neutrophil Extracellular Traps and Endothelial Dysfunction in Atherosclerosis and Thrombosis)

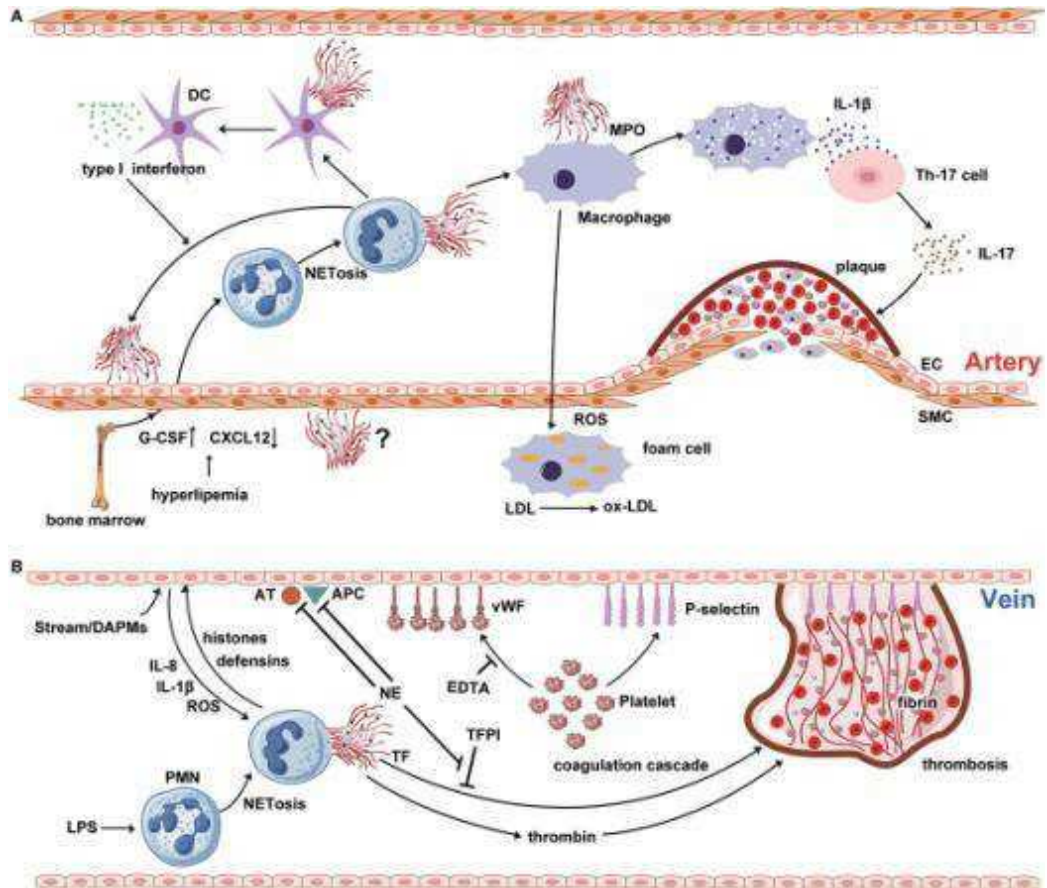


Immagine 8 (An exploratory look at NETosis in atherosclerosis)

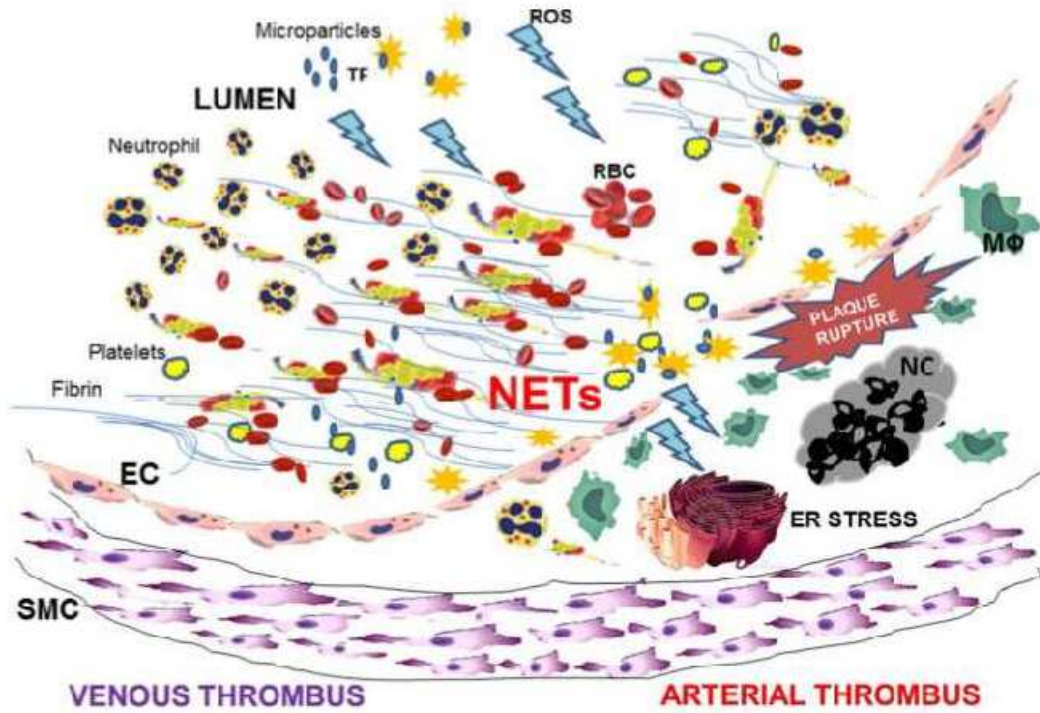


Immagine 9 (proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) inhibitors: Present perspectives and future horizons)

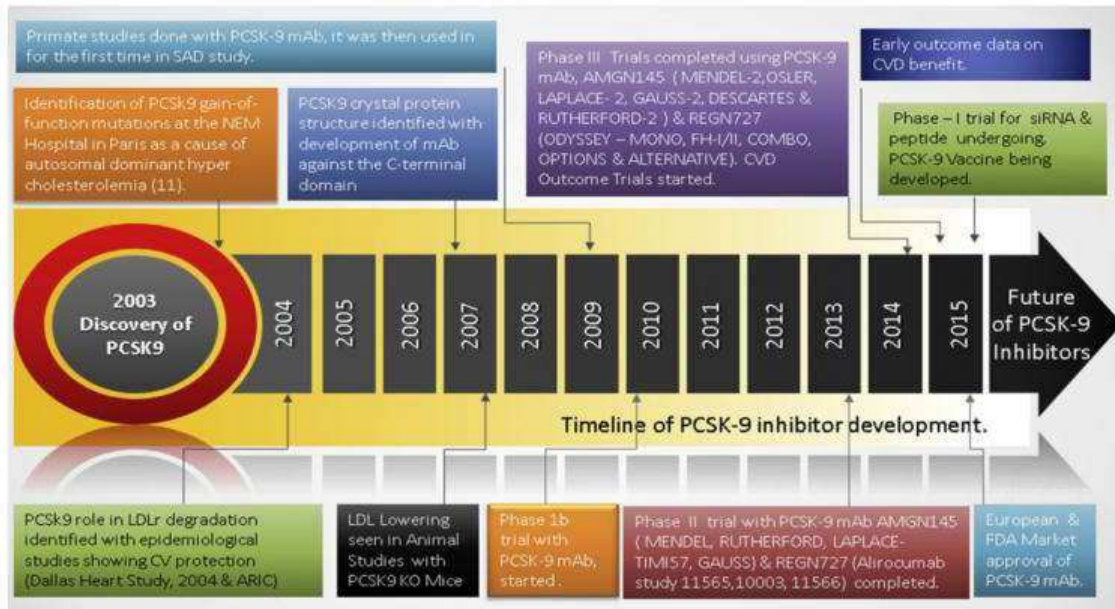


Immagine 10 (PCSK9: from the functional characterization to the therapeutic inhibition)

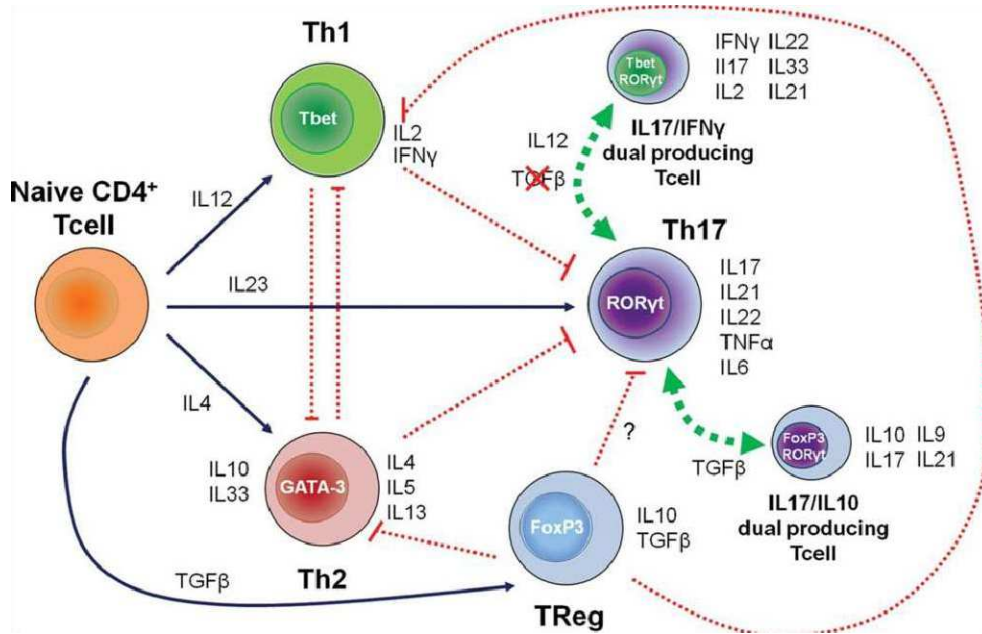
Tipologia di pazienti arruolati	Studio	Terapia ipolipidizzante	Dosi e durata del trattamento	Livelli di partenza di LDL-C (mg/dL)	Variazione (%) dei livelli di LDL-C
Pazienti con ipercolesterolemia (LDL-C 100-190mg/dL)	MENDEL <sup>*</sup>	nessuna	Da 70 a 480 mg s.c. ogni 2 o 4 settimane per 12 settimane	143	Da -41 a -51
Pazienti ad alto rischio cardiovascolare ed intolleranti alle statine	GAUSS <sup>*</sup>	+/- ezetimibe	Da 280 a 480 mg s.c. ogni 4 settimane per 12 settimane	193	Da -41 a -63
Pazienti con ipercolesterolemia LDL-C $\geq$ 100 mg/dL	NCT01288443 <sup>*</sup>	Statina	Da 50 a 300 mg s.c. ogni 2 o 4 settimane per 12 settimane	~125	Da -40 a -72
Pazienti con ADH eterozigoti	NCT01266876 <sup>*</sup>	Statina +/- ezetimibe	Da 150 a 300 mg s.c. ogni 2 o 4 settimane per 12 settimane	~152	Da -29 a -68
Pazienti con ADH eterozigoti	RUTHERFORD <sup>o</sup>	Statina +/- ezetimibe	da 350 a 480 mg s.c. ogni 4 settimane per 12 settimane	156	Da -43 a -55
Pazienti con ipercolesterolemia (LDL-C $\geq$ 85 mg/dL)	LAPLACE-TIMI 57 <sup>*</sup>	Statina	Da 70 a 480 mg s.c. ogni 2 o 4 settimane per 12 settimane	146	Da -42 a -66
Pazienti con ipercolesterolemia (LDL-C $\geq$ 80 mg/dL) In terapia con la massima dose tollerata di statina	NCT01342211 NCT01350141 §	Statina	Da 0.25 a 6 mg/kg i.v. ogni 4 settimane per 12 settimane	~122	Da -13 a -56

Immagine 11 (Invitrogen Insulin Human ELISA kit)





Immagine 12 (Naive CD4+T cells differentiate into distinct functional subsets)



## **BIBLIOGRAFIA**



1. Lusis, A. Atherosclerosis. *Nature* (2000). doi:10.1038/35025203.Atherosclerosis
2. Rafieian-Kopaei, M., Setorki, M., Doudi, M., Baradaran, A. & Nasri, H. Atherosclerosis: Process, indicators, risk factors and new hopes. *International Journal of Preventive Medicine* (2014).
3. Chambless, L. E. *et al.* Coronary heart disease risk prediction in the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *J. Clin. Epidemiol.* (2003). doi:10.1016/S0895-4356(03)00055-6
4. Longo D, Fauci A, Kasper D, Hauser S, Jamenson L, L. J. *Harrison Medicina Interna. Harrison Principios de medicina interna* (2012). doi:10.4321/S0212-71992005000300002
5. Ponikowski, P. *et al.* 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure. *European Heart Journal* (2016). doi:10.1093/eurheartj/ehw128
6. Seidah, N. G. *et al.* The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): Liver regeneration and neuronal differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (2003). doi:10.1073/pnas.0335507100
7. Cohen, J. *et al.* Low LDL cholesterol in individuals of African descent resulting from frequent nonsense mutations in PCSK9. *Nat. Genet.* (2005). doi:10.1038/ng1509
8. Zhao, Z. *et al.* Molecular Characterization of Loss-of-Function Mutations in PCSK9 and Identification of a Compound Heterozygote. *Am. J. Hum. Genet.* (2006). doi:10.1086/507488
9. Tibolla, G., Norata, G. D., Artali, R. & Catapano, A. L. PCSK9: dalla caratterizzazione funzionale all' inibizione terapeutica- PCSK9: From structure-function relation to therapeutic inhibition. *Giornale Italiano dell'arteriosclerosi* (2014); 5 (1):47-66
10. Fan, D. *et al.* Self-association of human PCSK9 correlates with its LDLR-degrading activity. *Biochemistry* (2008). doi:10.1021/bi7016359
11. Kosenko, T., Golder, M., Leblond, G., Weng, W. & Lagace, T. A. Low density lipoprotein binds to proprotein convertase subtilisin/kexin type-9 (PCSK9) in human plasma and inhibits PCSK9-mediated low density lipoprotein receptor degradation. *J. Biol. Chem.* (2013). doi:10.1074/jbc.M112.421370
12. Qian, Y.-W. *et al.* Secreted PCSK9 downregulates low density lipoprotein receptor through receptor-mediated endocytosis. *J. Lipid Res.* (2007). doi:10.1194/jlr.M700071-JLR200
13. Nassoury, N. *et al.* The cellular trafficking of the secretory proprotein convertase PCSK9 and its dependence on the LDLR. *Traffic* (2007). doi:10.1111/j.1600-0854.2007.00562.x
14. McNutt, M. C., Lagace, T. a & Horton, J. D. Catalytic activity is not required for secreted PCSK9 to reduce low density lipoprotein receptors in HepG2 cells. *J. Biol. Chem.* (2007). doi:10.1074/jbc.C700095200
15. Zhang, D. W. *et al.* Binding of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 to epidermal growth factor-like repeat A of low density lipoprotein receptor decreases receptor recycling and increases degradation. *J. Biol. Chem.* (2007). doi:10.1074/jbc.M702027200
16. Yamamoto, T., Lu, C. & Ryan, R. O. A two-step binding model of PCSK9 interaction with the low density lipoprotein receptor. *J. Biol. Chem.* (2011). doi:10.1074/jbc.M110.199042
17. Holla *et al.* Role of the C-terminal domain of PCSK9 in degradation of the LDL receptors. *J. Lipid Res.* (2011). doi:10.1194/jlr.M018093
18. Liu, M. *et al.* PCSK9 is not involved in the degradation of LDL receptors and BACE1 in the adult mouse brain. *J. Lipid Res.* (2010). doi:10.1194/jlr.M006635
19. Luo, Y. *et al.* Function and distribution of circulating human PCSK9 expressed

- extrahepatically in transgenic mice. *J. Lipid Res.* (2009). doi:10.1194/jlr.M800542-JLR200
20. Lambert, G. *et al.* Fasting induces hyperlipidemia in mice overexpressing proprotein convertase subtilisin kexin type 9: Lack of modulation of very-low-density lipoprotein hepatic output by the low-density lipoprotein receptor. *Endocrinology* (2006). doi:10.1210/en.2006-0098
  21. Sun, H. *et al.* Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 interacts with apolipoprotein B and prevents its intracellular degradation, irrespective of the low-density lipoprotein receptor. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* (2012). doi:10.1161/ATVBAHA.112.250043
  22. Huijgen, R. *et al.* Plasma PCSK9 levels and clinical outcomes in the TNT (Treating to New Targets) trial: A nested case-control study. *J. Am. Coll. Cardiol.* (2012). doi:10.1016/j.jacc.2011.12.043
  23. Persson, L. *et al.* Circulating proprotein convertase subtilisin kexin type 9 has a diurnal rhythm synchronous with cholesterol synthesis and is reduced by fasting in humans. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* (2010). doi:10.1161/ATVBAHA.110.214130
  24. Welder, G. *et al.* High-dose atorvastatin causes a rapid sustained increase in human serum PCSK9 and disrupts its correlation with LDL cholesterol. *J. Lipid Res.* (2010). doi:10.1194/jlr.M008144
  25. Browning, J. D. & Horton, J. D. Fasting reduces plasma proprotein convertase, subtilisin/kexin type 9 and cholesterol biosynthesis in humans. *J. Lipid Res.* (2010). doi:10.1194/jlr.P009860
  26. Ferri, N. *et al.* Proprotein convertase subtilisin kexin type 9 (PCSK9) secreted by cultured smooth muscle cells reduces macrophages LDLR levels. *Atherosclerosis* (2012). doi:10.1016/j.atherosclerosis.2011.11.026
  27. Lan, H. *et al.* Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) affects gene expression pathways beyond cholesterol metabolism in liver cells. *J. Cell. Physiol.* (2010). doi:10.1002/jcp.22130
  28. Kysenius, K., Muggalla, P., Mätlik, K., Arumäe, U. & Huttunen, H. J. PCSK9 regulates neuronal apoptosis by adjusting ApoER2 levels and signaling. *Cell. Mol. Life Sci.* (2012). doi:10.1007/s00018-012-0977-6
  29. Rousselet, E. *et al.* PCSK9 reduces the protein levels of the LDL receptor in mouse brain during development and after ischemic stroke. *J. Lipid Res.* (2011). doi:10.1194/jlr.M014118
  30. Le May, C. *et al.* Proprotein convertase subtilisin kexin type 9 null mice are protected from postprandial triglyceridemia. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* (2009). doi:10.1161/ATVBAHA.108.181586
  31. Langhi, C. *et al.* Activation of the farnesoid X receptor represses PCSK9 expression in human hepatocytes. *FEBS Lett.* (2008). doi:10.1016/j.febslet.2008.02.038
  32. Mbikay, M. *et al.* PCSK9-deficient mice exhibit impaired glucose tolerance and pancreatic islet abnormalities. *FEBS Lett.* (2010). doi:10.1016/j.febslet.2009.12.018
  33. Roubtsova, A. *et al.* Circulating proprotein convertase subtilisin/kexin 9 (PCSK9) regulates VLDLR protein and triglyceride accumulation in visceral adipose tissue. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* (2011). doi:10.1161/ATVBAHA.110.220988
  34. Sun, X. *et al.* Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 deficiency reduces melanoma metastasis in liver. *Neoplasia* (2012). doi:10.1593/neo.121252
  35. Weber, C., Zernecke, A. & Libby, P. The multifaceted contributions of leukocyte subsets to atherosclerosis: Lessons from mouse models. *Nature Reviews Immunology* (2008). doi:10.1038/nri2415
  36. Hansson, G. K. & Libby, P. The immune response in atherosclerosis: A double-edged sword. *Nature Reviews Immunology* (2006). doi:10.1038/nri1882

37. Libby, P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* (2002). doi:10.1038/nature01323
38. Blankenberg, S., Barbaux, S. & Tiret, L. Adhesion molecules and atherosclerosis. *Atherosclerosis* (2003). doi:10.1016/S0021-9150(03)00097-2
39. Congiu, T. *et al.* Scanning electron microscopy examination of endothelium morphology in human carotid plaques. *Micron* (2010). doi:10.1016/j.micron.2010.01.006
40. Gimbrone, M. A. Vascular Endothelium, Hemodynamic Forces, and Atherogenesis. *Am. J. Pathol.* (1999). doi:10.1016/S0002-9440(10)65090-0
41. Moore, K. J. & Freeman, M. W. Scavenger receptors in atherosclerosis: Beyond lipid uptake. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* (2006). doi:10.1161/01.ATV.0000229218.97976.43
42. Hansson, G. K. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N. Engl. J. Med.* (2005). doi:10.1056/NEJMra043430
43. Tacer, K. F., Kuzman, D., Seliskar, M., Pompon, D. & Rozman, D. TNF- $\alpha$  interferes with lipid homeostasis and activates acute and proatherogenic processes. *Physiol. Genomics* (2007). doi:10.1152/physiolgenomics.00264.2006
44. Kölliker Frers, R. A. *et al.* Psoriasis and cardiovascular risk: Immune-mediated crosstalk between metabolic, vascular and autoimmune inflammation. *IJC Metabolic and Endocrine* (2015). doi:10.1016/j.ijcme.2015.01.005
45. Fenyo, I. M. & Gafencu, A. V. The involvement of the monocytes/macrophages in chronic inflammation associated with atherosclerosis. *Immunobiology* (2013). doi:10.1016/j.imbio.2013.06.005
46. Mestas, J. & Ley, K. Monocyte-Endothelial Cell Interactions in the Development of Atherosclerosis. *Trends in Cardiovascular Medicine* (2008). doi:10.1016/j.tcm.2008.11.004
47. Ridker, P. M. C-Reactive Protein and the Prediction of Cardiovascular Events Among Those at Intermediate Risk. Moving an Inflammatory Hypothesis Toward Consensus. *Journal of the American College of Cardiology* (2007). doi:10.1016/j.jacc.2007.02.052
48. Ridker, P. M., Buring, J. E., Rifai, N. & Cook, N. R. Development and validation of improved algorithms for the assessment of global cardiovascular risk in women: The Reynolds Risk Score. *J. Am. Med. Assoc.* (2007). doi:10.1001/jama.297.6.611
49. Ridker, P. M. & Cook, N. Clinical Usefulness of Very High and Very Low Levels of C-Reactive Protein Across the Full Range of Framingham Risk Scores. *Circulation* (2004). doi:10.1161/01.CIR.0000125690.80303.A8
50. Marino, F. *et al.* Production of IL-8, VEGF and elastase by circulating and intraplaque neutrophils in patients with carotid atherosclerosis. *PLoS One* (2015). doi:10.1371/journal.pone.0124565
51. Döring, Y., Drechsler, M., Soehnlein, O. & Weber, C. Neutrophils in atherosclerosis: From mice to man. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* (2015). doi:10.1161/ATVBAHA.114.303564
52. Urban, C. F. *et al.* Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. *PLoS Pathog.* (2009). doi:10.1371/journal.ppat.1000639
53. Kraemer, B. F. *et al.* Novel anti-bacterial activities of  $\beta$ -defensin 1 in human platelets: Suppression of pathogen growth and signaling of neutrophil extracellular trap formation. *PLoS Pathog.* (2011). doi:10.1371/journal.ppat.1002355
54. Jenne, C. N. & Kubes, P. Virus-Induced NETs – Critical Component of Host Defense or Pathogenic Mediator? *PLoS Pathog.* (2015). doi:10.1371/journal.ppat.1004546
55. Brinkmann, V. *et al.* Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Science (80- )*. (2004). doi:10.1126/science.1092385
56. Lögters, T. *et al.* The clinical value of neutrophil extracellular traps. *Medical*

- Microbiology and Immunology* (2009). doi:10.1007/s00430-009-0121-x
57. Ortmann, W. & Kolaczowska, E. Age is the work of art? Impact of neutrophil and organism age on neutrophil extracellular trap formation. *Cell and Tissue Research* (2018). doi:10.1007/s00441-017-2751-4
  58. Kenny, E. F. *et al.* Diverse stimuli engage different neutrophil extracellular trap pathways. *Elife* (2017). doi:10.7554/eLife.24437
  59. Shimomura, Y. *et al.* Recombinant human thrombomodulin inhibits neutrophil extracellular trap formation in vitro. *Journal of Intensive Care* (2016). doi:10.1186/s40560-016-0177-9
  60. Yipp, B. G. & Kubes, P. NETosis: How vital is it? *Blood* (2013). doi:10.1182/blood-2013-04-457671
  61. Döring, Y., Soehnlein, O. & Weber, C. Neutrophil extracellular traps in atherosclerosis and atherothrombosis. *Circulation Research* (2017). doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.309692
  62. Fuchs, T. A. *et al.* Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J. Cell Biol.* (2007). doi:10.1083/jcb.200606027
  63. Papayannopoulos, V., Metzler, K. D., Hakkim, A. & Zychlinsky, A. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *J. Cell Biol.* (2010). doi:10.1083/jcb.201006052
  64. Dąbrowska, D., Jabłońska, E., Garley, M., Sawicka-Powierza, J. & Nowak, K. The Phenomenon of Neutrophil Extracellular Traps in Vascular Diseases. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* (2018). doi:10.1007/s00005-018-0505-y
  65. Nel, J. G. *et al.* Neutrophil extracellular traps and their role in health and disease. *South African Journal of Science* (2016). doi:10.17159/sajs.2016/20150072
  66. Pinegin, B., Vorobjeva, N. & Pinegin, V. Neutrophil extracellular traps and their role in the development of chronic inflammation and autoimmunity. *Autoimmunity Reviews* (2015). doi:10.1016/j.autrev.2015.03.002
  67. Döring, Y. *et al.* Auto-antigenic protein-DNA complexes stimulate plasmacytoid dendritic cells to promote atherosclerosis. *Circulation* (2012). doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.111.046755
  68. Borissoff, J. I. *et al.* Elevated levels of circulating DNA and chromatin are independently associated with severe coronary atherosclerosis and a prothrombotic state. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* (2013). doi:10.1161/ATVBAHA.113.301627
  69. Markey PM, Racine SE, Markey CN, *et al.* NETs induce endothelial dysfunction. (2015).
  70. Warnatsch, A., Ioannou, M., Wang, Q. & Papayannopoulos, V. Neutrophil extracellular traps license macrophages for cytokine production in atherosclerosis. *Science* (80-. ). (2015). doi:10.1126/science.aaa8064
  71. Qi H, Yang S, Z. L. Neutrophil Extracellular Traps and Endothelial Dysfunction in Atherosclerosis and Thrombosis. (2017).
  72. Rada, B. Neutrophil Extracellular Traps and Microcrystals. *Journal of Immunology Research* (2017). doi:10.1155/2017/2896380
  73. Nakazawa, D. *et al.* The responses of macrophages in interaction with neutrophils that undergo NETosis. *J. Autoimmun.* (2016). doi:10.1016/j.jaut.2015.08.018
  74. Greenwood, H. *et al.* Simvastatin to modify neutrophil function in older patients with septic pneumonia (SNOOPI): Study protocol for a randomised placebo-controlled trial. *Trials* (2014). doi:10.1186/1745-6215-15-332
  75. Fuchs, T. A. *et al.* Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (2010). doi:10.1073/pnas.1005743107
  76. Savchenko, A. S. *et al.* Neutrophil extracellular traps form predominantly during the organizing stage of human venous thromboembolism development. *J. Thromb.*

- Haemost.* (2014). doi:10.1111/jth.12571
77. Prandoni, P. *et al.* An Association between Atherosclerosis and Venous Thrombosis. *N. Engl. J. Med.* (2003). doi:10.1056/NEJMoa022157
  78. Schulman, S. *et al.* Post-thrombotic syndrome, recurrence, and death 10 years after the first episode of venous thromboembolism treated with warfarin for 6 weeks or 6 months. *J. Thromb. Haemost.* (2006). doi:10.1111/j.1538-7836.2006.01795.x
  79. Lowe, G. D. O. Common risk factors for both arterial and venous thrombosis. *British Journal of Haematology* (2008). doi:10.1111/j.1365-2141.2007.06973.x
  80. Saha, P. *et al.* Leukocytes and the natural history of deep vein thrombosis: Current concepts and future directions. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* (2011). doi:10.1161/ATVBAHA.110.213405
  81. Brill, A. *et al.* Neutrophil extracellular traps promote deep vein thrombosis in mice. *J. Thromb. Haemost.* (2012). doi:10.1111/j.1538-7836.2011.04544.x
  82. Gupta, A. K. *et al.* Activated endothelial cells induce neutrophil extracellular traps and are susceptible to NETosis-mediated cell death. *FEBS Lett.* (2010). doi:10.1016/j.febslet.2010.06.006
  83. Massberg, S. *et al.* Reciprocal coupling of coagulation and innate immunity via neutrophil serine proteases. *Nat. Med.* (2010). doi:10.1038/nm.2184
  84. de Boer, O. J. *et al.* Neutrophils, neutrophil extracellular traps and interleukin-17 associate with the organisation of thrombi in acute myocardial infarction. *Thromb. Haemost.* (2013). doi:10.1160/TH12-06-0425
  85. Mozzini, C., Garbin, U., Fratta Pasini, A. M. & Cominacini, L. An exploratory look at NETosis in atherosclerosis. *Internal and Emergency Medicine* (2017). doi:10.1007/s11739-016-1543-2
  86. Döring, Y., Weber, C. & Soehnlein, O. Footprints of neutrophil extracellular traps as predictors of cardiovascular risk. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* (2013). doi:10.1161/ATVBAHA.113.301889
  87. Rossi, C. *Farmacologia.*
  88. Lazzarin A. *Medicina interna sistemica, VII edizione, Edra Masson.* (2015).
  89. Shepherd, J. *et al.* Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. 1995. *Atheroscler. Suppl.* (2004). doi:10.1016/j.atherosclerosissup.2004.08.029
  90. The lipid study group. Prevention of cardiovascular events and death with pravastatin in patients with coronary heart disease and a broad range of initial cholesterol levels. *N Engl J Med.* 339 (19):1349-1357. doi:10.1056/NEJM19981105339190 (1998).
  91. Ascer E, Bertolami MC, Venturinelli ML, *et al.* Atorvastatin reduces proinflammatory markers in hypercholesterolemic patients. *Atherosclerosis* 177(1):161-166. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2004 (2004).
  92. Antoniadou, C. *et al.* Rapid, direct effects of statin treatment on arterial redox state and nitric oxide bioavailability in human atherosclerosis via tetrahydrobiopterin-mediated endothelial nitric oxide synthase coupling. *Circulation* (2011). doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.110.985150
  93. Schonbeck, U. Inflammation, Immunity, and HMG-CoA Reductase Inhibitors: Statins as Antiinflammatory Agents? *Circulation* (2004). doi:10.1161/01.CIR.0000129505.34151.23
  94. Wolfrum, S., Jensen, K. S. & Liao, J. K. Endothelium-dependent effects of statins. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* (2003). doi:10.1161/01.ATV.0000063385.12476.A7
  95. Lu, T. M. *et al.* Effect of Rosuvastatin on plasma levels of asymmetric dimethylarginine in patients with hypercholesterolemia. *Am. J. Cardiol.* (2004).

- doi:10.1016/j.amjcard.2004.03.052
96. Takeuchi, S. *et al.* Cerivastatin suppresses lipopolysaccharide-induced ICAM-1 expression through inhibition of Rho GTPase in BAEC. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2000). doi:10.1006/bbrc.2000.2238
  97. Massaro, M. *et al.* Statins inhibit cyclooxygenase-2 and matrix metalloproteinase-9 in human endothelial cells: Anti-angiogenic actions possibly contributing to plaque stability. *Cardiovasc. Res.* (2010). doi:10.1093/cvr/cvp375
  98. Rupérez, M. *et al.* HMG-CoA reductase inhibitors decrease angiotensin II-induced vascular fibrosis: Role of RhoA/ROCK and MAPK pathways. *Hypertension* (2007). doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.091264
  99. Cheng, S. M. *et al.* Modulation of human T cells signaling transduction by lovastatin. *Int. J. Cardiol.* (2010). doi:10.1016/j.ijcard.2008.10.044
  100. Reedquist, K. A., Pope, T. K. & Roess, D. A. Lovastatin inhibits proliferation and differentiation and causes apoptosis in lipopolysaccharide-stimulated murine B cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1995). doi:10.1006/bbrc.1995.1863
  101. Rezaie-Majd, A. *et al.* Simvastatin reduces expression of cytokines interleukin-6, interleukin-8, and monocyte chemoattractant protein-1 in circulating monocytes from hypercholesterolemic patients. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* (2002). doi:10.1161/01.ATV.0000022694.16328.CC
  102. Mosheimer, B. a *et al.* CD40-ligand-dependent induction of COX-2 gene expression in endothelial cells by activated platelets: inhibitory effects of atorvastatin. *Blood Coagul. Fibrinolysis* (2005).
  103. Albert, M. A., Danielson, E., Rifai, N. & Ridker, P. M. Effect of statin therapy on C-reactive protein levels: The pravastatin inflammation/CRP evaluation (PRINCE): A randomized trial and cohort study. *J. Am. Med. Assoc.* (2001). doi:10.1001/jama.286.1.64
  104. Makris, G. C., Geroulakos, G., Makris, M. C., Mikhailidis, D. P. & Falagas, M. E. The pleiotropic effects of statins and omega-3 fatty acids against sepsis: a new perspective. *Expert Opin. Investig. Drugs* (2010). doi:10.1517/13543784.2010.490830
  105. Janda, S., Young, A., FitzGerald, J. M., Etmnan, M. & Swiston, J. The effect of statins on mortality from severe infections and sepsis: A systematic review and meta-analysis. *J. Crit. Care* (2010). doi:10.1016/j.jcrc.2010.02.013
  106. Patel, J. M. *et al.* Randomized double-blind placebo-controlled trial of 40 mg/day of atorvastatin in reducing the severity of sepsis in ward patients (ASEPSIS Trial). *Crit. Care* (2012). doi:10.1186/cc11895
  107. Kruger, P., Fitzsimmons, K., Cook, D., Jones, M. & Nimmo, G. Statin therapy is associated with fewer deaths in patients with bacteraemia. *Intensive Care Med.* (2006). doi:10.1007/s00134-005-2859-y
  108. Thomsen, R. W. *et al.* Preadmission use of statins and outcomes after hospitalization with pneumonia population-based cohort study of 29 900 patients. *Arch. Intern. Med.* (2008). doi:10.1001/archinte.168.19.2081
  109. Almog, Y. *et al.* The effect of statin therapy on infection-related mortality in patients with atherosclerotic diseases. *Crit. Care Med.* (2007). doi:10.1097/01.CCM.0000253397.42079.D5
  110. Chow, O. A. *et al.* Statins enhance formation of phagocyte extracellular traps. *Cell Host Microbe* (2010). doi:10.1016/j.chom.2010.10.005
  111. Graham, M. J. *et al.* Antisense inhibition of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 reduces serum LDL in hyperlipidemic mice. *J. Lipid Res.* (2007). doi:10.1194/jlr.C600025-JLR200
  112. Lindholm, M. W. *et al.* PCSK9 LNA antisense oligonucleotides induce sustained

- reduction of LDL cholesterol in nonhuman primates. *Mol. Ther.* (2012). doi:10.1038/mt.2011.260
113. Duff, C. J. *et al.* Antibody-mediated disruption of the interaction between PCSK9 and the low-density lipoprotein receptor. *Biochem. J.* (2009). doi:10.1042/BJ20082407
114. Chan, J. C. Y. *et al.* A proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 neutralizing antibody reduces serum cholesterol in mice and nonhuman primates. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (2009). doi:10.1073/pnas.0903849106
115. Stein, E. A. *et al.* Effect of a monoclonal antibody to PCSK9 on LDL cholesterol. *Obstetrical and Gynecological Survey* (2012). doi:10.1097/01.ogx.0000418576.52268.43
116. McKenney, J. M. *et al.* Safety and efficacy of a monoclonal antibody to proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 serine protease, SAR236553/REGN727, in patients with primary hypercholesterolemia receiving ongoing stable atorvastatin therapy. *J. Am. Coll. Cardiol.* (2012). doi:10.1016/j.jacc.2012.03.007
117. Dias, C. S. *et al.* Effects of AMG 145 on low-density lipoprotein cholesterol levels: Results from 2 randomized, double-blind, placebo-controlled, ascending-dose phase 1 studies in healthy volunteers and hypercholesterolemic subjects on statins. *J. Am. Coll. Cardiol.* (2012). doi:10.1016/j.apsusc.2016.09.002
118. Roth, E. M., McKenney, J. M., Hanotin, C., Asset, G. & Stein, E. A. Atorvastatin with or without an Antibody to PCSK9 in Primary Hypercholesterolemia. *N. Engl. J. Med.* (2012). doi:10.1056/NEJMoa1201832
119. Giugliano, R. P. *et al.* LAPLACE-TIMI 57 primary results. *Circulation* (2012). doi:http://dx.doi.org/10.1161/CIR.0b013e318278c90d
120. Sullivan, D. *et al.* Effect of a monoclonal antibody to PCSK9 on low-density lipoprotein cholesterol levels in statin-intolerant patients: The GAUSS randomized trial. *JAMA - J. Am. Med. Assoc.* (2012). doi:10.1001/jama.2012.25790
121. Koren, M. J. *et al.* Efficacy and safety of longer-term administration of evolocumab (AMG 145) in patients with hypercholesterolemia: 52-week results from the open-label study of long-term evaluation against LDL-C (OSLER) randomized trial. *Circulation* (2014). doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.113.007012
122. Kereiakes, D. J. *et al.* Efficacy and safety of the proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 inhibitor alirocumab among high cardiovascular risk patients on maximally tolerated statin therapy: The ODYSSEY COMBO i study. *Am. Heart J.* (2015). doi:10.1016/j.ahj.2015.03.004
123. Libby, P., Ridker, P. M. & Hansson, G. K. Inflammation in Atherosclerosis. From Pathophysiology to Practice. *Journal of the American College of Cardiology* (2009). doi:10.1016/j.jacc.2009.09.009
124. Soehnlein, O. Multiple roles for neutrophils in atherosclerosis. *Circulation Research* (2012). doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.257535
125. Saffarzadeh, M. *et al.* Neutrophil extracellular traps directly induce epithelial and endothelial cell death: A predominant role of histones. *PLoS One* (2012). doi:10.1371/journal.pone.0032366
126. Antonopoulos, A., Margaritis, M., Lee, R., Channon, K. & Antoniades, C. Statins as anti-inflammatory agents in atherogenesis: molecular mechanisms and lessons from the recent clinical trials. *Curr. Pharm. Des.* (2012). doi:10.2174/138161212799504803
127. Marino, F. *et al.* Simvastatin down-regulates the production of Interleukin-8 by neutrophil leukocytes from dyslipidemic patients. *BMC Cardiovasc. Disord.* (2014). doi:10.1186/1471-2261-14-37
128. Sahebkar, A. *et al.* Effect of monoclonal antibodies to PCSK9 on high-sensitivity C-reactive protein levels: A meta-analysis of 16 randomized controlled treatment arms. *Br. J. Clin. Pharmacol.* (2016). doi:10.1111/bcp.12905

- 
129. Alexander, M. R. *et al.* Genetic inactivation of IL-1 signaling enhances atherosclerotic plaque instability and reduces outward vessel remodeling in advanced atherosclerosis in mice. *J. Clin. Invest.* (2012). doi:10.1172/JCI43713
  130. Ray, K. K. Interleukin-1 revisited: Further insights into its role in atherosclerosis and as a potential therapeutic target for treatment. *Journal of the American College of Cardiology* (2014). doi:10.1016/j.jacc.2014.01.021
  131. Ridker, P. M. Moving beyond JUPITER: Will inhibiting inflammation reduce vascular event rates? *Curr. Atheroscler. Rep.* (2013). doi:10.1007/s11883-012-0295-3
  132. Karakas, M., Haase, T. & Zeller, T. Linking the sympathetic nervous system to the inflammasome: Towards new therapeutics for atherosclerotic cardiovascular disease. *European Heart Journal* (2018). doi:10.1093/eurheartj/ehx374
  133. Liuzzo, G., Trotta, F. & Pedicino, D. Interleukin-17 in atherosclerosis and cardiovascular disease: The good, the bad, and the unknown. *European Heart Journal* (2013). doi:10.1093/eurheartj/ehs399
  134. Zhang, X., Jin, J., Peng, X., Ramgolam, V. S. & Markovic-Plese, S. Simvastatin Inhibits IL-17 Secretion by Targeting Multiple IL-17-Regulatory Cytokines and by Inhibiting the Expression of IL-17 Transcription Factor RORC in CD4+ Lymphocytes. *J. Immunol.* (2008). doi:10.4049/jimmunol.180.10.6988
  135. Wang, F. *et al.* Interferon regulator factor 1/retinoic inducible gene i (IRF1/RIG-I) axis mediates 25-hydroxycholesterol-induced interleukin-8 production in atherosclerosis. *Cardiovasc. Res.* (2012). doi:10.1093/cvr/cvr260
  136. Feingold, K. R., Serio, K. M., Adi, S., Moser, A. H. & Grunfeld, C. Tumor necrosis factor stimulates hepatic lipid synthesis and secretion. *Endocrinology* (1989). doi:10.1210/endo-124-5-2336
  137. Schreyer, S. A., Peschon, J. J. & LeBoeuf, R. C. Accelerated atherosclerosis in mice lacking tumor necrosis factor receptor p55. *J. Biol. Chem.* (1996). doi:10.1074/jbc.271.42.26174
  138. Turner, N. A. *et al.* Simvastatin inhibits TNF $\alpha$ -induced invasion of human cardiac myofibroblasts via both MMP-9-dependent and -independent mechanisms. *J. Mol. Cell. Cardiol.* (2007). doi:10.1016/j.yjmcc.2007.05.006
  139. Mallat, Z. *et al.* Protective Role of Interleukin-10 in Atherosclerosis. *Circ. Res.* (1999). doi:10.1161/01.RES.85.8.e17



