

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELL'INSUBRIA - VARESE**

Facoltà di Medicina e Chirurgia

Scuola di Dottorato in Scienze Biologiche e Mediche

Dottorato di Ricerca XXV ciclo in

“Chirurgia e Biotecnologie Chirurgiche”

Coordinatore: Prof Lorenzo Dominioni



# **Placca aterosclerotica: ruolo dei CD66B**

Relatore:

Chiar.mo Prof. **PATRIZIO CASTELLI**

Tesi di Dottorato di:

**NICOLA RIVOLTA**

Matr. N. 700278

ANNO ACCADEMICO 2011/2012

## Indice

Premessa	pag	3
Epidemiologia delle malattie cerebrovascolari	pag	4
Quadro Clinico	pag	6
Patogenesi	pag	8
Anatomia patologica	pag	12
La placca “vulnerabile”	pag	15
Teorie patogenetiche	pag	18
Interleuchina-8	pag	24
Elastasi	pag	25
Scopo del lavoro	pag	26
Materiali e metodi	pag	27
Risultati	pag	35
Discussione	pag	45
Bibliografia	pag	49

## **Premessa**

L'aterosclerosi è una patologia infiammatoria cronica caratterizzata da una complessa interazione tra le cellule che costituiscono le pareti del vaso e lipoproteine modificate, linfociti e macrofagi. L'accumulo di lipidi nella parete vasale e la migrazione di vari tipi cellulari determinano la formazione e l'accrescimento della placca aterosclerotica. Il processo di sviluppo inizia nella terza decade ed è caratterizzato da un decorso lento e subdolo che tende a interessare tutti i distretti arteriosi di grande e medio calibro.

Le manifestazioni cliniche più note sono l'infarto miocardico acuto, l'ictus cerebri, l'arteropatia obliterante degli arti inferiori: in pratica è la responsabile delle maggiori cause di mortalità e morbilità nella popolazione adulta occidentale.

Dalle prime teorie, che fondamentalmente si focalizzavano sul deposito di lipidi, a oggi, con la definizione del legame tra cellule infiammatorie e placca, lo studio della patogenesi di questa malattia ha compiuto un lungo percorso.

Bisogna però evidenziare come a oggi l'introduzione di nuove terapie farmacologiche e il controllo dei fattori di rischio non ha ancora permesso di ridurre in modo consistente il numero di pazienti colpiti dalle manifestazioni cliniche dell'aterosclerosi.

L'elevato numero di pazienti interessati e la varietà di manifestazioni cliniche e morfologiche rendono la placca aterosclerotica carotidea e la patologia cerebrovascolare, suo corrispettivo clinico, un importante campo di ricerca.

L'importante impatto clinico e sociale che questa patologia riveste impone di chiarire ulteriormente il ruolo delle varie componenti cellulari implicate al fine di identificare possibili bersagli della terapia farmacologica .

## **Epidemiologia della patologia cerebrovascolare**

L'ictus è definito dall'Organizzazione mondiale della Sanità come un segno clinico a rapida evoluzione di un deficit focale della funzione cerebrale di probabile origine vascolare e della durata superiore alle 24 ore. L'attacco ischemico transitorio (TIA) è caratterizzato da una durata inferiore alle 24 ore.

Gli ictus ischemici rappresentano circa l'80% di tutti gli eventi, la parte rimanente è legato a eventi emorragici quali l'emorragia intraparenchimale (15-20%) e la sub aracnoidea (3%).

Le malattie cerebrovascolari costituiscono la terza causa di morte nei paesi occidentali, dopo l'infarto miocardico acuto e le neoplasie. Si ritiene che il 5% della popolazione al di sopra dei 65 anni sarà colpito da ictus.

L'ictus rappresenta inoltre la prima causa di disabilità nella popolazione adulta. Attraverso i dati della società italiana di Riabilitazione Neurologica si apprende che è la principale causa di disabilità con una prevalenza di 200 pazienti ogni 100000 abitanti<sup>1</sup>.

La patologia cerebrovascolare determina ogni anno circa 4,5 milioni di morti in tutto il mondo e causa invalidità nel 50% dei soggetti sopravvissuti. In Italia l'ictus è responsabile del 9,4% dei decessi totali mentre negli USA è responsabile del 6,3%.

Secondo studi britannici, nell'immediato post-stroke solo il 12% dei soggetti sarebbe autosufficiente ed il 38% gravemente dipendente; a sei mesi queste percentuali diventerebbero pari al 4 e al 47% rispettivamente<sup>2</sup>.

Sempre a sei mesi, da un terzo a metà dei sopravvissuti, a seconda degli studi, presenterebbe una dipendenza parziale o totale nello svolgimento delle Activity of Daily Living<sup>3</sup>.

Secondo l'Italian Longitudinal Study on Aging (ILSA) il tasso di prevalenza nella popolazione italiana con età compresa tra 65 ed 84 anni sia del 6,5% , tale valore arriva al 16 % nella popolazione superiore ad 84 anni<sup>4</sup>.

L'incidenza dell'ictus è di circa 1.5 casi all'anno per 100 abitanti ed aumenta in modo progressivo con l'età: 1 per 1000 tra 45 e 54, 3,5 tra 55 e 69, 9 tra 65 e 74, 30 oltre il 75 anni. Risulta pertanto che il 75% degli ictus colpisce la popolazione con età superiore a 65 anni<sup>5</sup>. Le proiezioni basate sull'attuale incidenza dell'ictus indicano un aumento della sua incidenza, anche se distribuito in maniera differente nelle varie età: una riduzione nei soggetti di età inferiore ai 55 anni, un incremento nei soggetti di età superiore ai 65 anni.

Evidenti sono le differenze fra i sessi: i maschi presentano un'incidenza per ictus più elevata rispetto alle donne (rapporto uomo: donna è di 1,3:1).

## **Quadro clinico**

Le manifestazioni cliniche dell'insufficienza cerebrovascolare sono condizionate sostanzialmente da tre fattori: l'evoluzione nel tempo della sintomatologia, l'entità del danno ischemico e la sede interessata dal danno ischemico

L'attacco ischemico transitorio (TIA) è caratterizzato dalla durata inferiore alle 24 ore e la cui risoluzione avviene con completa remissione della sintomatologia e senza danni di natura ischemica al tessuto cerebrale interessato dall'evento. Si definisce crescendo TIA due o più episodi riferibili a TIA in 24 ore o tre o più in 72 ore (è necessaria una completa risoluzione dei sintomi tra un TIA e l'altro).

In caso di durata superiore alle 24 ore si introduce il concetto di ictus. Tale definizione comprende, sulla base dei dati morfologici, l'infarto ischemico, l'infarto emorragico, l'emorragia intracerebrale primaria e alcuni casi di emorragia subaracnoidea (ESA). Infatti, nel caso del coma non è talvolta possibile distinguere l'ESA dall'ictus ischemico o emorragico parenchimale sulla sola base dei dati clinici.

L'ictus può essere definito ingravescente in quanto si manifesta in forma più lieve ma successivamente si ha un peggioramento nelle 24-48 ore successive all'evento..

La gravità del danno ischemico è in relazione con l'estensione del quadro ischemico riportato dal tessuto nervoso. I circoli collaterali che si possono formare, in alcuni casi riescono a compensare insulti ischemici a volte anche rilevanti, condizionando le dimensioni della lesione tissutale e di conseguenza anche l'entità della sintomatologia e l'evoluzione nel tempo dei residui neurologici.

Gli infarti possono essere classificati in lacunari (16-20% di tutti gli ictus, sono costituiti da una o più aree ischemiche di piccole dimensioni localizzate nelle strutture sottocorticali dell'encefalo

e raramente del cervelletto e non lacunari (necrosi di un'area ben definita di tessuto cerebrale a localizzazione corticale o sottocorticale)

I sintomi e i segni neurologici dell'insufficienza cerebrovascolare sono correlati alle funzioni cui sono preposte le aree del parenchima del tessuto nervoso cerebrale interessato dall'evento ischemico. Si possono distinguere manifestazioni cliniche secondarie a carenza irrorazione del circolo carotideo o del circolo vertebro-basilare.

I sintomi sono focali e negativi: testimoniano cioè una perdita di funzione. Sintomi non focali, non anatomicamente localizzabili, come stanchezza, confusione, o sintomi focali ma isolati sono raramente se non mai riconducibili ad eventi ischemici.

## **Patogenesi**

L'aterosclerosi è considerata un processo di reazione a danno, quindi rappresenta una risposta infiammatoria della parete vascolare dovuta ad un danno dell'endotelio; il processo infiammatorio sembra quindi ricoprire un ruolo fondamentale nella patogenesi dell'arterosclerosi.

Nello sviluppo delle lesioni aterosclerotiche possiamo distinguere diverse fasi: i processi iniziali che generano lesioni clinicamente silenti; le fasi di progressione che portano alla formazione di lesioni stenotiche non necessariamente sintomatiche; eventi complicanti che sono alla base delle manifestazioni croniche o acute.

Il primo evento che porta alla formazione delle placche è l'accumulo locale di lipidi ossidati e che non possono essere metabolizzati dal fegato ma che vengono sottratti al torrente ematico dagli endotelioцитi nello spazio sub-endoteliale della tonaca intima e poi fagocitati dai macrofagi.

I lipidi sono trasportati nel plasma sotto forma di lipoproteine, molecole idrosolubili composte da un nucleo di esteri di colesterolo e trigliceridi e uno strato superficiale di fosfolipidi, colesterolo libero e specifiche proteine trasportatrici, le apolipoproteine. Si riconoscono varie classi di lipoproteine in base al contenuto lipidico, alla densità in ultracentrifugazione, alla dimensione, alla mobilità elettroforetica e alle proteine presenti sulla loro superficie. Le principali lipoproteine plasmatiche sono i chilomicroni, le lipoproteine a bassissima densità (VLDL), le lipoproteine a densità intermedia (IDL o VLDL remnants), le lipoproteine a bassa densità (LDL) e le proteine ad alta densità (HDL). In seguito a fenomeni metabolici le lipoproteine che determinano alterazioni del contenuto lipidico e proteico passano da una classe all'altra. Le lipoproteine contribuiscono differientemente allo sviluppo e alla progressione del processo aterosclerotico.



I chilomicroni e le VLDL (ricche di trigliceridi) non sono aterogeniche al contrario dei prodotti derivati dalla loro lipolisi, le VLDL remnants e le LDL, lipoproteine più ricche in colesterolo. Il principale vettore del colesterolo è costituito dalle LDL che ne trasportano circa il 70% del contenuto plasmatico totale.

Il colesterolo viene assorbito dal plasma mediante il recettore delle LDL (LDL-R) che riconosce la apolipoproteina B-100 (ApoB-100) presente nelle LDL. LDL-R è permette di rimuovere 75% delle particelle LDL dalla circolazione ed è regolato negativamente nell'espressione quando i livelli di colesterolo intracellulare aumentano.

Il ruolo protettivo delle HDL non è ancora ben chiarito e sono stati proposto plurimi meccanismi. La prima ipotesi suggerisce che siano il veicolo attraverso il quale il colesterolo in eccesso viene riportato dalle cellule periferiche al fegato.

Le lipoproteine più importanti nel processo aterosclerotico sono le LDL piccole e dense. Rispetto alle LDL normali presentano un'aumentata emivita plasmatica che è dovuta alla diminuzione dell'affinità della apolipoproteina per il recettore delle LDL, quindi rimanendo in circolo per un tempo maggiore, continuano a cedere lipidi, aumentando di densità e diminuendo di dimensioni e sono inoltre sottoposte a un numero maggiore di eventi ossidativi diventando LDL mediamente ossidate (MM-LDL) e poi LDL ossidate (oxLDL) <sup>6</sup>. L'ossidazione è uno dei fattori principali nella genesi e della placca aterosclerotica. L'ossidazione delle lipoproteine si verifica sia a livello della porzione lipidica che di quella proteica. Le modificazioni dei lipidi includono la formazione di idroperossidi, lisofosfolipidi, ossisteroli e prodotti aldeidici derivanti dalla rottura delle catene degli acidi grassi <sup>7</sup>. Le LDL ossidate sono state evidenziate sia a livello del plasma che all'interno delle lesioni aterosclerotiche. Non è ancora chiaro se l'ossidazione delle LDL avvenga nel plasma e poi sia la loro forma ossidata ad infiltrarsi sotto l'endotelio oppure se l'ossidazione avvenga nel sito della lesione in seguito all'accumulo di LDL native. Probabilmente si verifica l'insieme dei due fenomeni e in ogni caso l'infiltrazione di LDL o oxLDL nella parete delle arterie è sempre una conseguenza dell'alterazione endoteliale. Le

apolipoproteine, in caso di iperglicemia, sono sottoposte a processi di glicosilazione non enzimatica che ne altera la funzione e accelera notevolmente il ruolo pro aterogeno. In risposta al danno indotto da prodotti ossidati e da alterazioni del flusso sanguigno, le cellule endoteliali si attivano esprimendo molecole di adesione sulla superficie e producendo mediatori chemio tattici. L'effetto chemio tattico delle LDL ossidate richiama i macrofagi che penetrano nell'intima per diapedesi tra le giunzioni endoteliali. Successivamente iniziano ad assorbire lipidi trasformandosi così in "cellule schiumose" (foam cell) <sup>8</sup>. La chemiotassi dei leucociti e dei macrofagi verso il sito della lesione e l'espressione di molecole di adesione sono mediate sia dai prodotti dell'ossidazione lipidica che da citochine pro-infiammatorie, una classe di mediatori di natura proteica. L'endotelio esprime particolari molecole di adesione per i leucociti: di particolare interesse sono la VCAM-1 (vascular cell adhesion molecole-1) e la ICAM-1 (intercellular adhesion molecole -1) che fanno parte della famiglie delle immunoglobuline e la P-selectina che fa parte di una famiglia distinta di recettori per i leucociti, noti come selectine <sup>9</sup>. La E-selectina permette il reclutamento dei leucociti polimorfo nucleati, la P-selectina è presente sulle cellule endoteliali che ricoprono l'ateroma. Gli ateromi esprimono inoltre delle chemochine selettive per i linfociti: la proteina -10 interferone- $\gamma$ -inducibile (IP10), il fattore chemio tattico  $\alpha$  per le cellule T interferone inducibile( I-TAC) e la monochina indotta dall'interferone- $\gamma$  (IFN- $\gamma$  ).Alcuni recettori come il LOX-1, il CD36 o il recettore "spazzino" (Scavenger Receptor – SR) permettono ai macrofagi di fagocitare le LDL <sup>10</sup>. Importante notare che l'espressione di questi recettori non è inibita dagli elevati livelli di colesterolo intracellulare: i macrofagi possono quindi assorbire continuamente LDL. Il processo di trasformazione dei macrofagi in foam cell è mediato da molecole quali il recettore A scavenger, il CD 36 e la macolisina. Le cellule schiumose si moltiplicano grazie all'azione dell'interleuchina-3 e del fattore stimolante la crescita dei macrofagi. A questo punto per l'evoluzione della stria lipidica a placca è necessaria l'accumulo di matrice extracellulare da parte delle cellule muscolari lisce.

I macrofagi mononucleati sono in grado di stimolare la migrazione verso l'intima e la proliferazione delle muscolari lisce della tonaca media attraverso il rilascio di citochine. L'interleuchina 1 (IL-1) ed il tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) costituiscono esempi di molecole in grado di indurre la produzione locale di fattori di crescita, inclusi il fattore di crescita di derivazione piastrinica (platelet-derived growth factor PDGF) e il fattore di crescita per i fibroblasti (fibroblast growth factor FGF).

L'interferone  $\gamma$  sintetizzato dalle cellule T attivate, presenti nella lesione, è in grado di invece di inibire la proliferazione delle cellule muscolari lisce. Le cellule muscolari lisce attivate sembrano recuperare un fenotipo embrionale (contengono infatti maggior quantità di reticolo endoplasmatico rugoso e meno fibrille contrattili).

La matrice extracellulare è costituita da collagene interstiziale (tipo I e III), elastina e proteoglicani. La produzione di tali componenti avviene mediante stimolo del PDGF e del TGF  $\beta$ . La sintesi di matrice è bilanciata dalla distruzione della stessa determinata dalle metalloproteasi. Nelle placche si sviluppa una fitta rete di neovasi in risposta ai peptidiangiogenetici superespressi nell'ateroma come i fattori di crescita per i fibroblasti acidi e basici (BGF I e II9, il fattore di crescita vascolare endoteliale (vascular endothelial Growth factor, VEGF) e l'oncostatina M. Importante fattore promotore della neo angiogenesi è rappresentato dallo stimolo ipossico presente all'interno della placca in cui la normale diffusione dell'O<sub>2</sub> è di molto ridotta rispetto alla parete sana del vaso. Il processo di calcificazione della placca è determinata invece da citochine, prodotte dalle cellule muscolari lisce, analoghe al TGF- $\beta$  e dall'interazione dei cristalli di colesterolo che costituiscono il substrato per la formazione di idrossiapatite<sup>11,12</sup>. Le placche contengono inoltre proteine con residui di acido glutammico  $\gamma$  carbossilico, in grado di incrementare il deposito di calcio.

## Anatomia patologica

L'aterosclerosi è una patologia sistemica ad eziologia multifattoriale. E' caratterizzata da lesioni intimali dette placche *ateromasiche* o *ateromi*: con il progredire del tempo la placca si accresce nel lume dell'arteria e tende a ridurne il calibro causando una riduzione della quantità di sangue richiesta dal tessuto vascolarizzato da esso. L'ateroma inoltre può andare incontro a modificazioni della struttura che determinano, attraverso l'attivazione di fattori locali e sistemici, manifestazioni quali occlusione trombotica oppure fenomeni embolici. L'aterosclerosi interessa principalmente le arterie elastiche ( per esempio l'aorta, le carotidi e le iliache) e le arterie muscolari di grande e medio calibro ( coronarie e poplitee). Gli ateromi hanno dapprima una distribuzione focale, ma progredendo tendono ad interessare l'intera circonferenza del vaso. Le alterazioni morfologiche elementari dell'aterosclerosi sono rappresentate dall'ispessimento focale intimale che evolve nella placca vera e propria. L'American Heart Association divide le lesioni aterosclerotiche in sei tipologie, a partire dalla cellule schiumose isolate (denominate "punto lipidico"), attraverso lo stadio della stria lipidica, dell'ateroma, del fibroateroma, fino alle lesioni complicate (figura 1)<sup>13</sup>. Le lesioni primitive sono le cellule schiumose isolate (punto lipidico) e l'accumulo di lipidi intra-extracellulari (stria lipidica). Questa, pur non riducendo il lume arterioso, è da considerarsi a tutti gli effetti il precursore della placca ateromatosa. Le lesioni iniziano come macchie di colore giallo dal diametro massimo di un millimetro con la tendenza a confluire in strie allungate con dimensioni superiori ad 1 centimetro. Le strie lipidiche sono costituite principalmente da cellule schiumose che hanno fagocitato i lipidi. Linfociti T e lipidi extracellulari sono poco rappresentati <sup>14</sup>.

Nomenclature and main histology	Sequences in progression	Main growth mechanism	Earliest onset	Clinical correlation
<b>Type I (initial) lesion</b> Isolated macrophage foam cells	<pre> graph TD     I((I)) --&gt; II((II))     II --&gt; III((III))     III --&gt; IV((IV))     IV --&gt; V((V))     V --&gt; VI((VI))     IV --&gt; III     V --&gt; IV </pre>	Growth mainly by lipid accumulation	From first decade	Clinically silent
<b>Type II (fatty streak) lesion</b> Mainly intracellular lipid accumulation			From third decade	
<b>Type III (intermediate) lesion</b> Type II changes & small extracellular lipid pools				
<b>Type IV (atheroma) lesion</b> Type II changes & core of extracellular lipid		Accelerated smooth muscle and collagen increase	From fourth decade	Clinically silent or overt
<b>Type V (fibroatheroma) lesion</b> Lipid core & fibrotic layer, or multiple lipid cores & fibrotic layers, or mainly calcific, or mainly fibrotic				
<b>Type VI (complicated) lesion</b> Surface defect, hematoma-hemorrhage, thrombus		Thrombosis, hematoma		

Figura 1: classificazione delle lesioni aterosclerotiche secondo la classificazione dell'American Hearth Association (AHA).

La relazione esistente tra le strie lipidiche e le placche è ancora dibattuta. Le prime infatti compaiono in tratti del vaso che difficilmente svilupperanno ateromi. Inoltre colpiscono popolazioni residenti in regioni a basso rischio di aterosclerosi. In pratica non tutte le strie lipidiche evolvono in lesioni avanzate.

L'ateroma consiste in una placca focale localizzata nell'intima con un nucleo centrale costituito da lipidi ( in particolare colesterolo e suoi esteri) ricoperto da un cappuccio fibroso. Quest'ultimo tende ad avere una consistenza aumentata e colore biancastro mentre le porzioni più interne sono di colore giallastre o bianco-giallastre e di consistenza molle. La porzione centrale della placca contiene materiale poltaceo dal quale prende il nome di ateroma, dal termine greco "pappa" per definire le stesse.

Le lesioni aterosclerotiche in genere sono eccentriche, interessano la circonferenza della parete arteriosa in modo parziale e si distribuiscono in modo non uniforme lungo l'intero vaso. Ogni placca ha tre principali costituenti: 1) la componente cellulare (cellule muscolari lisce, macrofagi e altri leucociti); 2) il tessuto connettivo della matrice extracellulare (collagene, fibre elastiche e proteoglicani); 3) i depositi lipidici intra ed extra cellulari. Le proporzioni relative delle tre componenti variano da placca a placca. Il cappuccio fibroso di rivestimento è costituito principalmente da cellule muscolari lisce, scarsi leucociti e connettivo relativamente denso; l'area ricca di cellule situata sotto e a fianco del cappuccio, chiamata "spalla", contiene al suo interno macrofagi, cellule muscolari lisce e linfociti T; nel nucleo necrotico più profondo si trova una massa disorganizzata di materiale lipidico con colesterolo, detriti cellulari, cellule schiumose cariche di lipidi, fibrina, trombi e altre proteine plasmatiche. Gli ateromi tipici contengono quantità relativamente abbondanti di lipidi, anche se molte placche possono essere costituite principalmente da cellule muscolari lisce. Nell'aterosclerosi in stadio avanzato, la fibrosi progressiva può trasformare l'ateroma lipidico in una cicatrice fibrosa.

## **La placca “vulnerabile”**

Secondo la tabella dell'AHA lo stadio più avanzato viene definito “lesione complicata”. Con questo si intende una lesione ateromatosa caratterizzata da alterazioni che la rendono più rilevante su un piano clinico. Tali forme comprendono le calcificazioni, la rottura ( con conseguente trombosi) e le emorragie. Le modalità di rottura della placca sono di due tipi: la rottura del cappuccio fibroso e l'erosione superficiale dell'intima<sup>15</sup>. La prima riflette uno squilibrio tra le forze che agiscono sul cappuccio e la resistenza meccanica dello stesso. Tutti i fattori in grado di ridurre la sintesi del collagene da parte delle cellule muscolari lisce (es IFN- $\alpha$ ) compromettono la capacità di riparare e mantenere integro il cap. tale struttura è a sua volta rinforzata mediante la sintesi di collagene da parte di cellule muscolari lisce stimulate da TGF $\alpha$  e PDGF. I macrofagi contenuti nelle placche, esprimono le metalloproteasi (MMP) e le catepsine elastolitiche responsabili della rottura del collagene e dell'elastina della matrice extracellulare. Da questo si evince il collegamento tra risposta infiammatoria e il rischio di complicanze della placca. Una placca viene definita “vulnerabile” quando presenta un cappuccio fibroso assottigliato e presenta una perdita relativa di cellule muscolari. Nella placca definita vulnerabile si riscontra un alto numero di lipidi e macrofagi. L'attivazione di questi ultimi porta alla produzione di citochine pro infiammatorie ed enzimi che degradano la matrice. Un altro fattore coinvolto nella modificazione di forze che alterano l'equilibrio della placca è senz'altro l'emorragia intraplacca, di genesi ancora ignota si suppone che possa avvenire a causa della fragilità dei neovasi costituiti essenzialmente da un monostrato endoteliale senza quindi una parete propria. L'emorragia provoca un aumentato volume della placca e in alcune situazioni la rottura del cap sottoposto allo stress pressorio. La patogenesi del secondo meccanismo (l'erosione della placca) non è altrettanto definita. Sono state ipotizzate plurime teorie che coinvolgono processi apoptotici endoteliali e azione diretta delle metalloproteasi . le piastrine

accumulate a livello del sito di erosione vengono attivate dal collagene, dall'ADP, da serotonina e adrenalina. Si ha quindi la produzione di trombositani A<sub>2</sub> che determina vasocostrizione e incrementa ulteriormente l'attivazione piastrinica, con parziale resistenza al processo di trombolisi. L'attivazione piastrinica viene stimolata anche mediante modificazione del recettore della glicoproteina IIb/IIIa con aumento della sua affinità alle proteine solubili quali il fattore di von Willebrand e il fibrinogeno. L'esposizione del fattore tissutale in corrispondenza del sito di rottura della placca attiva il processo a cascata della coagulazione. Il trombo contenente aggregati piastrinici e fibrina determina così l'occlusione del vaso.

Oltre ai fenomeni intrinseci descritti, la placca può rompersi anche per fattori esterni quali le forze emodinamiche. Tali fattori influenzano la composizione stessa della placca: le zone situate a monte del flusso (sede di maggior shear stress) sono più ricche di macrofagi, mentre le zone a valle presentano una maggior concentrazione di cellule muscolari lisce.

In ambito carotideo, il passaggio dalla fase stabile a vulnerabile dipende da un fine bilancio tra migrazione/proliferazione cellulare, produzione e degradazione di matrice extracellulare, infiltrato infiammatorio rappresentato da macrofagi e linfociti T e dalla diffusione dei neovasi. Questi, attraverso la produzione di IFN $\gamma$  stimolano la produzione, da parte dei macrofagi, di MMP, e inibiscono la produzione di collagene. Alti livelli di MMP si evidenziano a livello del cappuccio fibroso mentre un aumento dei processi di apoptosi delle cellule muscolari lisce è tipico delle placche vulnerabili. Su questi concetti si basa l'introduzione in terapia di farmaci ipolipemizzanti quali le statine (fluvastatina e pravastatina). Questi determinano una riduzione dei valori di MMP-1, MMP-3, MMP-9 e aumentano la sintesi di pro collagene da parte delle cellule muscolari lisce: l'effetto finale è la stabilizzazione della placca<sup>16</sup>.

L'erosione dei capillari neoformati all'interno dell'ateroma è la causa delle emorragie intrapacca. Questa complicanza è favorita da condizioni genetiche o farmacologiche nelle quali si verifica un'alterazione a livello dei meccanismi della coagulazione (ad esempio la mutazione del fattore V di Leiden).



Bisogna ricordare che nei vasi di maggior calibro l'aterosclerosi può compromettere il trofismo della tonaca media con conseguente perdita della componente elastica tale da determinare la dilatazione aneurismatica del vaso.

## Teorie patogenetiche

Nel corso degli anni sono state formulate plurime teorie circa il meccanismo patogenetico della malattia aterosclerotica. Tutte sono accumulate dal presupposto dell'esistenza di un'alterazione dell'endotelio a cui farebbe seguito una reazione infiammatoria responsabile dell'evoluzione della placca.

Il concetto "infiammatorio" ha rivoluzionato il principio che tradizionalmente considerava l'ipercolesterolemia la principale (per non dire l'unica) responsabile dello sconvolgimento strutturale, e quindi funzionale, di determinati della parete delle arterie.

Già Virchow, a metà del XIX secolo, sosteneva che una piccola lesione della parete arteriosa provocasse un essudato infiammatorio, causa a sua volta dell'aumento del flusso e dell'accumulo di costituenti del plasma nell'intima dell'arteria<sup>17</sup>.

Von Rokitsky ipotizzò che a livello delle lesioni aderissero dei piccoli trombi murali che andavano incontro ad organizzazione mediante la proliferazione nel loro interno di cellule muscolari lisce<sup>18</sup>.

Ross e Glomset negli anni '70 grazie agli studi di biologia molecolare e cellulare della parete arteriosa enunciarono la teoria patogenetica dell'aterosclerosi definita "ipotesi della reazione alla lesione". Questi Autori per "lesione endoteliale" intendevano qualsiasi alterazione dell'endotelio che non necessariamente implica il denudamento della parete intima dell'arteria ma può essere semplicemente rappresentata da un'alterazione funzionale che ne modifichi le normali proprietà anticoagulanti e vasodilatatorie e ne alteri la permeabilità<sup>19</sup>.

Infiammazione e trombosi sono processi chiave nella genesi della placca<sup>20</sup>. La sua formazione richiede l'innescamento di una serie di adattamenti al danno che vengono inquadrati all'interno della risposta infiammatoria. L'infiammazione stessa svolge anche un ruolo centrale dell'instabilità strutturale della placca e degli eventi di tipo tromboembolico ne conseguono. L'individuazione

del meccanismo patogenetico determinante dell'ateromatosi sotto forma di flogosi cronica della parete arteriosa ha però sollevato il problema del dover scindere, concettualmente, l'eziologia (riservata per lo più alla definizione dei "fattori di rischio") dalla patogenesi. Nell'ambito di quest'ultima si sono invece concentrate tutte le continue precisazioni, soprattutto di tipo biochimico, coinvolgenti sia le cellule endoteliali, sia i miociti, sia infine le cellule immuno-competenti (miociti/macrofagi e T-linfociti): cellule che hanno assunto il ruolo di vere responsabili della lesione ateromatosa.

### Teoria degenerativa o colesterolica

Secondo questa teoria il ruolo cardine è svolto dall'ossidazione intravascolare delle LDL, vere responsabili del processo infiammatorio. A conferma si è evidenziato che la riduzione dei livelli plasmatici di LDL si associa a una significativa riduzione degli eventi cardiovascolari<sup>21</sup>. Il ruolo delle statine nel ridurre la mortalità correlata alla patologia aterosclerotica, anche nella popolazione ultrasettantenne, è stato definito da plurimi studi, tra cui l'HPS<sup>22</sup>, il CARDS<sup>23</sup> e l'ASCOT<sup>24</sup>.

Le statine hanno un effetto pleiotropo con riduzione delle citochine a livello della placca, dei livelli di infiammazione e della lisi del cap fibroso: eventi correlati con l'instabilità della placca. Lo studio REVERSAL ha evidenziato che l'utilizzo di statine (atorvastatina) a dosaggi elevati (80 mg) determina una riduzione del colesterolo LDL plasmatico e del volume dell'ateroma. Dosaggi inferiori (pravastatina 40 mg) non sortivano il medesimo effetto<sup>25</sup>. Ulteriore bersaglio della terapia farmacologica in questo ambito è l'incremento dei valori di HDL plasmatico al fine di ridurre i valori di colesterolo attraverso l'escrezione per via biliare<sup>26</sup>. Bisogna evidenziare che la maggior parte di questi studi riguardano pazienti con sindrome coronarica acuta, ciò rafforza il ruolo della correzione dei valori plasmatici di LDL e HDL nel ridurre gli eventi clinici correlati all'aterosclerosi nei soggetti ad alto rischio.

## Teoria infiammatoria

A partire dai già citati lavori di Virchow e Ross, la teoria infiammatoria è stata più volte utilizzata per spiegare i fenomeni evolutivi che riguardano la placca aterosclerotica. Tale teoria sottolinea l'alterazione da parte di plurimi fattori (radicali liberi, LDL ossidate, agenti infettivi ed altri) dell'omeostasi endoteliale. Ciò comporta delle modificazione dei processi coagulativi, della permeabilità e conseguente risposta immunitaria ed infiammatoria. Importanti markers di questi processi sono l'ossido nitrico (NO) e l'endotelina 1 (ET-1), il primo con funzione vasodilatatoria mentre il secondo vasocostrittrice. In particolare è stato evidenziato un aumento dei recettori dell'ET-1 a livello degli ateromi <sup>27,28</sup>.

Ulteriori molecole sono state identificate all'interno di questo complesso processo quali l'angiotensina II e la sfingosina cellulare. La prima determina il blocco della produzione dell'ossido nitrico da parte delle cellule endoteliali mediante un aumento dei radicali liberi. Questo sembra essere il substrato fisiologico della funzione anti aterosclerotica degli ACE-inibitori. La sfingosina cellulare invece attiva le LDL ossidate e stimola la proliferazione delle cellule muscolari lisce <sup>29</sup>.

L'infiammazione a livello endoteliale determina plurimi processi di carattere distruttivo (necrosi ed apoptosi di elementi cellulari), ricostruttivo/riparativo (proliferazione connettivale e genesi del cappuccio fibroso) e differenziativo/rimodellativo (riarrangiamento del cappuccio, produzione e secrezione di proteasi/antiproteasi), ma anche di tipo procoagulante/proaggregante. Rappresenta quindi essere il protagonista degli eventi (acuti o cronici) che caratterizzano la successiva evoluzione della placca aterosclerotica. In linea con quanto detto, diversi biomarcatori che riflettono il procedere del processo infiammatorio hanno visto confermata, negli ultimi anni, la loro valenza come marker di instabilità della placca. Sfortunatamente è da tempo chiaro che l'infiammazione è costantemente un fenomeno sistemico, e per questo motivo la ricerca di marcatori specifici di infiammazione della placca aterosclerotica ha condotto all'identificazione di una miriade di indicatori quali la PCR, tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ ) e altre <sup>30</sup>.

La proteina C reattiva (PCR), una pentrassina prodotta dagli epatociti, è sicuramente il più studiato tra i marcatori infiammatori, e risulta essere un predittore indipendente di eventi acuti cardiovascolari in soggetti asintomatici <sup>31</sup>, ma anche in pazienti con angina instabile <sup>32</sup>, mentre in pazienti con infarto miocardico livelli elevati di PCR alla dimissione si associano ad una peggiore prognosi a distanza.

Negli ultimi anni è stato approfondito il ruolo della risposta immunitaria nella genesi e soprattutto nell'evoluzione della placca ateromastica. Sembra infatti in grado, attraverso la mediazione dei fenomeni infiammatori, di influenzare la stabilità dell'ateroma. Resta da chiarire la natura degli antigeni in grado di stimolare l'azione dei linfociti<sup>33</sup>. Le LDL ossidate oppure micro organismi (virus e batteri) potrebbero svolgere questo ruolo. Un'altra ipotesi evidenzia il possibile ruolo di molecole normalmente non espresse e quindi riconosciute come *non self*, la rottura del cap fibroso esporrebbe inoltre ulteriori antigeni intracellulari<sup>34</sup>.

A livello della placca aterosclerotica si evidenziano citochine capaci di promuovere la differenziazione dei linfociti T CD4+ in T helper di tipo 1 (th-1) infiammatorie in grado di produrre TNF  $\alpha$  e INF $\alpha$ .

Di recente è stato studiato il ruolo dei recettori *Toll like* nell'avvio dei processi immunitari a livello della placca. L'attivazione di questi, innescata dai lipopolisaccaridi e da stimoli endogeni (in particolare le *Heat Shock Protein*), determina le tipiche risposte infiammatorie <sup>35</sup>. Il ruolo di questi recettori potrebbe essere quello di mediare i processi di interazione stimoli endo/esogeni e le cellule infiammatorie coinvolte nei processi di genesi e rimodellamento delle placche. Di fondamentale importanza diventa quindi chiarire come delle cellule con finalità difensiva possano essere causa di danno all'organismo <sup>36</sup>.

## Teoria infettiva

Diversi autori hanno cercato di identificare il possibile ruolo di agenti infettivi nella patologia aterosclerotica. I primi a pubblicare un lavoro a riguardo furono Gilbert e Lion nel 1889: essi evidenziarono una correlazione tra infezione con *Salmonella typhi* e placca aterosclerotica nei conigli<sup>37</sup>. Quasi un secolo dopo, nel 1978, Fabricant dimostrò che l'infezione da *herpes virus* comportava un ispessimento fibroso associato a deposito lipidico nella parete arteriosa<sup>38</sup>. Successivamente è stata valutata l'ipotesi di un collegamento tra aterosclerosi ( in particolare a livello coronarico) e infezione da *Chlamydia Pneumoniae*<sup>39</sup> o *Helicobacter Pylori*<sup>40</sup>

Ad oggi sono state formulate tre diverse teorie circa la relazione tra infezioni e aterosclerosi.

La prima ipotesi suggerisce che il microrganismo sia la causa del processo infiammatorio. In questo caso, dato il decorso dell'aterosclerosi, sono stati presi in considerazione patogeni caratterizzati da un'ampia diffusione nella popolazione, capaci di latenza e recidive e tropismo per la parete vascolare. In particolare sono stati studiati il *Citomegalovirus umano*, la *Chlamydia Pneumonia* e l' *Helicobacter Pylori*.

Il secondo modello presuppone una reazione crociata legata ad una somiglianza antigenica tra il patogeno e la parete vascolare. E' stata studiata la possibilità di una cross reazione tra le *Heat Shock Protein* e antigeni batterici della *Chlamydia Pneumonia*<sup>41</sup>.

La terza teoria evidenzia la possibilità che gli agenti infettivi agiscano in modo aspecifico, innescando quindi uno stato infiammatorio sistemico, questa determina l'attivazione della risposta mediata dal sistema immunitario. Le infezioni da *Citomegalovirus umano* determinano un aumento di  $INF\alpha$ , in grado di determinare l'espressione della MCP-1 ( proteina chemio tattica dei monociti), dei  $CD4^+$  e  $CD8^{+42}$ . Inoltre, oltre alle citochine sopra citate la *Chlamydia Pneumonia* determina la produzione di interleuchina 12 e 10. Anche Il-1 e Il- 6 aumentano in corso di infezione attivando la reazione di fase acuta attraverso la sintesi di proteine quali la PCR.

Zhu ha approfondito l'ipotesi del *pathogenic burden*: nel processo infettivo pro aterosclerotico sarebbe coinvolto più di un microrganismo <sup>43</sup>. Plurimi studi hanno infatti correlato la coronaropatia e la carica patogena delineando un rapporto tra questa e mortalità e morbilità cardiovascolare <sup>44,45</sup>.

Bisogna infine ricordare la possibile correlazione fra formazione dell'ateroma e le infezioni orali. Mattila nel 1989 ha per la prima volta pubblicato un lavoro riguardo il rapporto tra malattia aterosclerotica coronarica e infezione del cavo orale introducendo il concetto di Total Dental Index (TDI)<sup>46</sup>.

E' stata ipotizzato che un infezione a carico tessuto paradontale (osso alveolare, legamento paradontale, cemento e gengiva) come fattore di rischio per l'infezione da *Citomegalovirus umano*. Queste infezioni determinano un aumento dell'aggregazione piastrinica, l'attivazione delle proteine di fase acuta e di citochine pro infiammatorie. Si ipotizza una diffusione per via ematica dei microrganismi con conseguente danno endoteliale. Ulteriore spiegazione del rapporto paradentite-placca aterosclerotica potrebbe essere una cross reazione tra peptidi di natura batterica e proteine umane. I batteri responsabili della parodontiti determinano il rilascio di fibrinogeno, PCR attraverso l'attivazione della fase acuta <sup>47</sup>.

## **Interleuchina 8**

L'interleuchina 8 fa parte della famiglia delle citochine, essa è stata definita come una proteina attivante i neutrofili con effetti biologici simili a sostanze come l'anafilotossina C5a, i fattori attivanti le piastrine (PAF) ed i peptidi batterici o sintetici (es. FMLP). Isolata per la prima volta da leucociti stimolati; essa viene prevalentemente prodotta dai neutrofili ma può inoltre essere rilasciata da diversi tipi cellulari come ad esempio: fibroblasti, cellule endoteliali, condrociti, epitelociti, cheratinociti e molte altre cellule.

Il gene dell'IL-8 è localizzato nell'uomo sul cromosoma 4 (q12-21) e rappresenta lo stesso locus genico di altre proteine infiammatorie. Esso codifica per un precursore della proteina di 99 amminoacidi che presenta una regione N-terminale che risulta essere il peptide segnale.

La proteina matura è costituita da 72-77 amminoacidi; i suoi recettori sono stati identificati sulla superficie dei neutrofili, essi sono ad elevata affinità, mentre altri recettori a minore affinità sono stati individuati a livello di linfociti T e di cellule della linea monocitaria (figura 2).

Plurimi studi hanno messo in evidenza che la produzione di IL-8 viene innalzata da alti livelli di LDL ossidate e da alte concentrazioni di glucosio fornendo in questo caso una potenziale spiegazione per l'associazione tra iperglicemia e aterosclerosi<sup>48,49</sup>. IL-8 sintetizzata e secreta dalle cellule endoteliali attrae le cellule mononucleari alla parete arteriosa ed aumenta l'adesione dei monociti alle cellule endoteliali aortiche umane. Inoltre induce una "down-regulation" degli inibitori tissutali delle metallo proteinasi 1 (TIMP-1), favorendo la generazione della placca aterosclerotica instabile. IL-8 può funzionare da chemoattrattante

Per le cellule-T e per i neutrofili, inoltre ricopre un ruolo nell'angiogenesi, infatti può indurre la proliferazione e la migrazione delle cellule muscolari lisce vascolari. E' stato dimostrato che IL-8 è espressa nella placca aterosclerotica umana dai macrofagi.



## Elastasi

Il catabolismo della matrice extracellulare è implicato nel rimodellamento vascolare. L'elastasi neutrofila, chiamata anche *elastasi leucocitaria* o con la sigla *ELA2*, è un enzima appartenente alla famiglia delle proteasi sieriche costituita da una catena di 218 aminoacidi. L'elastasi neutrofila è rilasciata dai neutrofili durante il processo infiammatorio e ha la funzione di coadiuvare la distruzione dei batteri e delle cellule estranee. Come altre proteasi possiede una triade catalitica composta da istidina, (precursore della sintesi di istamina), aspartato e serina.

L'elastasi derivante dai neutrofili può degradare l'elastina, il collagene e altri costituenti della matrice extracellulare oltre a poter modulare l'espressione delle metallo-proteasi (MMP), delle citochine e delle lipoproteine. Le arterie fibrotiche e ateromasiche, ma non le arterie normali, contengono elastasi. Mediante ibridizzazione in situ, gli RNAm dell'elastasi sono localizzati nelle zone ricche di macrofagi, indicando la produzione locale di questo enzima<sup>50</sup>. Moreno ha ipotizzato che la produzione di CD163 solubile (sCD163) possa essere causa di spargimento proteolitico di membrana CD163 da parte dell'elastasi neutrofila. Tale Autore ha dimostrato che l'elastasi dei neutrofili risulta migliorare la diffusione di CD163 e diminuire l'assorbimento di complessi Hb-Hp (aptoglobina-emoglobina) da parte dei macrofagi in coltura. Inoltre ha evidenziato come, in campioni di endoarterectomia carotidea con caratteristiche di emorragia intrapacca, si riscontrino maggior livelli di CD163 e complessi elastase/ $\alpha$ 1-antitripsina ( $\alpha$ 1-AT) rispetto a placche non-emorragiche<sup>51</sup>. Precedentemente Bizbiz aveva proposto l'utilizzo dell'elastase sierica come marker dell'invecchiamento vascolare e dell'aterosclerosi, nell'ambito di uno studio epidemiologico sull'invecchiamento vascolare e cognitivo, in relazione adati ultrasonografici (l'intima-media thickness, IMT) e i fattori di rischio cardiovascolare<sup>52</sup>.

## **Scopo del lavoro**

Intendiamo valutare la presenza e l'attività dei polimorfonucleati (PMN) all'interno della placca aterosclerotica carotidea al fine di rilevare le citochine (IL8) e l'elastasi da essi prodotte e la correlazione che esiste fra tali molecole e le caratteristiche morfologiche della placca nonché la sintomatologia dei pazienti arruolati.

Sono stati quindi valutati 2 gruppi di pazienti, asintomatici e sintomatici (secondo le linee guida dell'European Society of Vascular Surgery <sup>53</sup>) affetti da aterosclerosi carotidea. La diagnosi è stata eseguita mediante eco-colorDoppler ed angio Tc TSA.

I pazienti sono stati ricoverati presso l'Unità Operativa di Chirurgia Vascolare dell'Ospedale di Circolo-Fondazione Macchi di Varese e sottoposti ad intervento chirurgico di tromboendarterectomia durante il quale è stata prelevata la placca aterosclerotica.

Questa è stata poi sottoposta a processo di disgregazione e tipizzazione delle popolazioni cellulari presso il Laboratorio di Farmacologia dell'Università dell'Insubria.

Da un gruppo di pazienti è stato prelevato anche un campione di sangue periferico per l'isolamento dei neutrofili e il confronto dell'attività di IL-8 ed elastasi rispetto agli stanziali della placca.

## **Materiali e metodi**

Inizialmente sono stati arruolati 10 pazienti per codificare e valutare la metodica d'analisi della placca carotidea.

Allo stato attuale sono stati arruolati 49 pazienti (età media 71 anni, range 55-87 anni, 11 femmine, 38 maschi).

Le caratteristiche anamnestiche dei pazienti sono riassunte in tabella 1.

	<b>Sesso Maschile</b>		<b>Sesso Femminile</b>	
	<b>(n°)</b>	<b>%</b>	<b>(n°)</b>	<b>%</b>
Familiarità	23	46.9	9	18.4
Fumo	25	51.0	7	14.3
Alcool	10	20.4	1	2,0
Ipertensione	35	71.4	10	20.4
IMA	9	18.4	3	6.1
FA	4	8.2	1	2.04
Arteropatia periferica	15	30.6	5	10.2
Diabete	10	20.4	5	10.2
Dislipidemia	18	36.7	6	12.2
BPCO	8	16.3	2	4.1

*Tabella 1.: caratteristiche anamnestiche dei pazienti arruolati.*

I criteri di esclusione sono stati: recente infezione (meno di 30 giorni), malattie autoimmuni, neoplasie o patologie infiammatorie in anamnesi.

Tutti i pazienti assumevano in terapia un farmaco antiaggregante. Nello specifico 36 pazienti assumevano 38 acidoacetilsalicilico 100 mg die, 4 clopidogrel 75 mg, 5 ticlopidina 500 mg al giorno. Solo 2 pazienti assumevano un regime di doppia antiaggregazione (cardioasa/clopidogrel, cardioasa/ ticlopidina). La terapia antiaggregante non è stata sospesa nel periodo perioperatorio.

In 38 pazienti (77%) era invece presente in terapia una statina: 32 pazienti assumevano atorvastatina (dosaggi compresi da 20-80 mg), 2 rosuvastatina, 4 simvastatina. Di questi, 6 pazienti presentavano in anamnesi un'associazione statina-esteri etilici dei grassi polinsaturi.

Abbiamo trattato complessivamente 30 pazienti asintomatici (gruppo A) e 19 pazienti sintomatici (gruppo B).

I pazienti sono stati considerati sintomatici se presentavano un attacco ischemico transitorio o un ictus nel territorio di distribuzione carotideo nei precedenti 6 mesi.

I pazienti sintomatici sono stati operati in un range di tempo compreso tra 1 e 90 giorni dall'evento clinico (media: 23 giorni).

Non sono stati eseguiti interventi in regime di emergenza o urgenza.

Non sono stati considerati sintomatici, sulla base della definizione dell'OMS pazienti con anamnesi positiva per: perdita di coscienza, vertigini, amnesia globale transitoria, drop attack, astenia generalizzata, stato confusionale e incontinenza sfinterica quando presenti isolatamente.

Non sono stati inoltre inseriti nel gruppo B i pazienti con sintomi contro laterali o lesioni ischemiche alla TC asintomatiche<sup>54</sup>.

In 15 casi (11 maschi e 4 femmine) data la regressione dei sintomi entro 24 ore dall'esordio, abbiamo posto diagnosi di TIA. In 4 pazienti è stata posta la diagnosi di stroke (grafico 1).

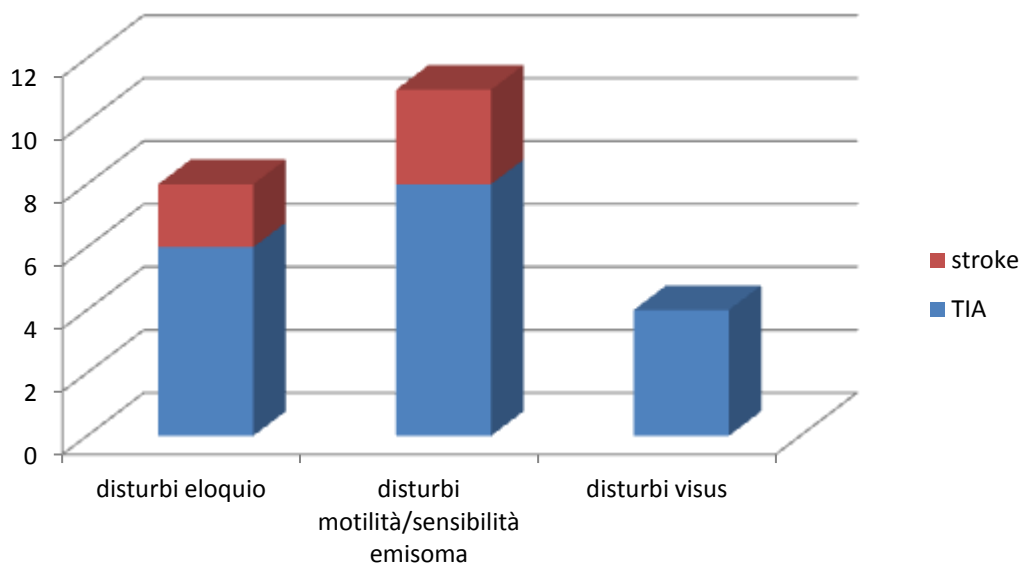


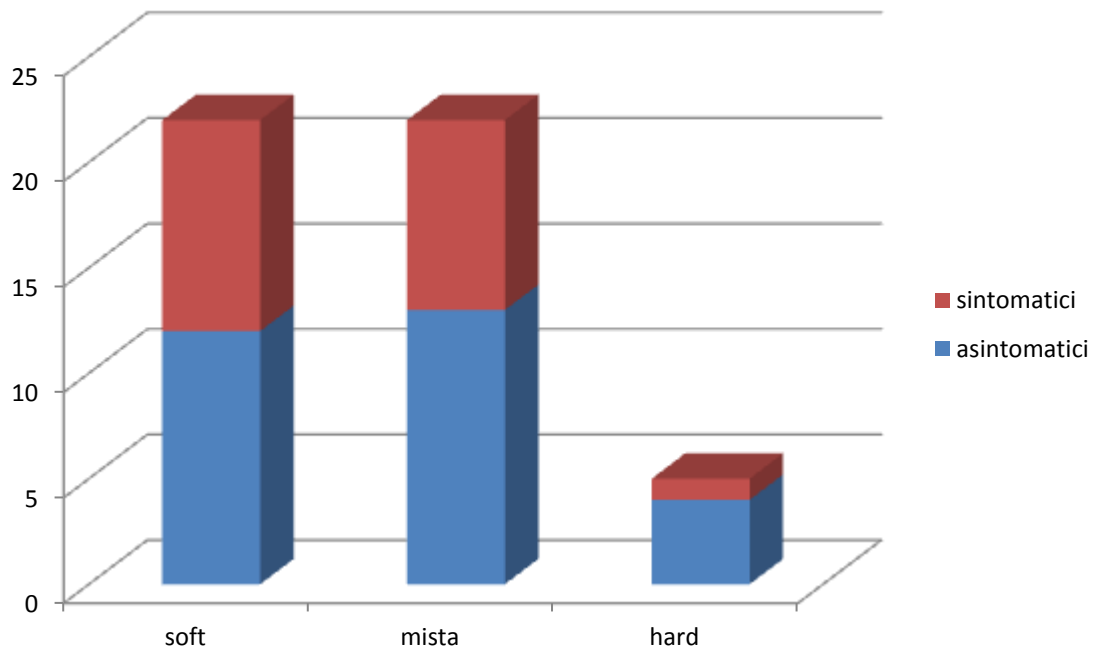
Grafico 1: sintomatologia dei pazienti del gruppo "sintomatici".

La placca carotidea è stata valutata mediante eco-colorDoppler (Hitachi H20, Hitachi Ltd, Tokio) ed angio-Tc dei tronchi sovra- aortici (TSA)(Aquilon 64, Toshiba, Tokio, Giappone). Durante tali esami è stata valutata la percentuale di stenosi, misurata secondo metodo Nascet, la composizione (ecogenicità) e la superficie (micro- e/o macroulcerazioni) della stessa. Attraverso la valutazione del "Hounsfield value" è stata determinata la composizione delle placche esaminate (tabella 2)<sup>55</sup>.

Hounsfield Units (HU) range.	Composizione placca
-20 - 60	Lipidica (soft)
60-140	Fibolipidica (mista)
≥ 140	Calcifica (hard)

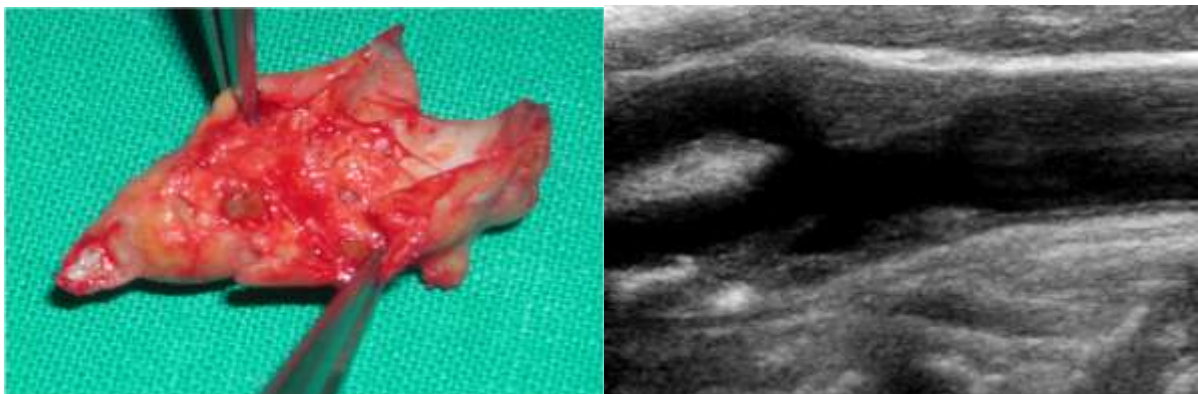
Tabella 2: criteri TC della valutazione della composizione della placca

In 22 pazienti (44.9 %) la lesione è di tipo fibro-lipidico, in 22 casi (44.9%) di tipo lipidico (placche 'soft'), nei restanti 5 pazienti è di tipo hard (grafico 2).



*Grafico 2: tipo di placca e sintomatologia.*

In 9 pazienti si sono evidenziate ulcerazioni a livello della placca mediante gli studi di imaging di I e II livello, reperto confermato durante l'intervento chirurgico (figura 2).



*Figura 2: ulcerazione a livello della placca carotidea: reperto operatorio ed ecografico.*

Il grado di stenosi media determinato dalle lesioni ateromasiche nei 48 pazienti presi in considerazione è del 79,9% (intervallo compreso tra 60% e 90%), misurata mediante metodo Nascet. Tra questi pazienti 7 presentano una stenosi subocclusiva della carotide interna. Nei diciannove pazienti sintomatici la media della stenosi è 79,2% mentre, nei 30 pazienti asintomatici è 80,4%. Nei pazienti con placca soft la percentuale media di stenosi era 79,4, nelle miste 80,9, nelle hard 80,0 (non vi sono differenze statisticamente significative fra i vari sottogruppi)

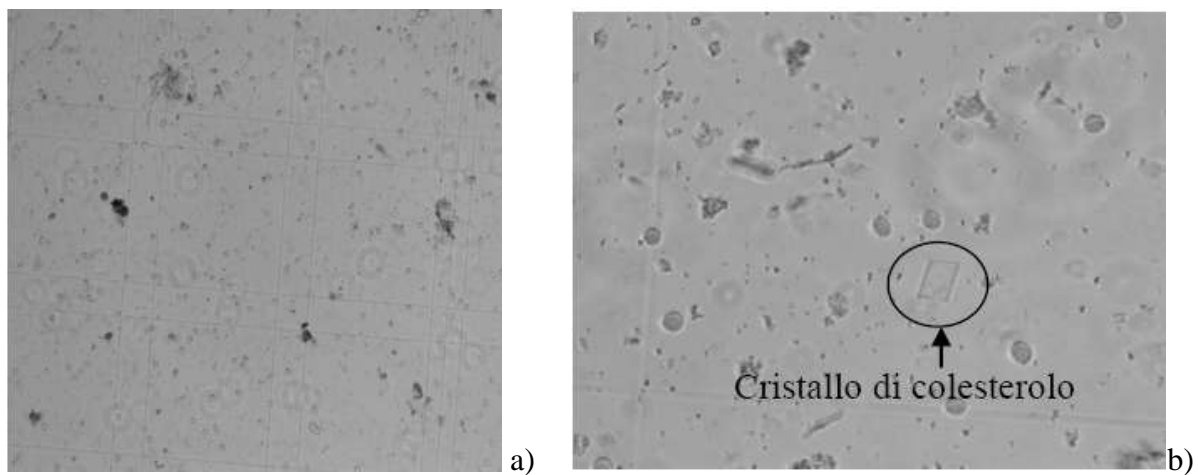
Tutti i pazienti sono stati sottoposti nel preoperatorio a valutazione nello specialista neurologo e ad approfondimenti diagnostici mediante Tc encefalo, elettroencefalogramma (EEG) e Doppler Transcranico (DTC) (Multidop® DigitalX, Compumedics Germany).

L'indicazione all'intervento di tromboendarterectomia (TEA) carotidea è stato posto in caso, nei pazienti asintomatici, di evidenza durante esame angioTc (TSA) di placca determinante stenosi superiore al 70% con un rischio perioperatorio di complicanze gravi (morte, ictus) accettabile inferiore al 3%; nei pazienti con stenosi sintomatica in caso di evidenza di stenosi superiore al 50% (linee guida ESVS)<sup>53</sup>.

L'intervento è stato eseguito in anestesia loco-regionale (ropivacaine 7.5%) e sedazione continua (remifentanyl 0.08 $\mu$ g/Kg/min). È stato eseguito un monitoraggio clinico (focal neurologic deficit-anesthesiology compensation), EEG (alterazione attività) e DTC (valutazione quantitativa fenomeno embolico durante manovre di clampaggio-declampaggio, valutazione effetto compensatorio dei circoli collaterali). La TEA è stata eseguita mediante tecnica di "semi-eversione". In tutti i casi è stata eseguita un'arterioraffia con sutura diretta. Il tempo di clampaggio medio è stato 23 minuti (range 18-28 minuti).

La placca è stata quindi conservata in soluzione fisiologica (tempo di conservazione massimo 40 minuti). Si procede poi a lavaggio della placca e conservazione in terreno di cultura RPMI 1640 Medium (EuroClone Spa, Life Sciences Division, Italia) con 25 mM di HEPES che permette una maggior sopravvivenza cellulare fino al momento della disgregazione tissutale, la placca viene

quindi disgregata mediante BD Medimachine System (BD Biosciences, San Jose, CA, USA)(figura 3).



*Figura 3: immagini ottenute al microscopio ottico dell'omogenato dopo disgregazione (a:10X;b:40X)*

L'omogenato ottenuto viene poi ripetutamente filtrato usando i Filcons (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), filtri per purificare la sospensione cellulare con il diametro dei pori da 70, 50 e 30 $\mu$ m. Per la conta e la vitalità cellulare vengono prelevati 10  $\mu$ l di omogenato e si aggiungono 10  $\mu$ l di Trypan Blue (colorante in grado di penetrare in maniera selettiva all'interno di cellule necrotiche) Si prelevano 10  $\mu$ l della sospensione così ottenuta e si posizionano in una camera di Burker. Dopo la valutazione della vitalità e la conta cellulare, queste vengono messe in coltura in incubatore per 24 ore a 37°C in terreno di coltura RPMI 1640 con l'aggiunta del 20% di siero (FBS) e l'1% di antibiotico (streptomicina-penicillina). Dopo le 24 ore di coltura vengono separati i PMN effettuando il sorting positivo immuno-magnetico utilizzando il CD15. Dopo la separazione immuno-magnetica, è effettuata una conta dei PMN ottenuti usando la camera di Burker. In parte questi PMN vengono direttamente congelati a -80°C, la rimanente parte viene ulteriormente suddivisa in due campioni: Il primo campione viene messo in coltura per 24 ore a 37°C in incubatore in terreno RPMI 1640 con antibiotico all'1% ma senza siero in quanto quest'ultimo potrebbe interferire con le fasi successive, il secondo campione viene messo in



coltura per 24 ore a 37°C in incubatore in terreno RPMI 1640 con antibiotico all'1%, senza siero ma aggiungendo N-formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP 0,1 µM). Dopo il periodo di coltura quest'ultimi 2 campioni vengono centrifugati a 1400 G per 10 minuti e sia i pellets che il surnatante così ottenuti vengono congelati a -80°C per la successiva valutazione dell'espressione del mRNA di PTX3 e dell'IL8.

Il campione di sangue (10 ml) prelevato dal paziente prima di sottoporlo all'intervento chirurgico viene processato nel seguente modo al fine di separare i PMN:

1. Ogni campione di sangue viene diviso in 2 provette e diluito aggiungendo *phosphate buffered saline/bovine serum albumin* (PBS/BSA) 0,1% (diluizione 1:1)
2. In 4 provette il sangue diluito viene stratificato su Ficoll-Paque Plus (circa 2 ml)(GE Healthcare Life Sciences, USA), e centrifugato a 400 G per 40 minuti per permettere la stratificazione secondo gradiente.
3. Viene quindi recuperato il pellet eliminando il surnatante con l'uso di una pasteur di vetro e lavato con NaCl, centrifugando a 400G per 5 minuti.
4. Recuperato nuovamente il pellet, viene aggiunta una soluzione lisante per 10 minuti per eliminare i globuli rossi e successivamente si centrifuga a 400 G per 5 minuti
5. Si recupera il pellet, si sospende in 10 ml di NaCl e si procede alla conta.

La conta viene effettuata prelevando 10 µl del campione ed aggiungendo 10 µl di Turk (soluzione di acido acetico al 3% contenente un colorante: violetto di Genziana o blu di metilene) che ha il ruolo di colorare i nuclei e dalla soluzione così ottenuta vengono prelevati 10 µl e posizionati su una cameretta di Burker compiuto applicando la seguente formula:

$$\text{N}^\circ \text{ cellule di } 8 \text{ quadrati} \times 2 \text{ (16 quadrati in tutto)} \times 5 \text{ (ml di soluzione)} \times 10^4 \text{ (volume della camera di burker)}.$$

Una tipica preparazione di PMN (valutata mediante analisi citofluorimetrica) contiene circa il 95% di PMN puri e una vitalità (valutata mediante test di esclusione con Trypan blue) maggiore

del 99%. Dopo la conta cellulare, per ogni paziente un campione di cellule (2 milioni) viene congelato per la valutazione dell'espressione del mRNA dell'IL8.

Su tutti i campioni così ottenuti verrà svolta la real time PCR per valutare l'espressione dell'mRNA dell'IL8 ed elastasi.

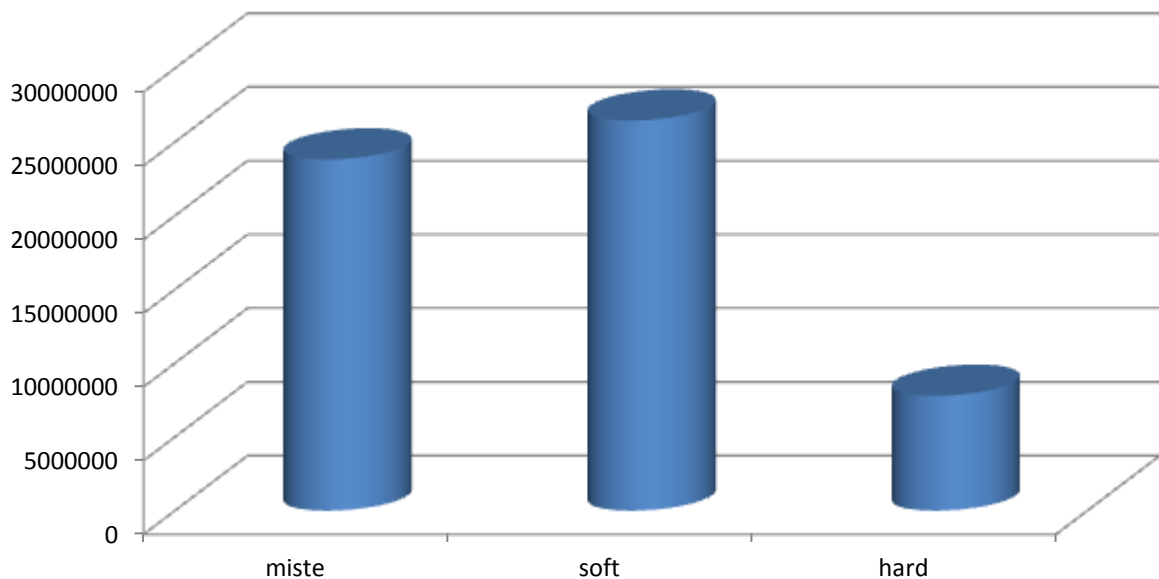
Una parte delle placche (16 campioni ) sono state inoltre analizzate mediante metodiche immunoistochimiche dal Consorzio M.I.A. (Facoltà di medicina e Chirurgia, Università di Milano Bicocca).

I dati inerenti la storia clinica dei pazienti, le comorbilità, i farmaci assunti nel preoperatorio, la tecnica chirurgica, la sintomatologia postoperatoria, eventuali eventi cardiaci e neurologici ed il quadro radiologico sono stati raccolti mediante un apposito database in ambiente Excel di Microsoft.

## Risultati

Nelle fasi i preliminari si è da subito evidenziato come le placche “soft” e” miste” abbiano un contenuto maggiore di cellule rispetto alle placche calcifiche “hard” (grafico 3).

Abbiamo riscontrato infatti una media di 26460454,55 cellule (range 4600000- 45000000) per le placche soft, 23816818,18 cellule (range 2200000-93400000 per le placche miste e solo 7786000 (range 4730000-13500000). La differenza tra le medie non è statisticamente significativa per  $p \leq 0.005$ .



*Grafico 3: numero totale cellule presenti nella placca.*

Dividendo i pazienti in sintomatici e asintomatici, si riscontra un maggior numero di cellule nei pazienti appartenenti al secondo gruppo (18676315,79 vs 26339333,33) (la differenza tra le medie non è statisticamente significativa per  $p \leq 0.005$ )

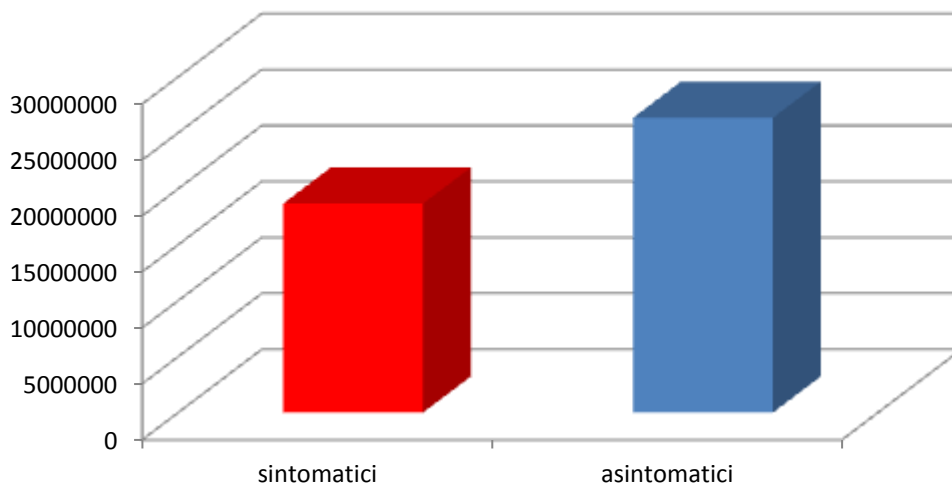


Grafico 4: numero totale cellule presenti nella placca( sintomatici vs asintomatici).

Suddividendo i valori ottenuti a seconda la presenza di sintomatologia e il tipo di placca si evince come nelle placche soft i pazienti asintomatici presentino un numero più elevato di cellule rispetto ai pazienti del secondo gruppo. Tale differenza è meno marcata nei gruppo misto e hard.

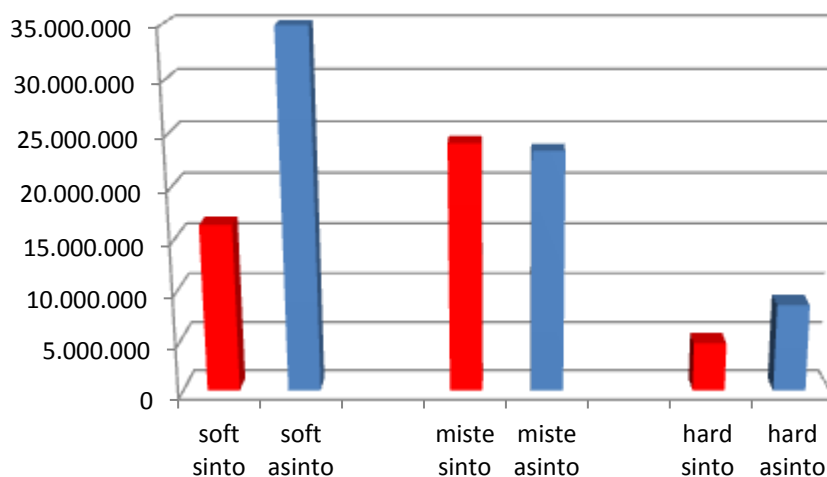
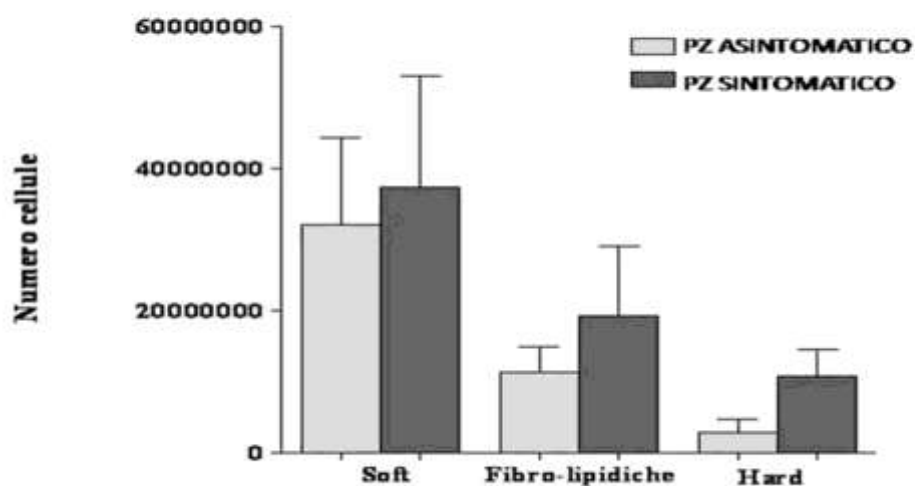


Grafico 5: numero totale cellule divisi per tipo di placca e sintomatologia.

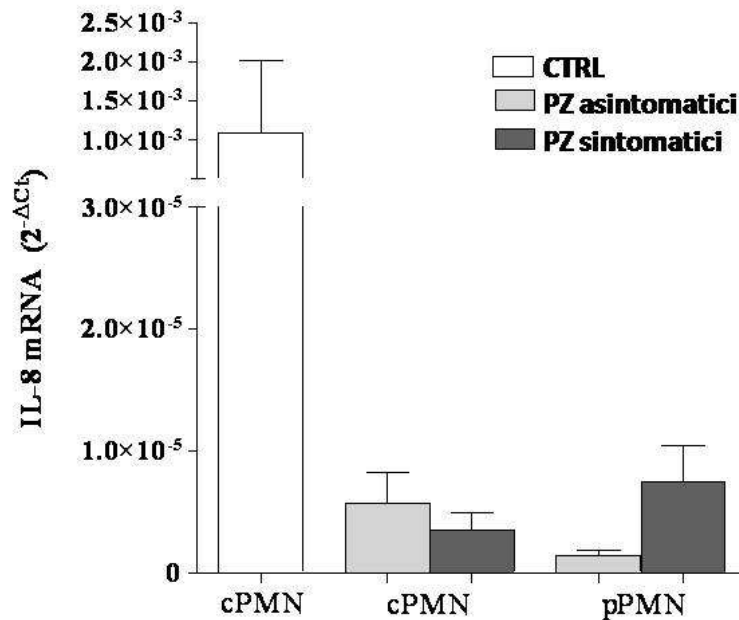
Da evidenziare come le placche hard sono state aggiunte nel grafico anche se l'esiguo numero di pazienti non permette di confrontare le medie. Nella prima fase dello studio i dati preliminari (con meno di 20 pazienti arruolati) avevamo osservato un maggior numero di cellule nei pazienti sintomatici rispetto al gruppo degli asintomatici a prescindere dal tipo di placca (grafico 4).



*Grafico 6: numero totale cellule divisi per tipo di placca e sintomatologia (risultati preliminari).*

Sulla base di tali dati avevamo ipotizzato che un maggior numero di cellule, a prescindere dal tipo, potesse essere correlato con una maggior instabilità della placca.

Mediante real time PCR si è quindi valutato l'espressione genica dell'interleuchina 8 (grafico 4) confrontando i valori con una popolazione sana composta da pazienti under 30 anni, non in terapia farmacologica e con anamnesi patologica prossima e remota silente.



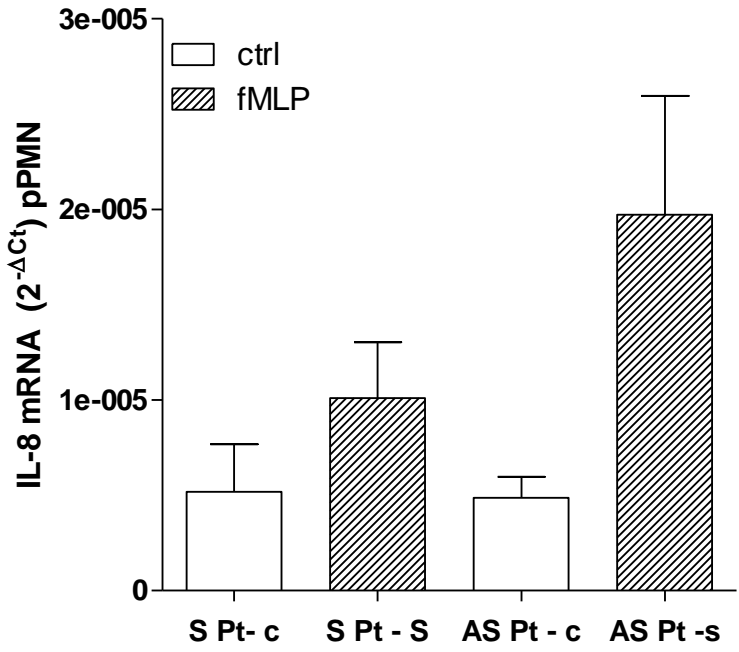
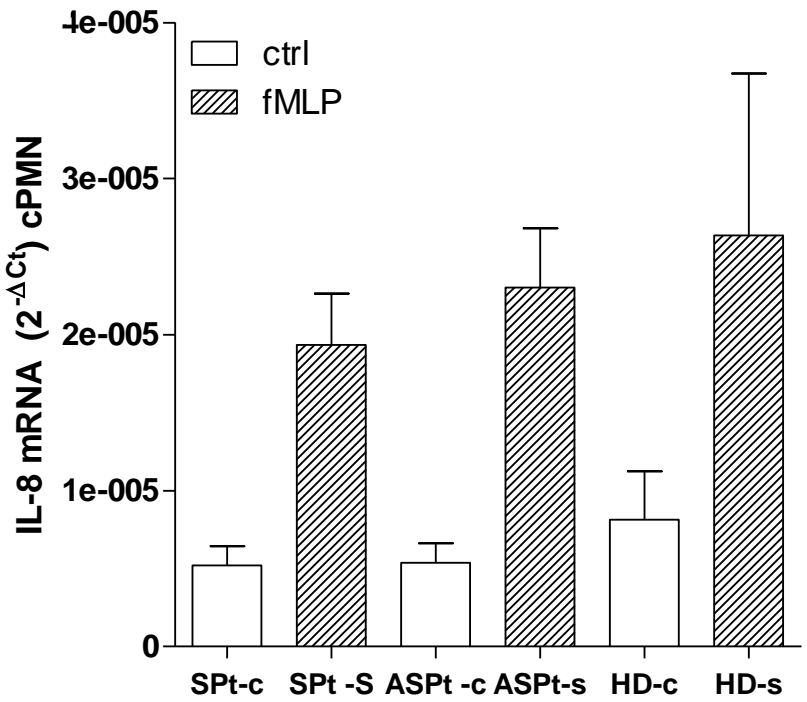
*Grafico 7: espressione di IL8 nella popolazione e nei controlli.*

Si evidenzia come l'IL-8 mRNA dei PMN è inferiore nel sangue dei pazienti della popolazione sia sintomatici che asintomatici rispetto ai controlli sani. Tale dato può essere causato dal trattamento farmacologico (antiaggregante + statina) a cui sono sottoposti tutti i pazienti arruolati nello studio.

Non esistono tuttavia evidenze circa un possibile ruolo benefico di tali livelli sub fisiologici di IL8. Evidenti ostacoli etici rendono impossibile lo studio di pazienti con placca carotidea non in trattamento medico.

Bisogna evidenziare come sia più espresso IL8 nelle placche dei pazienti sintomatici, questa osservazione potrebbe essere correlata con un processo infiammatorio nel contesto della placca più marcato a livello dei pazienti appartenenti a questo gruppo.

Mediante Real time PCR si è valutata quindi l'espressione genica di IL 8 basale e dopo stimolazione con fMLP sia nella popolazione sintomatica che asintomatica (grafico 8).



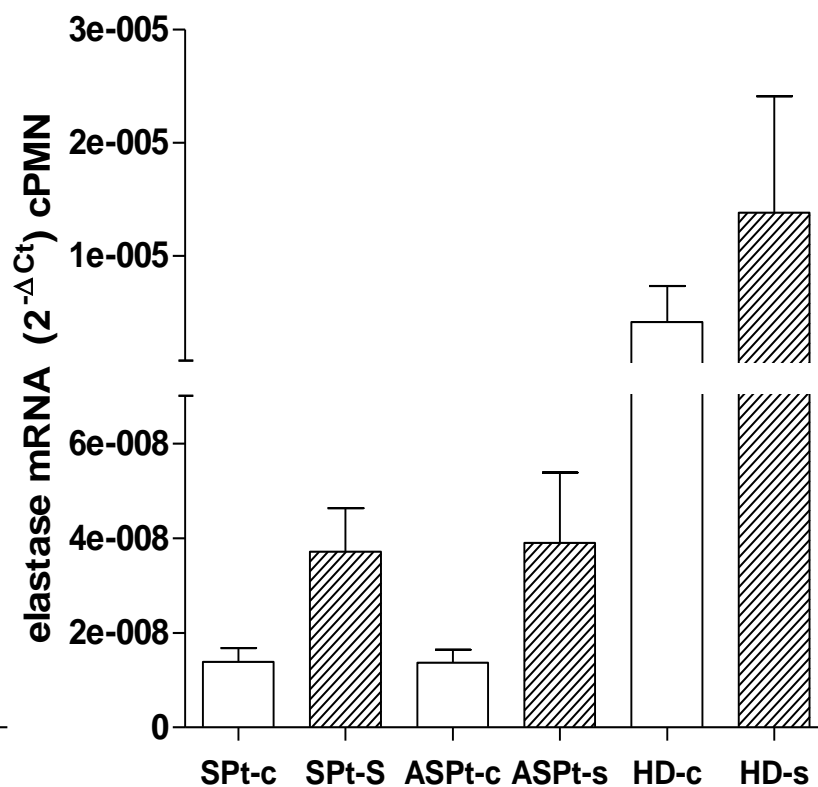
Grafici 6: espressione genica di IL8 basale e dopo stimolo con fMLP.

Si può osservare come esista una maggior espressione genica di IL-8 nei PMN circolanti dei controlli rispetto ai pazienti (sintomatici e asintomatici),

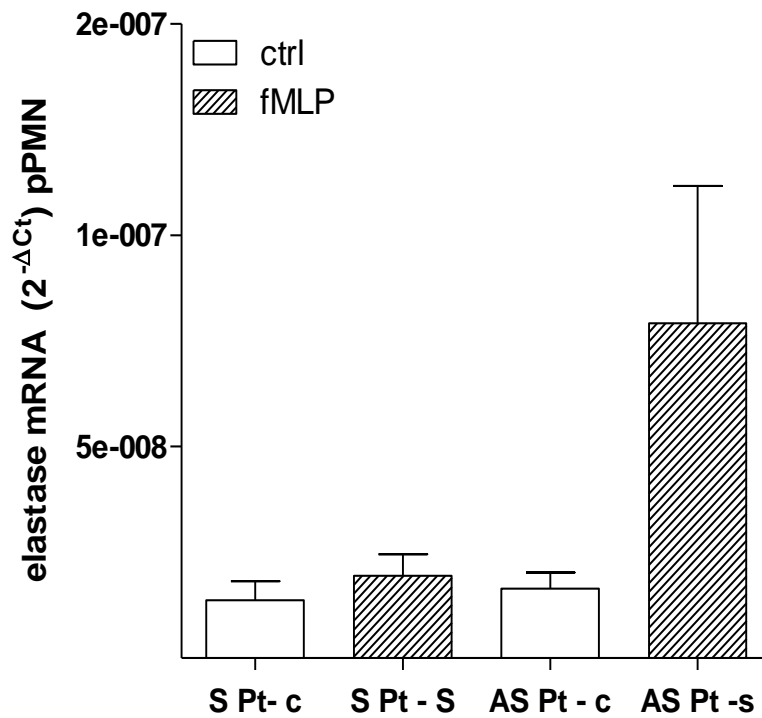
Inoltre abbiamo anche riscontrato una maggiore risposta dei cPMN rispetto ai pPMN dopo stimolazione con allo stimolo con N-formilmethionil-leucil-fenilalanina.

Confrontando i dati dei pazienti sintomatici ed asintomatici non abbiamo riscontrato differenze rilevanti per quanto riguarda l'espressione genica della citochina nei cPMN (né in basale, né dopo stimolazione). Anche per quanto riguarda l'espressione genica della citochina nei pPMN in condizioni basali non si osservano differenze fra i due gruppi di pazienti, si evidenzia però una maggiore responsività nel gruppo degli asintomatici dopo stimolazione.

Anche per l'elastasi si può osservare una maggior espressione genica nei PMN circolanti dei soggetti controllo rispetto ai pazienti. Inoltre, parallelamente a quanto osservato per l'interleuchina 8, possiamo osservare una maggiore responsività nei pazienti asintomatici (grafico 8,9).







Grafici 9: espressione genica di elastase basale e dopo stimolo con fMLP.

La maggior espressione a livello dei controlli sani può essere associata al regime terapeutico a cui sono sottoposti i pazienti sottoposti ad intervento di TEA carotidea. A livello dei pazienti trattati, si possono osservare differenza di espressione tra i PMN circolanti e gli intra placca.

I 16 campioni sottoposti a valutazione del Consorzio M.I.A. hanno evidenziato la presenza di un eterogeneo infiltrato infiammatorio e di neovasi.

Nella tabella si evidenzia un processo di neo angiogenesi più marcato a livello dei pazienti sintomatici rispetto agli asintomatici ( tabella 3). Si evidenzia maggior espressione CD66b+ PMN, CD68+ e CD163+ nei pazienti sintomatici, negli asintomatici si evidenziano scarsi CD66b+ e CD163+ (figure 4,5). Tale differenza rimarca la possibilità che i CD66b rivestano un ruolo fondamentale nella neovascolarizzazione di placca e quindi un ulteriore contributo all'instabilità di questa.

PATIENT	PLAQUE		CD66b	CD68	CD3	LINFO GENESIS	ANGIO GENESIS
	soft	hard					
sympto matic							
<b>1</b>	0	1	++	++	+	-	+++
<b>2</b>	0	1	+	++	+	-	++
<b>3</b>	1	0	++	+++	++	+	+++
<b>4</b>	1	0	++	++/+++	+/+++	+/ -	+++
<b>5</b>	1	0	++++	+++	+++	+++	+++
<b>6</b>	1	0	+/ -	+/+++	++	-	++
<b>7</b>	1	0	++	+++	++	+++	+++
<b>8</b>	1	0	+++	+++	++	+	++
<b>9</b>	1	0	+	+++	+++	+++	+++
<b>10</b>	1	0	+++	+++	+++	+++	+++
asympto matic							
<b>C.P.</b>	0	1	-	+++	+	++	+/ -
<b>11</b>	0	1	-	+/ -	+/ -	ND	++
<b>12</b>	1	0	+++	+++	+	+/ -	++
<b>13</b>	1	0	-	++	++	++	+
<b>14</b>	1	0		+	+/ -	-	+/+++
<b>15</b>	1	0	++	+/+++	+	+	+

*Tabella 3: caratteristiche delle pacche sottoposte a valutazione immunoistochimica: distribuzione delle componenti cellulari e valutazione dei processi neo angiogenetici e linfogenetici.*

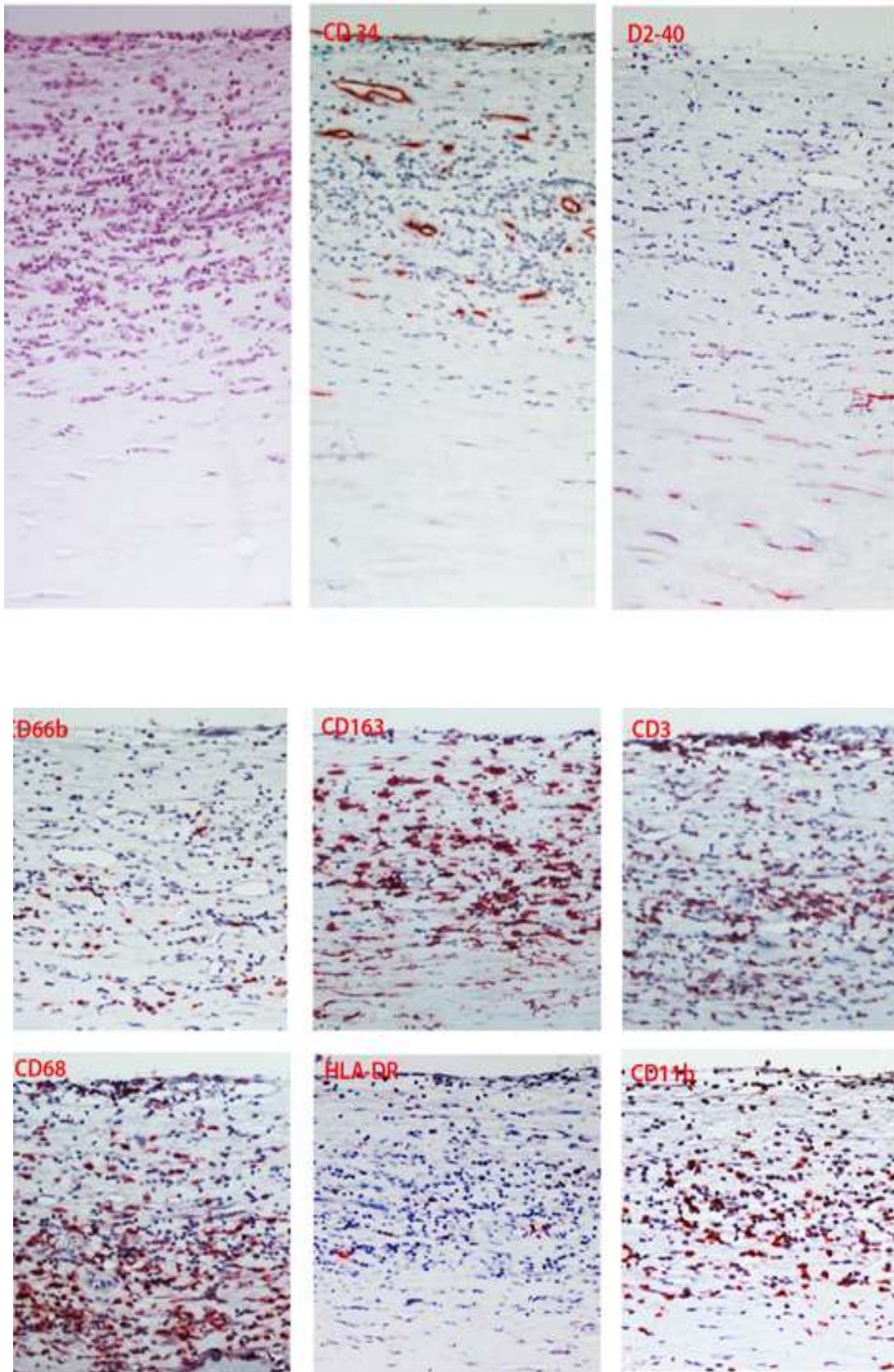
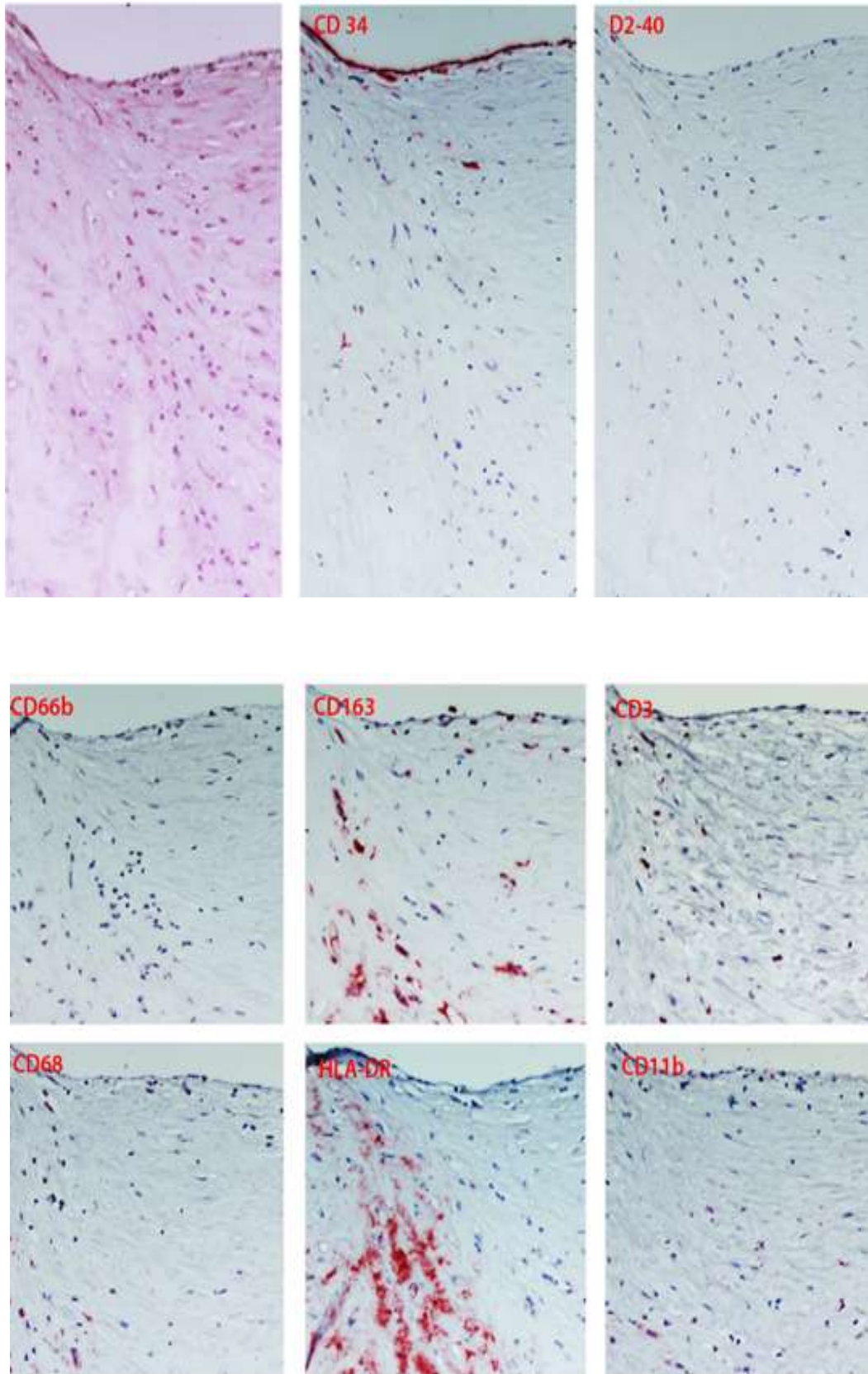


Foto 4: immagini immunoistoichimiche pazienti sintomatici.



*Foto 5: immagini immunoistoichimiche pazienti asintomatici.*

## **Discussione**

Differentemente da quanto evidenziato dai dati preliminari, sebbene l'esiguo numero di campioni non permette di eseguire un'analisi statisticamente significativa dei dati, non abbiamo ottenuto differenze tra popolazione sintomatica e asintomatica e tra le differenti tipologie di placca per quanto riguarda la popolazione cellulare. Il numero di cellule all'interno degli ateromi non appare infatti correlato con la sintomatologia e con la caratteristica morfologica di placca soft e mista. Appare più marcata la differenza con queste ultime e le placche hard.

Le immagini immunoistochimiche (sebbene di un campione ridotto della popolazione in oggetto) mostrano evidenti differenze per quanto riguarda l'espressione di alcuni antigeni. E' possibile ipotizzare che i PMN esprimano differenti antigeni a seconda della fase di progressione della malattia e che alle alterazioni macroscopiche di placche vulnerabili (microulcerazioni) evidenziabili mediante imaging o come reperto intraoperatorio, si associno anche differenze a livello della popolazione cellulare.

Dalle immagini si è inoltre evidenziata una differenza fra i gruppi di pazienti sintomatici vs asintomatici per quanto riguarda i processi di neoangiogenesi risultando più marcati fra i primi. Lo sviluppo di nuovi vasi sembra essere direttamente correlato con la produzione di interleuchina 8 <sup>56</sup>. Molti lavori, soprattutto in ambito oncologico, evidenziano infatti un'attività regolatoria in vivo sull'angiogenesi, mediante un'alterazione dell'espressione di alcuni geni anti-apoptotici con ricadute positive sulla sopravvivenza e sulla proliferazione delle cellule endoteliali e dall'altro lato il coinvolgimento di proteasi della matrice <sup>57</sup>.

Come si evince dal grafico 6 l'interleuchina 8 è sovra espressa a livello delle placche dei pazienti sintomatici rispetto ai pazienti asintomatici. Tale dato può potenzialmente dimostrare la presenza di un processo infiammatorio più marcato nei pazienti con pregressi deficit cerebrovascolari. Importante evidenziare come, oltre ai PMN, anche i linfociti T Natural Killer siano coinvolti della

sovraespressione dell'interleuchina 8, quindi sia cellule coinvolte nell'immunità innata che acquisita <sup>58</sup>.

La presenza di leucociti e quindi di un'attività infiammatoria a livello della placca aterosclerotica è stata riportata per la prima volta nel 1979 da Gerrity in seguito a studi effettuati su animali in cui veniva indotta, mediante regimi dietetici, un'elevata ipercolesterolemia <sup>59</sup>.

Numerosi studi hanno in seguito evidenziato questo dato, inizialmente ponendo l'attenzione unicamente sui macrofagi, in seguito evidenziando la presenza di plurime specie cellulari appartenenti al processo infiammatorio <sup>60,61</sup>.

Van der Wal <sup>56</sup> ha correlato la presenza di queste, in particolare i linfociti T, neutrofili e macrofagi, con la riduzione della stabilità della placca. Queste cellule hanno la capacità di produrre delle citochine ed enzimi proteolitici (es. urochinasi, plasmina, metalloproteinasi MMPs) nella matrice extracellulare.

Precedentemente Libby, nel 1996, aveva evidenziato il ruolo dei macrofagi, attivi nel processo di degradazione del collagene, nell'evoluzione della placca da stabile a vulnerabile <sup>63</sup>.

La produzione di IL-8 viene innalzata da alti livelli di LDL ossidate e da alte concentrazioni di glucosio fornendo in questo caso una potenziale spiegazione per l'associazione tra iperglicemia e aterosclerosi. Inoltre l'IL-8 può funzionare da chemoattrattante per le cellule-T, per i neutrofili e per i monociti circolanti. Essa ricopre un ruolo nell'angiogenesi, infatti può indurre la proliferazione e la migrazione delle cellule muscolari lisce vascolari ed induce una "down-regulation" degli inibitori tissutali delle metalloproteinasi 1 (TIMP-1), favorendo la generazione della placca aterosclerotica instabile.

Dato il ruolo di IL-8 nei processi infiammatori e nella formazione di lesioni aterosclerotiche ci si aspetterebbero livelli di IL-8 mRNA dei neutrofili maggiori in soggetti affetti da stenosi carotidea rispetto a soggetti sani. Nel nostro studio i livelli di mRNA risultano invece maggiori nel sangue di soggetti sani rispetto ai valori di mRNA dei soggetti affetti da stenosi carotidea

Questo dato può essere spiegato dal fatto che i pazienti arruolati assumono una terapia farmacologica per patologie cardiovascolari ( ad es.  $\beta$  bloccanti,  $Ca^{++}$  antagonisti, ACE inibitori, cardioaspirina, clopidogrel, statine ecc) per cui il processo infiammatorio risulta essere notevolmente ridotto.

In letteratura lo stesso dato si è evidenziato nello studio condotto presso la nostra Università in cui gli Autori hanno valutato l'espressione del recettore di tipo 1 dell'angiotensina (AT1R) e la produzione di IL-8 da parte dei PMN circolanti di soggetti affetti da patologia arteriosa periferica<sup>64</sup>.

Valutando il grafico 8 si osserva come l'espressione di IL-8 mRNA dei polimorfonucleati separati dal sangue e dalle cellule della lesione aterosclerotica carotidea risulti essere differente dopo stimolazione nei soggetti sintomatici rispetto a quelli asintomatici. Come già precisato tale dato potrebbe essere associato a terapie farmacologiche differenti, ma si può ipotizzare, nell'ambito delle complicanze cliniche, una differenziazione, seppur temporanea del comportamento fra i due campioni. Tale dato potrebbe essere il corrispettivo biologico di quanto si è osservato a livello clinico. Plurimi articoli in letteratura evidenziano come il beneficio della tromboendarterectomia nel prevenire recidive in pazienti con anamnesi positiva per TIA o ictus sia superiore alla terapia medica nelle prime 12 settimane <sup>65</sup>. Questo dato, in associazione a quanto sopra descritto circa l'attività infiammatoria intraplaacca, potrebbe significare come questi processi tendano ad avere un andamento temporale definito. Si può ipotizzare che nel breve termine la best medical therapy non sia in grado di fronteggiare un processo infiammatorio così marcato.

Tale dato appare sovrapponibile alla letteratura riguardante la placca aterosclerotica coronarica. Riesenber<sup>66</sup> ha valutato il rilascio di superossidi e di IL-8 in 15 pazienti colpiti da infarto miocardico acuto complicato e 15 pazienti colpiti da IMA non complicato: l'interleuchina 8 risulta molto più elevata nel primo gruppo. L'Autore descrive inoltre come tali livelli tendano a diminuire nelle ore successive all'evento acuto. Il- 8 potrebbe essere assunto come marker di

iper attivazione del processo infiammatorio responsabile di una serie completa di eventi che rende la placca “attiva” e quindi soggetta a potenziali complicanze correlate con eventi clinici acuti.



## **Bibliografia**

- 1) Setacci C, Ianza G, Ricci. SPREAD Italian Guidelines for stroke. Indications for carotid endarterectomy and stenting. *J Cardiovasc Surg* 2009apr 50(2): 171-82
- 2) Dennis MS, Burn JP, Sandercock PA et al. Long-term survival after first-ever stroke: the Oxfordshire Community Stroke Project. *Stroke*. 1993 Jun;24(6):796-800.
- 3) Gresham, GE.; Duncan, PW.; Stason, WB. et al Post-Stroke Rehabilitation. Clinical Practice Guideline, No. 16. U.S. Department of Health and Human Services. Public Health Service, Agency for Health Care Policy and Research; Rockville, MD: 1995. AHCPR Publication No. 95-0662.
- 4) Maggi S, Zucchetto M, Grigoletto F et al. The Italian Longitudinal Study on Aging (ILSA): design and methods. *Aging (Milano)*. 1994 Dec;6(6):464-73.
- 5) D'Alessandro G, Bottacchi E, Di Giovanni M, et al. Temporal trends of stroke in Valle d'Aosta, Italy. Incidence and 30-day fatality rates. *Neurol Sci*. 2000 Feb;21(1):13-8.
- 6) Nakajima K, Nakano T, Tanaka A. The oxidative modification hypothesis of atherosclerosis: the comparison of atherogenic effects on oxidized LDL and remnant lipoproteins in plasma. *Clin Chim Acta*. 2006;367:36-47.
- 7) Witztum JL, Berliner JA. Oxidized phospholipids and isoprostanes in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 1998;9: 441-448.
- 8) Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation*. 2002 Mar 5;105(9):1135-43. Review
- 9) Galkina E, Ley K. Vascular adhesion molecules in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27:2292-301.
- 10) Dhaliwal BS, Steinbrecher UP. Scavenger receptors and oxidized low density lipoproteins. *Clin Chim Acta*. 1999;286:191-205.
- 11) Guasti L, Marino F, Congiu T et al. Lamellar pattern of mineral calcium-phosphorus deposits in a human carotid plaque: nanoscale ultrastructure and elemental analysis. *Circulation*. 2010 May 4;121(17):1971-3.
- 12) Congiu T, Schembri L, Tozzi M et al. Scanning electron microscopy examination of endothelium morphology in human carotid plaques. *Micron*. 2010 Jul;41(5):532-6.
- 13) Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE et al. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation*. 1995 Sep 1;92(5):1355-74.

- 14) Cotran RS, Kumar V Collins T. Malattie Vascolari in Robbins SL et al:Le basi patologiche delle malattie. Piccinin Padova 582-597.
- 15) Libby P. Patogenesi, prevenzione e trattamento dell'aterosclerosi.In Harrison Principi di medicina interna. Mc Graw Hill (2008), pp1460-1467.
- 16) Fukumoto Y, Libby P, Rabkin E, Hill CC et al.Statins alter smooth muscle cell accumulation and collagen content in established atheroma of watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. Circulation. 2001 Feb 20;103(7):993-9.
- 17) Virchow R. Phlogose und thrombose in getissystem, gesammelte unhandlungen zur wissensehaftlichen medlein. Frankfurt-am-Main, Germany: Meidinger Sohn; 1856.
- 18) Von Rokitansky C. A Manual of Pathological Anatomy, Vol 4 [in orig lang]. London, UK: Sydenham Society; 1852.
- 19) Ross. R. and Glomset: The pathogenesis of atherosclerosis. N. Engl. J. Med. 1976;295: 369.
- 20) Davis MJ. Stability and instability: two faces of coronary atherosclerosis. The Paul Dudley White Lecture 1995.Circulation.1996;94:2013-2020.
- 21) Notarbartolo A. Patogenesi "colesterolica" o infiammatoria" dell'aterosclerosi: dilemma vero o fittizio? Ann Ital Med Int. 2005;20:63-68.
- 22) Collins R, Armitage J, Parish S et al.MRC/BHF Heart Protection Study of cholesterol-lowering with simvastatin in 5963 people with diabetes: a randomised placebo-controlled trial. Lancet 2002.361(9374): 2005-2016.
- 23) Sever PS, Dalhof B, Poulter NR et al. Prevention of coronary and stroke events with atorvastatin in hypertensive patients who have average or lower than average cholesterol concentrations, in the anglo-scandinavian cardiac outcomes trial. Lipid Lowering Arm (ASCOTT-LLA): amulticentre randomized controlled trial. Lancet 2003.361:1149-1158.
- 24) Colhoun HM, Betteridge DJ, Durrington PN et al. Primary prevention of cardiovascular disease with atorvastatin in type 2 diabetes in the Collaborative Atorvastatin Diabetes Study (CARDS): multicenter randomized placebo-controlled trial. Lancet 2004. 364:685-696.
- 25) Nissen SE, Tuzcu EM, Shoenhagen P et al. Effect of intensive compared with moderate lipid lowering therapy on progression of coronary atherosclerosis: a randomized controlled trial. JAMA 2004.291:1071-1080.
- 26) Nissen SE, Tsunoda T, Tuzcu EMK et al. Effects of recombinant ApoA-I Milano coronary atherosclerosis in patient with acute coronary syndromes. A randomized controlled trial. JAMA 2003). 290:2292-2300.
- 27) Shagen V, Britten MB, Elsner M et al. A positive family history of premature coronary artery diseaseis associated with impaired endothelium dependent coronaryblood flow regulation. Circulation 1999..100:1502-1508.

- 28) Iwasa F, Fan J, Shimokama T et al. Increased immunoreactivity of endothelin 1 and endothelin B receptor in human atherosclerotic lesions. A possible role in atherogenesis. *Atherosclerosis* 1999.146:93-100.
- 29) Xu CB, Zhang Y, Stenman E et al. D-Erythro-N,N-dymethylspingosine inhibits bFGF-induced proliferation on cerebral, aortic and coronary smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 2002.164:237-243.
- 30) Barani J, Nilsson JA, Mattiasson I et al. Inflammatory mediators are associated with 1 years mortality in critical limb ischaemia. *J Vasc Surg* 2005. 42:75-80.
- 31) Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ. Inflammation, aspirin and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy man (comments). *N Engl J Med* 1997.336:973-979.
- 32) Liuzzo G, Biassuccio LM, Gallimore JR. The value prognostic value of C-reactive protein and serum amyloid a protein in severe unstable angina. *N Engl J Med* 1994.331:417-424.
- 33) Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis . *Circulation* 2002.105:1135-1143.
- 34) Hansson GK. Immune mechanism in atherosclerosis. *Atheroscler Thromb Vasc Biol* 2001.21:1876-1890.
- 35) Lien E, Ingalls RR. Toll like receptors. *Crit Care med* 2002.30:S1-S11.
- 36) Broccolo F. Teorie patogenetiche della malattia aterosclerotica. In *Aterosclerosi*.2010. Cap 6:48-50.
- 37) Nieto FJ. Infections and atherosclerosis. New clues from an old Hypotesis? *Am J Epidemiol* 1998.148:937-948.
- 38) Fabricant CG, Fabricant J, Litrenta MM et al. Virus-induced atherosclerosis. *J Exp Med.* 1978 Jul 1;148(1):335-40.
- 39) Boman J, Hammerschlag MR. Chlamydia pneumoniae and atherosclerosis: critical assessment of diagnostic methods and relevance to treatment studies. *Clin Microbiol Rev.* 2002 Jan;15(1):1-20.
- 40) Mendall MA, Goggin PM, Molineaux N, Levy J, Toosy T, Strachan D, Camm AJ, Northfield TC. Relation of Helicobacter pylori infection and coronary heart disease. *Br Heart J.* 1994 May;71(5):437-9.
- 41) Mayr M, Metzler B, Kiechl S et al. Endothelial cytotoxicity mediated by serum antibodies to heat shock proteins of Escherichia coli and Chlamydia pneumoniae: immune reactions to heat shock proteins as a possible link between infection and atherosclerosis. *Circulation.* 1999 Mar 30;99(12):1560-6.

- 42) Balish MF, Krause DC. Cytoadherence and the cytoskeleton. In: Razin S, Herrmann R, editors. *Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers; 2002. pp. 491–518.
- 43) Zhu J, Quyyumi AA, Norman JE et al. Effects of total pathogen burden on coronary artery disease risk and C-reactive protein levels. *J Am Coll Cardiol*. 1999 Nov 15;34(6):1738-43.
- 44) Zhu J, Nieto FJ, Horne BD, Anderson JL et al. Prospective study of pathogen burden and risk of myocardial infarction or death. *Circulation*. 2001 Jan 2;103(1):45-51.
- 45) Rupprecht HJ, Blankenberg S, Bickel C et al. Impact of viral and bacterial infectious burden on long-term prognosis in patients with coronary artery disease. *Circulation*. 2001 Jul 3;104(1):25-31.
- 46) Mattila KJ, Nieminen MS, Valtonen VV et al. Association between dental health and acute myocardial infarction. *BMJ*. 1989 Mar 25;298(6676):779-81.
- 47) Desvarieux M, Demmer RT, Jacobs et al. Periodontal bacteria and hypertension: the oral infections and vascular disease epidemiology study (INVEST). *J Hypertens*. 2010 Jul;28(7):1413-21.
- 48) Terkeltaub R, Banka CL, Solan J et al. Oxidized LDL induces monocytic cell expression of interleukin-8, a chemokine with T-lymphocyte chemotactic activity. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 1994; 14: 47-53.
- 49) Parthasarathy S, Raghavamenon A, Garelnabi MO et al. Oxidized low-density lipoprotein. *Methods Mol Biol*. 2010;610:403-17.
- 50) Dollery CM, Owen CA, Sukhova GK et al. Neutrophil elastase in human atherosclerotic plaques: production by macrophages. *Circulation*. 2003 Jun 10;107(22):2829-36. Epub 2003 May 27.
- 51) Moreno JA, Ortega-Gómez A, Delbosc S et al. In vitro and in vivo evidence for the role of elastase shedding of CD163 in human atherothrombosis. *Eur Heart J*. 2012 Jan;33(2):252-63.
- 52) Bizbiz L, Bonithon-Kopp C, Ducimetière P et al. Relation of serum elastase activity to ultrasonographically assessed carotid artery wall lesions and cardiovascular risk factors. The EVA study. *Atherosclerosis*. 1996 Feb;120(1-2):47-55.
- 53) Liapis CD, Bell PR, Mikhailidis D, Sivenius J, Nicolaidis A, Fernandes e Fernandes J, Biasi G, Norgren L; ESVS Guidelines Collaborators. *ESVS guidelines. Invasive treatment for carotid stenosis: indications, techniques*. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2009 Apr;37(4 Suppl):1-19.
- 54) Gruppo Spread. *Ictus cerebrale. Linee guida italiane di prevenzione e trattamento*. Spread 6° edizione 2010.
- 55) Thomas T. de Weert, Mohamed Ouhlous, Erik Meijering. *In Vivo Characterization and Quantification of Atherosclerotic Carotid Plaque Components With Multidetector Computed*

Tomography and Histopathological correlation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26:2366-2372.

56) Kyriakakis E, Cavallari M, Pfaff D et al. IL-8-mediated angiogenic responses of endothelial cells to lipid antigen activation of NKT cells depend on EGFR. *J Leukoc Biol.* 2011 Nov;90(5):929-39.

57) Li A, Dubey S, Varney ML, Singh RK. Interleukin-8-induced proliferation, survival, and MMPproduction in CXCR1 and CXCR2 expressing human umbilical vein endothelial cells. *Microvasc Res.*2002; 64:476-81.

58) Kyriakakis E, Cavallari M, Andert J et al. Invariant natural killer T cells: linking inflammation and neovascularization in human atherosclerosis. *Eur J Immunol.* 2010 Nov;40(11):3268-79.

59) Gerrity RG, Naito HK, Richardson M, Schwartz CJ. 1979. Dietary induced atherogenesis in swine. Morphology of the intima in prelesion stages. *Am. J. Pathol.* 95:775–92.

60) Hansson GK, Libby P. 2006. The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nat. Rev Immunol.* 6:508–19.

61) Galkina E, Ley K. 2007. Leukocyte influx in atherosclerosis. *Curr. Drug Targets* 8:1239–48.

62) van der Wal AC, Becker AE. Atherosclerotic plaque rupture--pathologic basis of plaque stability and instability. *Cardiovasc Res.* 1999 Feb;41(2):334-44. Review.

63) Libby P, Geng YJ, Aikawa M et al. Macrophages and atherosclerotic plaque stability. *Curr Opin Lipidol.* 1996 Oct;7(5):330-5.

64) Marino F, Guasti L, Tozzi M et al. Angiotensin type 1 receptor expression and interleukin-8 production in polymorphonuclear leukocytes of patients with peripheral arterial disease. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2009 Dec;54(6):520-5.

65) Rothwell PM, Eliasziw M, Gutnikov SA, et al. Endarterectomy Trialists Collaboration. Rothwell PM, Eliasziw M, Gutnikov SA, Warlow CP, Barnett HJ. Endarterectomy for symptomatic carotid stenosis in relation to clinical subgroups and timing of surgery. *Lancet* 2004; 363: 915-924.

66) Riesenber K, Levy R, Katz A et al. Neutrophil superoxide release and interleukin 8 in acute myocardial infarction: distinction between complicated and uncomplicated states. *Eur J Clin Invest.* 1997 May;27(5):398-404.

