

**AGGIORNAMENTO**

# LA PLACCA ATEROSCLEROTICA VULNERABILE: UP-DATING DEI PIÙ RECENTI MECCANISMI CHE CONTRIBUISCONO ALLA FORMAZIONE DEL CORE NECROTICO

## The atherosclerotic plaque vulnerability: focus on the oxidative and endoplasmic reticulum stress in orchestrating the macrophage apoptosis in the formation of the necrotic core

**LUCIANO COMINACINI, CHIARA MOZZINI, ANNAMARIA FRATTA PASINI***Dipartimento di Medicina, Università di Verona, Sezione di Medicina Generale e Malattie Aterotrombotiche e Degenerative, Verona, Italia***SUMMARY**

The atherosclerotic plaque rupture and the thrombosis in the lumen, that are mostly determined by the expansion of the necrotic core (NC), are driven by various mechanisms, including accelerated macrophage apoptosis and defective phagocytic clearance (defective efferocytosis). Oxidative stress and endoplasmic reticulum (ER) stress are implicated in the expansion of the NC. In this report Authors focus on the promising results of the oxidative and ER stress in contributing to triggering and orchestrating the atherosclerotic plaque vulnerability.

**Keywords:** *Atherosclerosis, Apoptosis, Efferocytosis, Endoplasmic reticulum stress, Oxidative stress, Necrotic core, Vulnerable plaque.*

**Introduzione**

Sebbene la comprensione dei meccanismi alla base dell'instabilità della placca aterosclerotica sia da decenni uno dei più

ambiti obiettivi della ricerca cardiovascolare, ad oggi non sono disponibili risultati definitivi.

La placca instabile è caratterizzata dalla presenza di un alto contenuto di cellule infiammatorie, un core necrotico di notevoli dimensioni ricoperto da una sottile capsula fibrosa con un ridotto contenuto di cellule muscolari lisce e matrice extracellulare (1).

Altre caratteristiche comuni alla placca

*Indirizzo per la corrispondenza*

Luciano Cominacini

Piazzale L.A. Scuro, 10

37134 Verona

E-mail: luciano.cominacini@univr.it

instabile sono il rimodellamento espansivo del segmento arterioso, le cospicue dimensioni della placca, le emorragie intraplacca, la neovascolarizzazione, l'infiammazione della tonaca avventizia e le calcificazioni a spot (1).

Il meccanismo di rottura della placca che porta all'evento clinico, classicamente definito come un processo multi-step, prevede una prima fase di destabilizzazione, con assottigliamento del cappuccio fibroso attorno al core necrotico e a seguire, la rottura della placca stessa, con distruzione del cappuccio fibroso ed occlusione trombotica dell'arteria interessata (1).

La fase di destabilizzazione della placca instabile è perlopiù determinata dall'aumentata apoptosi delle cellule muscolari lisce e dei macrofagi a livello del cappuccio fibroso (2).

L'eccessiva attività apoptotica spesso associata ad inadeguata rimozione delle stesse cellule apoptotiche da parte dei fagociti (efferocitosi difettiva) ne favorisce la necrosi secondaria con aggregazione di materiale necrotico e la costituzione nel tempo di quella che è considerata la caratteristica peculiare della placca instabile, il core necrotico (2).

La conseguenza dell'accelerata apoptosi soprattutto macrofagica associata alla efferocitosi difettiva è l'espansione del core necrotico, un evento determinante nel processo che porta alla rottura della placca ed all'evento clinico (2).

In questo report, gli Autori si focalizzano sui meccanismi della formazione del core necrotico, concentrandosi soprattutto sui meccanismi che portano all'apoptosi macrofagica e sul ruolo emergente che stress ossidativo e stress del reticolo endoplasmatico hanno in tale ambito riferendosi ad una loro recente revisione sull'argomento (3) a cui si rimanda per una trattazione più dettagliata.

### **L'apoptosi macrofagica nella placca aterosclerotica: l'effetto sinergico dello stress del reticolo e dello stress ossidativo**

La progressione della placca è caratterizzata dall'apoptosi macrofagica. Nelle fasi iniziali non si evidenziano segni di necrosi macrofagica secondaria e le cellule apoptotiche vengono efficientemente rimosse attraverso il meccanismo di efferocitosi: questo processo caratterizza le lesioni cosiddette "early".

Sebbene il meccanismo di efferocitosi non sia ad oggi completamente chiarito, è verosimile che l'evento iniziale sia il riconoscimento di segnali "eat me", determinati dall'esposizione della fosfatidilserina sulle membrane delle cellule apoptotiche, che vengono internalizzate e rimosse da parte dei fagociti (2).

Il continuo "recruitment" di macrofagi e di altre cellule infiammatorie che divenute apoptotiche non possono essere rimosse adeguatamente a causa di una efferocitosi non adeguata, determina la loro necrosi secondaria, processo che contribuisce all'espansione del core necrotico (2).

Diversi fattori sembrano contribuire al processo di apoptosi dei macrofagi, in particolare, sta assumendo un ruolo importante lo stress del reticolo endoplasmatico (4). Il reticolo endoplasmatico è un organello che partecipa alla sintesi e al corretto ripiegamento delle proteine secretorie e di membrana. Vari insulti, tra cui lo stress ossidativo e l'alterazione dello stato redox cellulare, possono turbarne l'omeostasi portando ad accumulo di proteine mal ripiegate con successiva attivazione dell'Unfolded Protein Response (UPR) nel tentativo di ripristinare l'omeostasi cellulare. L'attività dell'UPR viene mediato da tre recettori transmembrana (4): la chi-

nasi del reticolo endoplasmatico (protein kinasi-like ER kinase, PERK), il fattore di trascrizione attivante il fattore di trascrizione 6 (transcriptional factor activating transcription factor 6, ATF6) e la kinasi 1 richiedente inositolo (inositol-requiring kinase 1, IRE1).

In condizioni basali, di non stress, questi recettori si mantengono in forma inattiva, legati ad una proteina chaperon glucosio-regolata del peso di 78 kDa (glucose regulated protein 78 kDa, GRP78 o BiP). In condizioni di stress, all'accumularsi di "unfolded proteins" i recettori transmembrana si dissociano da BiP ed attivano "signaling" intracellulari che riducono la sintesi proteica ed altri "pathways" intracellulari di sopravvivenza (4).

Al riguardo, ad esempio, PERK promuove vie antiossidanti, fosforilando direttamente il fattore di trascrizione NF-E2-related factor 2 (Nrf2) che dà inizio all'attivazione delle sequenze Antioxidant Related Elements (ARE), che codificano per proteine antiossidanti ed enzimi detossificanti.

Al contrario, nel caso di abnorme stress cellulare, e quindi di incapacità da parte dell'UPR di una risposta di sopravvivenza, si innesca la via mediata dalla proteina omologa C/EBP (C/EBP homologous protein, CHOP), che promuove l'apoptosi.

Nella patologia aterosclerotica e in particolare nell'instabilità di placca, lo stress del reticolo endoplasmatico gioca un ruolo cruciale: infatti, sono stati dimostrati bassi gradi di apoptosi e di necrosi in placche di topi transgenici LDLr<sup>-/-</sup> "lacking" CHOP (2). Inoltre, di particolare importanza è stato lo studio effettuato da Myoishi (5), che ha evidenziato aumentata espressione di CHOP e di apoptosi nei punti di rottura di placche aterosclerotiche coronariche umane.

Recentemente in quest'ambito è stato dimostrato dagli Autori (6) che la cosid-

detta "area attorno al core necrotico" (tissue around the necrotic core, TANC) di placche carotidee instabili umane è caratterizzata da un aumentato numero di cellule apoptotiche di derivazione macrofagica e da un'aumentata espressione genica e proteica di proteine pro-apoptotiche.

La stessa cosa però non accadeva nelle zone più periferiche della placca. Nella area TANC si osservava un marcato aumento dell'espressione di CHOP mentre in periferia prevalevano PERK e altri marcatori di vie di sopravvivenza legate all'UPR. Questi risultati dimostrano che lo stress del reticolo endoplasmatico può sostanzialmente promuovere l'abnorme apoptosi macrofagica e quindi la necrosi secondaria a livello dell'area TANC, favorendo così, per vicinanza l'espansione del core necrotico.

Si è visto che ciò che scatena la risposta UPR ed eventualmente poi l'apoptosi reticolo-correlata, appartiene a quella serie di composti che caratterizza le placche "advanced", e cioè elevati livelli intracellulari di colesterolo libero, oxisteroli, LDL ossidate, fosfolipidi ossidati e, come dimostrato dagli Autori recentemente (6) anche derivati ossidati di acidi grassi poliinsaturi, che possono scatenare lo stress del reticolo ed attivare l'apoptosi macrofagica legandosi al recettore del trombossano ed al recettore G2A. È evidente quindi la stretta relazione e sostanzialmente la sinergia che esiste tra stress ossidativo e stress del reticolo nell'orchestrare l'apoptosi macrofagica a livello della placca vulnerabile. È verosimile che in questa sinergia un ruolo centrale venga svolto dalla nicotinamide adenina dinucleotide fosfato (NADPH) ossidasi, l'inibizione della cui subunità Nox2 porta a diminuzione dell'apoptosi macrofagica indotta dallo stress del reticolo (7).

Se sovraespressa, la NADPH ossidasi ulteriormente promuove i processi di

apoptosi attraverso l'attivazione di meccanismi PERK e CHOP-dipendenti (7).

È noto che lo stress ossidativo ed in particolare la produzione di Specie Reattive dell'Ossigeno (ROS) sono potenti attivatori dell'UPR (8).

Il corretto stato redox a livello luminale del RE, contribuisce al corretto ripiegamento proteico.

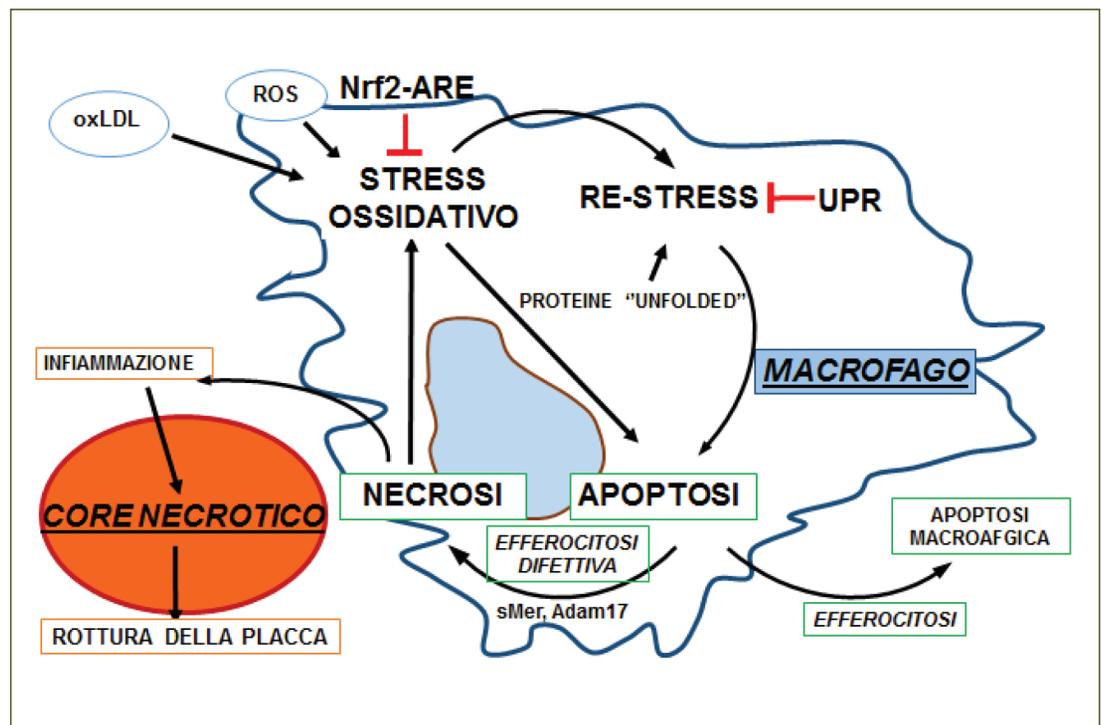
### Il punto sull'efferocitosi difettiva

Come in precedenza accennato, i fagociti sovraccaricati dall'eccessiva apoptosi non sono in grado di effettuare una adeguata efferocitosi (2), che pertanto diviene difettiva, meccanismo che porta inevitabilmente ad un aumento del processo di necrosi.

I fagociti devono riconoscere specifici segnali di "eat me" sulle cellule apoptotiche, e la fosfatidilserina è il principale di questi segnali; a sua volta i fagociti possiedono recettori che legano in modo specifico la fosfatidilserina (9).

Gli Autori si sono soffermati su questo argomento (10) analizzando l'effetto di alcuni composti ossidati su tali recettori, nell'ambito dei processi di efferocitosi difettiva che contribuiscono all'espansione del core necrotico.

I recettori TAM (Tyro 3, Axl and Mer tyrosine kinase, Mertk) sono molecole di superficie dei fagociti che agiscono come recettori implicati nei processi di riconoscimento delle cellule apoptotiche (9). Tra di essi il principale risulta essere il recettore Mertk. Il ligando del recettore Mertk è



**Figura I** - Panoramica dei principali elementi analizzati che contribuiscono alla formazione del core necrotico. Legenda: Ox-LDL: LDL ossidate; ROS: Specie Reattive dell'Ossigeno; Nrf2/ARE: fattore di trascrizione NF-E2-related factor 2/Antioxidant Related Genes; RE: Reticolo Endoplasmatico; UPR: Unfolded Protein Response; sMER; forma solubile di Mer tyrosine kinase, Mertk; Adam 17: metallopeptidasi dominio 17.

Gas 6, una molecola ponte che si lega da una parte alla fosfatidilserina sulla membrana della cellula apoptotica e dall'altra al dominio extracellulare del recettore Mertk sulla membrana dei fagociti.

Il clivaggio mediante metalloproteinasi del dominio extracellulare di Mertk porta ad una forma solubile di Mertk (sMer), che può agire come inibitore competitivo di Mertk agendo da "esca" al proprio ligando Gas 6 (9).

Poiché l'efferocitosi difettiva ha un ruolo importante nell'espansione del core necrotico, gli Autori si sono focalizzati sull'analisi dei recettori TAM ed in particolare Mertk, su Gas 6 e sulla metalloproteinasi Adam 17, sia nelle aree TANC che in periferia di placche carotidiche provenienti da pazienti sottoposti ad endoarteriectomia carotidea (10).

Con metodica di immunoistochimica, gli Autori hanno dimostrato che Mertk e Adam 17 risultavano maggiormente espressi nell'area TANC, rispetto alla periferia della stessa placca carotidea. Mertk risultava più espresso di Adam 17 nell'area TANC più prossima al lume, ma era sostanzialmente assente vicino al core necrotico pur in presenza di eccesso di RNA.

Questi dati risultavano abbastanza inaspettati, così si è ipotizzato che dove sono massime le concentrazioni di Adam 17, lì c'è una riduzione del dominio extracellulare di Mertk.

Quindi l'area attorno al core necrotico può contenere sostanze inducenti Adam 17 e l'enzima può rilasciare il dominio extracellulare di Mertk inattivando il recettore e favorendo l'efferocitosi difettiva. E infatti, nello studio effettuato, l'estratto di

TANC conteneva moltissimi derivati ossidati di acidi grassi poliinsaturi, potenti induttori di Adam 17.

Alla fine di tutti questi processi, vi sarebbe l'inattivazione di Mertk, la formazione di sMer e la minor disponibilità di Gas6, col risultato che verrebbe attivata un'efferocitosi non adeguata e di conseguenza una maggior espansione del core necrotico.

## Conclusione

Gli Autori hanno esaminato una delle caratteristiche peculiari della placca vulnerabile: la formazione del core necrotico, la cui espansione riveste un ruolo determinante nella rottura della placca stessa e nella trombosi acuta del lume.

Sulla base dei dati presenti in letteratura e delle recenti proprie acquisizioni, hanno cercato di far emergere i promettenti contributi che stress ossidativo e stress del reticolo endoplasmatico hanno in quest'ambito, considerando il ruolo centrale del macrofago e dei processi di apoptosi e di efferocitosi (difettiva e non) che conferiscono a tale cellula un ruolo centrale nell'espansione di ciò che caratterizza la placca vulnerabile, il core necrotico.

Consapevoli che l'argomento non è in alcun modo concluso, scopo di questo report è fornire un nuovo punto di vista sui complessi meccanismi che portano all'instabilità di placca.

La *figura 1* mostra una panoramica dei principali elementi che contribuiscono alla formazione del core necrotico, qui analizzati.

**RIASSUNTO**

Gli Autori hanno esaminato una delle caratteristiche peculiari della placca vulnerabile: la formazione del core necrotico, la cui espansione riveste un ruolo determinante nella rottura della placca e nella trombosi acuta del lume. Sulla base dei dati presenti in letteratura e delle recenti proprie acquisizioni, si focalizzano sui promettenti contributi che stress ossidativo e stress del reticolo endoplasmatico hanno in quest'ambito, considerando il ruolo centrale del macrofago e dei processi di apoptosi e di efferocitosi (difettiva e non) che conferiscono a tale cellula un ruolo centrale nell'espansione di ciò che caratterizza la placca vulnerabile.

**Parole chiave:** *Aterosclerosi, Apoptosi, Efferocitosi, Stress del reticolo endoplasmatico, Stress ossidativo, core necrotico, Placca vulnerabile.*

**Bibliografia**

1. Falk E, Nakano M, Bentzon JF, Finn AV, Virmani R. Update on acute coronary syndromes: the pathologists' view. *Eur Heart J.* 2013; 34: 719-28.
2. Tabas I. Consequences and therapeutic implications of macrophage apoptosis in atherosclerosis: the importance of lesion stage and phagocytic efficiency. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005; 25: 2255-64.
3. Cominacini L, Garbin U, Mozzini C et al. The atherosclerotic plaque vulnerability: focus on the oxidative and endoplasmic reticulum stress in orchestrating the macrophage apoptosis in the formation of the necrotic core. *Current Med Chemistry.* 2015; 22: 1565-72.
4. Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007; 8: 519-29.
5. Myoishi M, Hao H, Minamino T et al. Increased endoplasmic reticulum stress in atherosclerotic plaques associated with acute coronary syndrome. *Circulation.* 2007; 116: 1226-33.
6. Garbin U, Stranieri C, Pasini A et al. Do oxidized polyunsaturated fatty acids affect endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in human carotid plaques? *Antioxid Redox Signal.* 2014; 21: 850-8.
7. Li G, Scull C, Ozcan L. NADPH oxidase links endoplasmic reticulum stress, oxidative stress, and PKR activation to induce apoptosis. *J Cell Biol.* 2010; 191: 1113-25.
8. Higa A, Chevet E. Redox signalling loops in the unfolded protein response. *Cell Signal.* 2012; 24: 1548-55.
9. Lemke G, Rothlin CV. Immunobiology of the TAM receptors. *Nat Rev Immunol.* 2008; 8: 327-36.
10. Garbin U, Baggio E, Stranieri C et al. Expansion of necrotic core and shedding of MerTK receptor in human carotid plaques: a role for oxidized polyunsaturated fatty acids? *Cardiovasc Res.* 2013; 97: 125-33.