

## TECNICHE DIAGNOSTICHE

# BIOMARCATORI

DAVIDE NOTO

La ricerca di biomarcatori in medicina è un campo in continua espansione, proporzionalmente allo sviluppo di nuove tecnologie che rendono maggiormente fruibili esami sofisticati ad una piattaforma di utenti sempre più vasta. Tecnologie come la “*next generation sequencing*” e la “*high density SNP genotyping*” hanno rivoluzionato il campo della genetica, mentre l’abbattimento dei costi degli strumenti di spettrografia in tandem massa hanno dato la possibilità di ricercare metaboliti in ogni matrice biologica accessibile all’ esame. L’utilizzo di biomarcatori trova il suo campo naturale nello studio delle malattie multifattoriali, come in oncologia o nella aterosclerosi, patologie dove ognuno degli elementi fisiopatologici può essere investigato attraverso l’identificazione degli opportuni marcatori. I biomarcatori possono essere divisi in base alla loro natura in: biochimici, genetici e cellulari, ma data la complessità dell’argomento, questa trattazione comprenderà solo i marcatori biochimici cercando di rispettare la categorizzazione per funzione biologica.

### Marcatori Lipoproteici

Apolipoproteina A1 (apoA1) e apolipoproteina B (apoB): i dosaggi della apoA1 e apoB sono stati utilizzati come misure alternative ai classici parametri lipidici (1-3).

Poiché la apoB è la proteina costituente delle VLDL, IDL e LDL, tale parametro misura sia la componente LDL che quella delle lipoproteine ricche in Trigliceridi (TRL). In tal modo questo parametro incorpora in sé sia il rischio legato alle LDL che quello legato ai disturbi metabolici che aumentano anche le TRL, come la sindrome metabolica ed il diabete mellito, sia condizioni genetiche come la iperlipidemia familiare combinata caratterizzate da malattia cardiovascolare (CV) precoce in molti casi. Studi di popolazione hanno mostrato come la apoB possa rappresentare un predittore indipendente di rischio CV (1-3). In relazione ai loro effetti opposti sul rischio CV apoB e apoA1 combinati si sono dimostrati predittori di rischio nello studio INTERHEART, che ha anche mostrato come l’apoB sia un predittore migliore rispetto al non-HDL-Colesterolo (2).

Fosfolipasi A2 associata alle lipoproteine (Lp-PLA2): la Lp-PLA2 è una fosfolipasi secreta da cellule infiammatorie, che si ritrova in elevata concentrazione all’interno di placche ateromasiche instabili, aggravando il danno ossidativo attraverso la lisi di lipoproteine ossidate. Il ruolo predittivo della Lp-PLA2 non è ben chiaro (1-4), ma una revisione meta-analitica sembra dimostrare una correlazione positiva con la malattia CV (5). Tuttavia, lo studio MESA ha mostrato che buona parte del

potere predittivo dipende dalla associazione della Lp-PLA2 con fattori di rischio classici (5).

Lipoproteine ossidate: le lipoproteine ossidate si ritrovano in elevata concentrazione nella placca ateromasica, dove si formano per meccanismi ossidativi "in loco". Una volta ossidate le lipoproteine possono

essere internalizzate con maggiore facilità dai macrofagi di placca attraverso una serie di recettori "scavenger", come SR-A, SR-B1, CD36 LOX-1, e FEEL-1/FEEL-2 (3, 4, 6). Tra i prodotti di ossidazione più utilizzati come biomarcatori ci sono i fosfolipidi (oxPL) che sono stati dosati associati sia all'apoB (oxPL-apoB) che alla apolipoproteina

**Tabella I - Elenco dei principali Biomarcatori correlati alla malattia aterosclerotica.**

Biomarcatori	Aspetti positivi	Limiti
<b>Marcatori lipoproteici</b>		
Apolipoproteine A1 e B	Facilità di dosaggio, e standardizzazione della procedura diagnostica. Associazione con la aterosclerosi. Potere prognostico accertato.	Le apo sono altamente correlate ad HDL- e non HDL-colesterolo, di più facile dosaggio
Lp-PLA2	Associazione con la aterosclerosi.	Correlata con hs-PCR che può spiegare parte del rischio.
Lipoproteine ossidate	Associazione con la aterosclerosi. Gli ox-PL legati all'apoB e all'apo(a) sono predittori indipendenti di malattia CV.	Dosaggio dei fosfolipidi ossidati di non semplice esecuzione. Ox-PL aumentati in condizioni di infiammazione, altamente correlati alla Lipoproteina(a) che può spiegare parte del rischio.
<b>Marcatori di stress ossidativo non lipoproteici.</b>		
Mieloperossidasi e metalloproteinasi	Associazione con l'aterosclerosi dimostrata in numerosi studi	Risultati non consistenti a causa della elevata correlazione con parametri infiammatori. Modificate dagli stati flogistici di diversa natura.
<b>Marcatori di Infiammazione</b>		
PCR ad alta sensibilità	Facilità di dosaggio, e standardizzazione della procedura diagnostica. Rappresenta il biomarcatore più studiato con associazione alla malattia ed agli eventi CV dimostrata sia trasversalmente che prospetticamente	Non predittiva nella aterosclerosi precoce asintomatica e nella progressione di placca in fase iniziale. Modificata dagli stati flogistici di diversa natura.
Citochine (IL-1, IL-6, IL-18, MCP-1)	Ruolo causale dimostrato per la genesi e la progressione delle lesioni aterosclerotiche Le IL sono correlate alla estensione ed alla progressione delle placche coronariche La antagonizzazione della IL-1 con il canakinumab ha dimostrato una riduzione prospettica degli eventi CV indipendente dai fattori di rischio CV classici	Elevata inter-correlazione tra citochine diverse e con altri marcatori infiammatori ed ossidativi. Modificate dagli stati flogistici di diversa natura.
Pentraxina 3	Associata alla presenza di aterosclerosi coronarica	Gli studi indicano una associazione con la instabilità di placca e non sulla sua presenza o estensione. Più utile in casi di angina instabile che nella coronaropatia stabilizzata.

Biomarcatori	Aspetti positivi	Limiti
<b>Marcatori coagulativi</b>		
Fibrinogeno	Facilità di dosaggio, ma non completamente standardizzato. Diversi studi trasversali e prospettici dimostrano l'associazione del Fib con la malattia e gli eventi CV	La correzione per i fattori di rischio tradizionali indebolisce parecchio la forza della associazione del Fib con la malattia CV.
D-dimero, fattore di von Willenbrandt, Inibitore del PAI-1.	Associati alla malattia CV	Altamente influenzati da patologie infiammatorie, trombotiche acute, sepsi. Associati a fattori di rischio tradizionali.
<b>Marcatori cardiologici</b>		
Troponine T e I, NT-pro-BNP	Di comune utilizzo in diagnostica cardiologica, ma associati anche prospetticamente ed eventi CV futuri	Altamente influenza da eventi CV acuti o subacuti e dalla patologia cardiaca preesistente.
<b>Altri Marcatori</b>		
Trimetilammina ossidata	Marcatore associato allo sviluppo di malattia CV ma anche ad ipertensione arteriosa e diabete. Primo "link" che unisce la alimentazione e la malattia CV in modo diretto.	Dosaggio in spettrometria di massa o con tecniche di non facile esecuzione. Influenzato da diversi parametri ossidativi e dalle capacità cataboliche dell'organismo.
sideremia, ferritinemia, Selectine, ICAM-1, Calgranuline, Galectina 3, GDF-15, adipochine.	Marcatori associati in vario modo alla presenza ed agli eventi CV.	In molti casi gli studi non sono ancora conclusivi per quanto riguarda il loro ruolo predittivo indipendente e la loro associazione alla malattia CV.

teina (a), [oxPL-apo(a)], risultando altamente correlati alla malattia CV (7).

### Marcatori di stress ossidativo non lipoproteici

Tra i marcatori di stress ossidativo possono essere annoverate le metalloproteinasi di matrice (MMP), che agiscono degradando la matrice extracellulare, e la mieloperoxidasi (MPO), un enzima prodotto dai leucociti che genera un potente agente ossidante, l'acido ipoclorico. Sia le MMP-9 e MMP-2 che la MPO sono state riscontrate in elevata concentrazione nelle placche instabili, dove contribuiscono alla degrada-

zione strutturale delle stesse, ma il loro potere predittivo sugli eventi CV si è dimostrato incostante nei vari studi, anche a causa della loro forte correlazione con i fattori di rischio infiammatori (1, 3, 6).

### Marcatori di Infiammazione

Proteina C Reattiva (PCR): la PCR ad alta sensibilità (hs-PCR) rappresenta uno dei marker sierologici più studiati, e fra quelli maggiormente predittivi di MCV ed eventi CV. Nel trial JUPITER (8), i livelli di hs-PCR hanno permesso di identificare i soggetti ad alto rischio cardiovascolare che avrebbero subito più eventi CV negli

anni successivi, identificando un valore soglia di hs-PCR di 2 mg/L che ha mostrato un rischio CV molto più elevato per i soggetti al di sopra di tale soglia. Diversi studi hanno mostrato come livelli elevati di PCR sono collegati a un aumento di mortalità CV, per tumori e totale (1-4, 6).

**Citochine:** Le interleuchine (IL) sono citochine infiammatorie generate dalle cellule infiammatorie del sistema immunitario con funzioni regolatorie (2-4, 6). La IL-6 è una molecola pro-infiammatoria che determina una cascata attivatoria di vari elementi del sistema immunitario. La IL-6 sta correlata positivamente ed indipendentemente da fattori di rischio classici al rischio eventi futuri (2) e si è dimostrata correlata al rischio di stenosi critiche in soggetti che venivano sottoposti ad angiografia coronarica (2).

La IL1 e la IL18 appartengono alla famiglia della IL-1 (2), e sono attivate enzimaticamente dalla caspasi-1 e presentano struttura simile. La interleuchina 1 $\beta$  viene definita la IL “primordiale” ed il suo legame con il recettore è divenuto target terapeutico dell’anticorpo monoclonale canakinumab nel trial CANTOS (9), che ha mostrato una riduzione del 15% di eventi CV gravi nei 3.7 anni di trattamento indipendentemente dal controllo degli altri fattori di rischio, dimostrando come l’antagonizzazione del “*pathway*” infiammatorio riduca gli eventi CV. Anche la “*monocyte chemoattractant protein 1*” (MCP-1) fa parte della famiglia delle citochine. La MCP-1 si è dimostrata elevata nel plasma di pazienti con sindrome coronarica acuta (SCA) e si è dimostrata predittore indipendente di eventi CV fatali e non fatali post-SCA (3).

**Pentraxina 3 (PTX-3):** La PTX-3 presenta elevata similarità con la PCR appartenendo alla famiglia delle PTX. La PTX-3 è una proteina di fase acuta, e si ritiene sia

secreta prevalentemente nei siti di infiammazione localizzata come le placche aterosclerotiche (4, 6). I livelli di PTX-3 sembrano maggiormente correlati alla presenza di pacche instabili, probabilmente in relazione al maggiore grado di infiammazione vascolare (4,6). L’osservazione che la PTX-3 non sembri aumentata nella angina stabile, ma in presenza di angina instabile, suggerisce la PTX-3 possa essere utilizzata come misura della instabilità di placca più che della presenza di aterosclerosi (6).

### **Marcatore Coagulativi e Trombotici**

**Fibrinogeno (Fib):** il Fib è il diretto precursore della fibrina, e pertanto aumentati livelli suggerirebbero una maggiore possibilità di trombosi intra-vascolari. In realtà il Fib è modificato da vari fattori essendo una proteina di fase acuta, ma è stato comunque correlato ad un aumentato rischio CV (1, 2, 4), mentre lo studio Framingham Offspring Population (10) ha mostrato come il rischio CV conferito dal Fib sia legato alla sua associazione con altri fattori di rischio classici.

**Omocisteina (Omo):** La Omo è un aminoacido plasmatico che quando è presente a livelli elevati è associato ad una maggiore prevalenza di aterosclerosi ma anche di eventi CV come SCA ed infarto miocardico ricorrente, aterosclerosi carotidea e ictus ischemico (2, 3). Livelli elevati di Omo sono determinati in buona parte da varianti polimorfiche del gene *MTHFR*, che sembrerebbe il vero responsabile del rischio CV attribuibile alla Omo, considerato anche che la riduzione dei livelli di Omo con vitamina B6 e B12 non sembra avere un effetto chiaro sulla riduzione del rischio CV (2, 3).

Altri marcatori coagulativi e/o trombotici: altri biomarcatori sono stati presi in considerazione come predittori od associa-

ti al rischio CV, in particolare i livelli di D-dimero (1, 4), fattore di von Willenbrandt (4) e l'Inibitore del PAI-1 (4) che hanno mostrato risultati non sempre consistenti anche a causa della stretta interconnessione con altri fattori di rischio (4).

### Marcatori Cardiologici

Troponine I e T (Tn-I e Tn-T) e frammento N-terminale del propeptide natriuretico atriale tipo B (NT-pro-BNP): questi biomarcatori sono comunemente utilizzati in percorsi diagnostici, le Tn nella diagnosi delle SCA, e il NT-pro-BNP nel monitoraggio e nella prognosi dello scompenso cardiaco, tuttavia alcuni studi si sono posti l'obiettivo di valutare il loro ruolo predittivo di MCV nella popolazione generale (1, 4). In particolare, sia la Tn-T che il NT-pro-BNP si sono dimostrati predittori indipendenti di MCV incidente nella popolazione generale (1,4). Anche la Tn-I superiore ad un livello plasmatico di  $\geq 0.04$  mcg/L ha predetto la mortalità e gli eventi CV in uno studio prospettico di circa 8 anni in una coorte di soggetti senza pregressa malattia CV (11).

### Altri Marcatori

Trimetilammina ossidata (TMAO): la TMAO è un prodotto di degradazione della fosfolina alimentare che viene metabolizzata dalla flora batterica intestinale e determina la produzione di TMA che viene poi assorbita e ossidata. La TMAO è stata identificata tramite uno studio di spettrometria di massa su pazienti con malattia cardiovascolare, e ha mostrato di essere un predittore di aterosclerosi coronarica più forte dei fattori di rischio classici in soggetti sottoposti ad angiografia (12), rappresentando il "link" più forte tra il microbiota intestinale e le patologie relate ad

obesità, insulino-resistenza e aterosclerosi (12). Oggi rappresenta uno dei biomarcatori ematici più promettenti in aterosclerosi. Numerosi altri marcatori sono stati o sono tuttora oggetto di studio per la loro capacità di predire il carico aterosclerotico vascolare e anche gli eventi CV precoci. Tra questi possiamo elencare rapidamente gli indicatori di metabolismo del ferro (sideremia, ferritinemia), gli indicatori di disfunzione endoteliale (Selectine, VCAM, ICAM-1), le Calgranuline (S100A12 e S100), la Galectina 3 (Gal-3), il "*growth differentiation factor 15*" (GDF-15) e le adipochine (resistina, adiponectina, FABP-4) che hanno mostrato risultati interessanti ma che, in molti casi, attendono ulteriori conferme (1-4, 6).

### Bibliografia

1. Brown TM, Bittner V. Biomarkers of atherosclerosis: clinical applications. *Curr Cardiol Rep.* 2008; 10: 497-504.
2. Kampoli AM, Tousoulis D, Antoniadis C, et al. Biomarkers of premature atherosclerosis. *Trends Mol Med.* 2009; 15: 323-332.
3. Martinez E, Martorell J, Rimbau V. Review of serum biomarkers in carotid atherosclerosis. *J Vasc Surg.* 2020; 71: 329-341.
4. Tibaut M, Caprnda M, Kubatka P, et al. Markers of Atherosclerosis: Part 1 - Serological Markers. *Heart Lung Circ.* 2019; 28: 667-677.
5. Lp-PLA(2) Studies Collaboration, Thompson A, Gao P, Orfei L, Watson S, Di Angelantonio E, Kaptoge S, Ballantyne C, Cannon CP, Criqui M, Cushman M, Hofman A, Packard C, Thompson SG, Collins R, Danesh J. Lipoprotein-associated phospholipase A(2) and risk of coronary disease, stroke, and mortality: collaborative analysis of 32 prospective studies. *Lancet.* 2010; 375: 1536-1544.
6. Soeki T, Sata M. Inflammatory Biomarkers and Atherosclerosis. *Int Heart J.* 2016; 57: 134-139.
7. Boffa MB, Koschinsky ML. Oxidized phospholipids as a unifying theory for lipoprotein(a) and cardiovascular disease. *Nat Rev Cardiol.* 2019; 16: 305-318.
8. Ridker PM, Danielson E, Fonseca FA, et al. JUPITER Study Group. Rosuvastatin to prevent vascular events in men and women with elevated

- C-reactive protein. *N Engl J Med.* 2008; 359: 2195-207.
9. Libby P. Interleukin-1 Beta as a Target for Atherosclerosis Therapy: Biological Basis of CANTOS and Beyond. *J Am Coll Cardiol.* 2017; 70: 2278-2289.
  10. Stec JJ, Silbershatz H, Tofler GH, et al. Association of fibrinogen with cardiovascular risk factors and cardiovascular disease in the Framingham Offspring Population. *Circulation.* 2000; 102: 1634-1638.
  11. Zethelius B, Johnston N, Venge P. Troponin I as a predictor of coronary heart disease and mortality in 70-year-old men: a community-based cohort study. *Circulation.* 2006; 113: 1071-1078.
  12. Tang WH, Hazen SL. Atherosclerosis in 2016: Advances in new therapeutic targets for atherosclerosis. *Nat Rev Cardiol.* 2017; 14: 71-72.