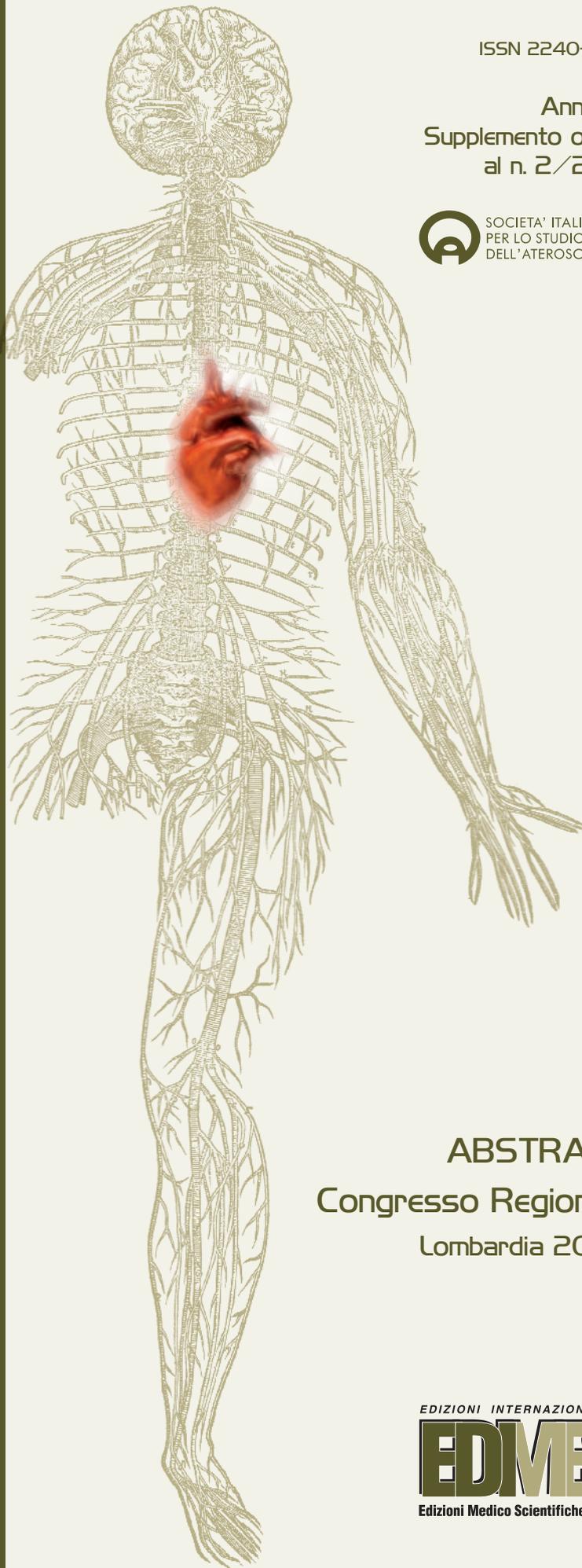


GIORNALE ITALIANO dell'ARTERIOSCLEROSI



ISSN 2240-4821

Anno 12
Supplemento online
al n. 2/2021



SOCIETÀ ITALIANA
PER LO STUDIO
DELL'ATEROSCLEROSI

ABSTRACT
Congresso Regionale
Lombardia 2020

EDIZIONI INTERNAZIONALI srl

EDMES

Edizioni Medico Scientifiche - Pavia

SOCIETÀ ITALIANA PER LO STUDIO DELLA ATEROSCLEROSI (SISA)

In collaborazione con SITeCS - Società Italiana di Terapia Clinica e Sperimentale

XIX Congresso della Sezione Lombardia

Milano, 15-17 ottobre 2020

Nei giorni 15-17 ottobre 2020 si è tenuto a Milano il 14° Congresso Nazionale della Società di Terapia Clinica e Sperimentale (SITeCS). Come ormai consuetudine, anche il Congresso di questo anno è stato organizzato in collaborazione con SISA (Società Italiana per lo Studio dell'Aterosclerosi) Regione Lombardia, alternando letture di aggiornamento nell'ambito dell'aterosclerosi e presentazioni di lavori scientifici di giovani ricercatori.

Il congresso è stata occasione per approfondire alcune tematiche inerenti l'aterosclerosi e il rischio cardiovascolare. Nelle letture, sono stati affrontati i meccanismi fisiopatologici alla base del processo aterosclerotico, con particolare attenzione agli aspetti legati all'immunità e al ruolo di parametri quali l'apolipoproteina B o la lipoproteina(a), e le più recenti evidenze emerse dagli studi preclinici e clinici. Sono stati descritti i risultati dei trial che hanno indagato i farmaci più innovativi nel panorama delle dislipidemie, come l'acido bempedoico e le terapie che utilizzano l'interferenza dell'RNA. Sono state inoltre discusse alcune condizioni che, seppur rare, rivestono notevole interesse clinico in quanto conferiscono elevato rischio cardiovascolare, come l'ipercolesterolemia familiare e la sindrome chilomicronemica familiare, descrivendone gli elementi di complessità diagnostica e terapeutica.

Infine, il consueto simposio congiunto delle sessioni lombarde delle società AMD (Associazione Medici Diabetologi), SID (Società Italiana di Diabetologia) e SISA ha affrontato le più recenti evidenze relative agli antidiabetici di ultima generazione e alle loro associazioni, oltre ad approfondire il ruolo del BMI e della malattia cardiometabolica.

COMUNICAZIONI ORALI

ZC3H10 REGOLA L'ADIPOGENESI CONTROLLANDO LA TRADUZIONE DELLE PROTEINE E L'INTERAZIONE F-ACTINA/MITOCONDRI

S. Ligorio¹, M. Audano¹, S. Pedretti¹, F. Gualdrini², S. Polletti², M. Russo², S. Ghisletti², M. Crestani¹, D. Caruso¹, E. De Fabiani¹, Nico Mitro¹

¹*DiSFeB, Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano;*

²*Dipartimento di Oncologia Sperimentale, Istituto Europeo di Oncologia (IEO), Milano*

Introduzione. L'obesità costituisce uno dei maggiori fattori di rischio per patologie cardiovascolari e metaboliche. Durante il differenziamento di cellule mesenchimali ad adipociti maturi sono richiesti tre eventi coordinati:

- 1) l'inibizione della traduzione proteica, essenziale per bloccare la proliferazione cellulare;
- 2) il rimodellamento dell'actina filamentosa (F-actina), uno dei componenti fondamentali del citoscheletro;
- 3) l'aumento della funzionalità mitocondriale per supportare le vie anaboliche. Recenti evidenze hanno dimostrato l'importanza dell'F-actina nel determinare il bilancio fra fissione e fusione mitocondriale regolando così la funzionalità dei mitocondri.

Nel nostro laboratorio abbiamo isolato Zinc finger CCCH-type containing 10 (Zc3h10) come un nuovo regolatore mitocondriale e abbiamo valutato il suo ruolo durante il processo adipogenico.

Metodi. Analisi trascrittomiche, morfologiche, metabolomiche e funzionali sono state utilizzate in cellule mesenchimali murine (CH310T1/2) differenziate ad adipociti controllo (Ctrl) o silenziate per Zc3h10 (ShZc3h10).

Risultati. Il silenziamento di Zc3h10 nelle prime fasi dell'adipogenesi (pre-adipociti) determina un ridotto accumulo lipidico (colorazione Oil Red O, Ctrl: $265 \pm 0,02$ vs ShZc3h10: $192 \pm 0,008$, $p < 0,001$); effetto che non si osserva se Zc3h10 viene silenziato in adipociti maturi. Coerentemente, i livelli proteici di Zc3h10 aumentano durante le prime fasi dell'adipogenesi. L'analisi trascrittomica in pre-adipociti ShZc3h10 mostra un aumento dell'espressione dei geni legati alla traduzione proteica e un'inibizione dei geni coinvolti nel rimodellamento dell'F-actina. Analisi funzionali dello stato di fosforilazione di translation initiation factor 4F (eIF4F)-binding protein 1 (4E-BP1) hanno confermato un'augmentata traduzione in pre-adipociti ShZc3h10. Inoltre, il silenziamento di Zc3h10 altera l'organizzazione dell'F-actina (area F-actina: Ctrl $2,42 \pm 0,25$ vs ShZc3h10 $2,10 \pm 0,22$, $p < 0,05$) e dei mitocondri (area mitocondri: Ctrl $24,00 \pm 8,82$ vs ShZc3h10 $18,97 \pm 5,47$ $p < 0,05$) risultando in una maggior interazione fra F-actin e mitocondri (colocalizzazione: Ctrl $0,06 \pm 0,08$ vs ShZc3h10 $0,09 \pm 0,08$, $p < 0,05$) che porta ad un'augmentata fissione mitocondriale generando mitocondri disfunzionali. Analisi metabolomiche e funzionali confermano che pre-adipociti silenziati per Zc3h10 utilizzano acidi grassi invece di favorire l'accumulo lipidico.

Conclusioni. Zc3h10 agisce come fattore di trascrizione che controlla la traduzione proteica, la struttura del citoscheletro, la dinamica e la funzione mitocondriale nelle prime fasi dell'adipogenesi.

RUOLO DEL TRASPORTATORE DEL LATTATO MCT1 NEI LINFOCITI T DURANTE L'OBESITÀ

A. Moregola¹, C. Macchi¹, M.F. Greco¹, F. Bonacina¹, M. Ruscica¹, G.D. Norata^{1,2}

¹*Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano;*

²*Centro SISA per lo Studio dell'Aterosclerosi, Ospedale Bassini, Cinisello Balsamo (MI)*

Introduzione. I linfociti T si accumulano nel tessuto adiposo durante l'obesità e la loro attivazione determina uno switch metabolico con un'augmentata produzione di lattato. MCT1 è un trasportatore del lattato espresso in diversi tipi cellulari inclusi i linfociti T. Scopo di questo progetto è quello di valutare se la delezione selettiva di MCT1 a livello dei linfociti T possa avere un ruolo nell'ambito di una patologia infiammatoria a basso grado, quale l'obesità.

Metodi. Topi MCT1f/fCD4-cre, con specifica delezione del trasportatore nei linfociti T, e topi MCT1f/f sono stati alimentati con una dieta ad alto contenuto di grassi (high fat diet-HFD; 45% Kcal grassi) per 20 settimane. Il peso è stato valutato settimanalmente e sono stati effettuati test di tolleranza al glucosio (GTT) e all'insulina (ITT) dopo 10 e 20 settimane di dieta. Una caratterizzazione immunofenotipica tramite citofluorimetria è stata effettuata al termine delle 20 settimane.

Risultati. L'espressione del trasportatore MCT1 è aumentata dopo attivazione nei linfociti T sia umani che murini. Dopo 20 settimane di dieta HFD, i topi MCT1f/f CD4-cre, nonostante un simile guadagno di peso ed una stessa risposta al glucosio, hanno un minor accumulo di tessuto adiposo sia viscerale (VAT) che sottocutaneo (SCAT) se paragonati ai topi MCT1f/f. L'assenza di MCT1 nei linfociti T è coincisa con una riduzione del numero di linfociti T CD8+ nel VAT e nello SCAT (VAT, $p < 0,05$; SCAT, $p < 0,05$). Questo profilo si associa ad una diversa distribuzione delle sottopopolazioni di linfociti T (linfociti T effector memory (Tem) CD8+ VAT: MCT1f/f $84,20\% \pm 5,72$, MCT1f/fCD4-cre $57,29 \pm 8$, $p < 0,001$; Tem CD8+ SCAT: MCT1f/f $72,2\% \pm 14,16$, MCT1f/fCD4-cre $44,93\% \pm 14,25$, $p < 0,001$), ma ad un simile numero di cellule dell'immunità innata (monociti e macrofagi) che infiltrano il tessuto adiposo. Queste differenze nelle popolazioni immunitarie adattative sono inoltre associate ad una minor ipertrofia del tessuto adiposo nei topi MCT1f/fCD4-cre e una riduzione nell'espressione di marker pre-adipogenici nel VAT (PPAR γ , PPAR δ , cEBP δ).

Conclusioni. I nostri dati suggeriscono che il trasportatore MCT1 durante una condizione di obesità ha un impatto sull'attivazione dei linfociti T. In particolare, i linfociti T CD8+ si accumulano meno nel tessuto adiposo dei topi con delezione del trasportatore MCT1 nei linfociti T, portando ad una minor ipertrofia del tessuto durante l'obesità indotta dalla dieta.

RUOLO DI ISTONE DEACETILASI 3 (HDAC3) E NEURONATINA (NNAT) NELLA FISIOPATOLOGIA DEL TESSUTO ADIPOSO

L. Coppi¹, C. Peri¹, F. Bonacina¹, R. Longo¹, D. Cricri¹, M. Audano¹, S. Rui¹, D. Norata¹, A.L. Catapano¹, N. Guex², T. Caputo², B. Desvergne², R. Canello³, A.M. Di Blasio³, N. Mitro¹, D. Caruso¹, E. De Fabiani¹, M. Crestani¹

¹DiSFeB, Università degli Studi di Milano;

²University of Lausanne;

³Istituto Auxologico Italiano

Introduzione. L'obesità è considerata un'epidemia globale ed occorrono nuove terapie per contrastare i cambiamenti metabolici e le comorbidità associate. Queste disfunzioni metaboliche sono correlate a modifiche dell'epigenoma che aumentano la suscettibilità all'obesità. L'istone deacetilasi 3 (HDAC3) è importante nella fisiopatologia del tessuto adiposo (WAT) e la sua inattivazione genetica causa una riprogrammazione metabolica degli adipociti bianchi verso il "browning".

Materiali e metodi. Per individuare i cambiamenti precoci causati da un regime nutrizionale che induce obesità e valutare il ruolo di HDAC3, abbiamo analizzato tramite RNAseq e ChIPseq (H3K27ac) il WAT sottocutaneo di topi con knockout di *Hdac3* (H3atKO) e controlli (FL) a 12 settimane d'età a cui è stata somministrata una dieta ad alto (HFD) o basso (LFD) contenuto di grassi dall'8ª settimana di vita. È stato infine caratterizzato l'immunofenotipo del WAT viscerale mediante FACS.

Risultati. L'analisi bioinformatica ha confermato l'esistenza di un ciclo futile di β -ossidazione e lipogenesi caratteristico dei topi KO. Il gene della neuronatina (*Nnat*) è drammaticamente represso in topi KO vs. FL (-94 fold change). L'analisi epigenomica nei topi KO LFD vs. FL LFD rivela una regione ipoacetilata 39 Kb a monte di *Nnat*, mentre nei topi FL HFD vs. FL LFD abbiamo osservato una distinta regione iperacetilata 32 Kb a monte di *Nnat*. In base a questi risultati e poiché l'espressione di *Nnat* è inversamente correlata al "browning", ipotizziamo che NNAT regoli il fenotipo del WAT. Considerato che NNAT correla con l'infiammazione nel tessuto abbiamo caratterizzato l'immunofenotipo nel WAT viscerale. Nei topi H3atKO HFD abbiamo riscontrato un aumento di monociti nel WAT che, a differenza dei topi FL, polarizzano verso la popolazione M2. In base a queste osservazioni, ipotizziamo che la diminuzione della trascrizione di NNAT nel WAT rispecchi l'immunofenotipo protettivo che osserviamo nel distretto viscerale.

Conclusioni. NNAT è un fattore chiave nella regolazione delle funzioni del tessuto adiposo e la sua espressione è regolata da HDAC3. Uno studio più approfondito della cascata di eventi che portano dall'ablazione di HDAC3 alla ridotta espressione di NNAT e al "browning" degli adipociti potrebbe rivelare nuovi target terapeutici per l'obesità e le comorbidità associate.

Fondazione Cariplo 2015-0641

IL RECETTORE DELLE LDLR (LDLR) INTEGRA LA REGOLAZIONE METABOLICA A QUELLA FUNZIONALE NEI LINFOCITI T CD8

F. Bonacina^{1*}, A. Moregola^{1*}, M. Svekla¹, D. Coe², S. Beretta², G. Beretta³, F. Pellegatta⁴, A. L. Catapano^{1,4}, F. Marelli-Berg², G. D. Norata^{1,5}

¹Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano;

²William Harvey Research Institute, Barts and The London School of Medicine & Dentistry, Queen Mary University (Londra, UK);

³Dipartimento di Scienze e Politiche Ambientali, Milano;

⁴IRCSS Multimedica, Milano;

⁵Centro SISA per lo Studio dell'Aterosclerosi, Ospedale Bassini, Cinisello Balsamo (MI).

*simile contributo

Obiettivo. L'attivazione dei linfociti T combina cambiamenti funzionali a quelli metabolici, tra cui l'omeostasi del colesterolo. SCOPO del nostro lavoro è stato valutare il ruolo del colesterolo acquisito tramite la via del recettore delle LDL (LDLR) sull'attivazione dei linfociti T.

Metodi. La caratterizzazione immunofenotipica dei linfociti T isolati da topi WT e LDLR KO è stata eseguita in vitro e in vivo e associata all'analisi proteomica e metabolica (tramite Seahorse). Parallelamente, l'attivazione dei linfociti è stata testata nelle cellule isolate da pazienti FH (ipercolesterolemia familiare), portatori di mutazioni nel gene LDLR.

Risultati. L'espressione genica e proteica del LDL-recettore è aumentata dopo l'attivazione in vitro dei linfociti CD8, suggerendo una particolare regolazione dell'omeostasi del colesterolo nel sottogruppo di linfociti T CD8. Funzionalmente, il deficit di LDLR ha principalmente attenuato la proliferazione dei CD8 (-35%, $p < 0,01$) parallelamente ad una riduzione della produzione di $INF\gamma$ (-39,6%, $p < 0,01$). L'attivazione antigene-specifica in vivo mediante vaccinazione con ovoalbumina, ma non la proliferazione in condizioni omeostatiche, ha determinato una diminuzione della proliferazione e della produzione di citochine (\downarrow $INF\gamma$ $p < 0,001$, \downarrow IL13 $p < 0,01$, \downarrow perforina $p < 0,05$) nei CD8 di topi LDLR-KO rispetto a WT. Inoltre, marcatori di rapida attivazione, come CD69 (-32%, $p < 0,01$) e la fosforilazione di AKT, a valle dell'attivazione del TCR (recettore dei linfociti T), risultano diminuiti nei CD8 di topi LDLR KO rispetto ai WT. Infine, l'analisi proteomica e tramite Seahorse ha evidenziato difetti metabolici con riduzione del metabolismo glicolitico suggerendo un'alterata attivazione di mTORC1.

Quando sono stati testati nell'uomo, i linfociti T CD8 di soggetti FH hanno mostrato una ridotta proliferazione (-36%, $p > 0,05$) rispetto ai controlli di pari età e sesso; inoltre, quando i linfociti T CD8 di soggetti FH vaccinati per l'influenza stagionale sono state testate in vitro verso i peptidi derivati dal virus, hanno presentato una ridotta produzione della molecola citotossica granzima B (-60,3%, $p < 0,01$) rispetto ai linfociti T CD8 isolati da controlli vaccinati, indicando una ridotta risposta effettrice dei linfociti CD8 all'infezione virale.

Conclusioni. LDLR gioca un ruolo critico nella regolazione delle risposte immunometaboliche nei linfociti T CD8 e quindi potrebbe rappresentare un checkpoint in grado di integrare il metabolismo cellulare del colesterolo alla risposta immunitaria adattativa.

DISBIOSI TASSONOMICA E FUNZIONALE DEL MICROBIOTA INTESTINALE IN PRESENZA DI ATEROSCLEROSI CAROTIDEA SUBCLINICA

A. Baragetti^{1*}, M. Severgnini^{2*}, E. Olmastroni³, G. Caredda¹, C. Conca Dioguardi⁹, E. Mattavelli⁶, A. Angius⁵, L. Rotta⁶, J. Cibella⁴, C. Consolandi², V. Zampoleri^{1,6}, L. Grigore^{6,8}, F. Pellegatta^{6,8}, F. Giavarini¹, D. Caruso¹, G.D. Norata^{1,6}, A.L. Catapano^{1,8§}, C. Peano^{4,9§}

*Co-primi - §Co-corresponding authors

¹Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano;

²Istituto di Tecnologie di Biomedicine, Centro Nazionale delle Ricerche, Segrate (MI);

³Centro Interuniversitario di Epidemiologia e Farmacologia Preventiva (SEFAP), Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano;

⁴Genomic Unit, IRCCS, Humanitas Clinical and Research Center, Rozzano (MI);

⁵Istituto di Genetica e Ricerche Biomediche, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Cagliari;

⁶S.I.S.A. Centro per lo Studio della Aterosclerosi, Ospedale Bassini, Cinisello Balsamo, Milano;

⁷Dipartimento di Oncologia Sperimentale, IEO, European Institute of Oncology, IRCCS, Milano;

⁸Multimedica IRCCS, Milano;

⁹Istituto di Genetica e Ricerche Biomediche, UoS Milano, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Rozzano (MI)

Background e scopo. Alterazioni nella composizione e funzionalità del Microbiota Intestinale (GM) (“disbiosi”) sono associate alla malattia cardiovascolare (CVD). Questo è altresì vero sin dalle fasi pre-cliniche della malattia, indipendentemente da co-morbidità metaboliche (Diabete di tipo 2 (DT2) e Sindrome Metabolica (SM)? Abbiamo quindi caratterizzato GM in soggetti senza DT2, SM e in prevenzione primaria per CVD, per identificare un’associazione indipendente tra disbiosi intestinale e Aterosclerosi Carotidea Preclinica (SCA).

Metodi. La composizione di GM è stata condotta su DNA metagenomico estratto dal campione fecale di 345 soggetti della popolazione generale PLIC. Una prima analisi della composizione tassonomica è stata condotta sulla popolazione intera tramite sequenziamento della regione ipervariabile V3-V4 del tratto 16s rRNA. Successivamente, con l’intento di studiare la rilevanza funzionale della composizione del microbiota, abbiamo condotto un’analisi di sequenziamento ad ampio spettro (Shotgun Metagenomic Sequencing) su 23 soggetti senza SCA rispetto a 23 soggetti con SCA (tramite ultrasonografia).

Risultati. In presenza di SCA, l’abbondanza relativa di Bacteroides era ridotta, mentre erano aumentate quelle di Escherichia, Coriobacteriaceae e Streptococcaceae. Escherichia Coli (E.Coli) era il marker metagenomico più abbondante nei soggetti con SCA avanzata e in cui i pathways batterici più espressi erano relativi al metabolismo degli alcoli, degli zuccheri, degli amminoacidi, della biosintesi del palmitato, della colina, delle carnitine e Trimetil-Amino N-Ossido (TMAO). Viceversa, nei soggetti senza SCA, abbiamo riscontrato una maggiore abbondanza relativa di Fecalibacterium prausnitzii, in cui è stata predetta una maggiore espressione di pathways anti-infiammatori legati alla sintesi di acidi grassi a catena corta (butirrato) e alla degradazione dell’amido. Infine l’analisi dei diari alimentari compilati dai soggetti con SCA ha permesso di riscontrare: i) una maggiore variabilità nella dieta, e ii) un più alto numero di correlazioni tra i cibi consumati e le abbondanze

relative di diversi ceppi batterici. In conclusione abbiamo identificato delle particolari signatures nella disbiosi di GM che richiamano non soltanto a una rilevanza tassonomica ma anche funzionale, associata con il fenotipo vascolare e la presenza di SCA.

Conclusioni. Questi dati preliminari abbozzano l’idea di identificare in futuro markers metagenomici individuali per un approccio personalizzato di intervento dietetico nelle prime fasi di prevenzione cardiovascolare.

PERDITA DELLE PROPRIETÀ CARDIOPROTETTIVE HDL-MEDIATE DURANTE LA SINDROME CORONARICA ACUTA

A. Strazzella¹, A. Ossoli¹, N. Morici², M. Turri¹, S. D’Elia², M. Palazzini², F. Oliva², L. Calabresi¹

¹Centro E. Grossi Paoletti, Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano;

²Cardiologia 1 - Emodinamica, ASST Grande Ospedale Metropolitano Niguarda, Milano

Background. Concentrazioni ridotte di HDL-C sono associate a una prognosi sfavorevole in pazienti con sindrome coronarica acuta (ACS). La strategia terapeutica migliore è rappresentata da una tempestiva riperfusione, che tuttavia può causare essa stessa danno. È stato dimostrato che le HDL presentano attività cardioprotettive, ma i meccanismi molecolari sono ancora oggetto di indagine. Inoltre, durante l’ACS, si verifica una perdita delle loro proprietà, come la capacità di indurre la produzione di ossido nitrico endoteliale dovuta a un’alterazione della loro composizione a causa di una riduzione della concentrazione e attività di LCAT.

Scopo. Identificare i meccanismi molecolari alla base della cardioprotezione HDL-mediata e valutarne l’alterazione durante l’ACS.

Metodi. 20 pazienti con infarto STEMI sono stati arruolati presso l’Unità di Cure Intensive Cardiologiche dell’Ospedale di Niguarda. I campioni sono stati prelevati al momento dell’ammissione e dopo 72 ore. La concentrazione e attività di LCAT e la CER (Cholesterol Esterification Rate) sono stati misurate. Le HDL purificate da soggetti controllo e pazienti con ACS sono state incubate con cardiomioblasti di ratto (H9c2) ad una concentrazione pari a 0.5 mg/ml di proteina, in un modello di ipossia/ri-ossigenazione. La produzione di ROS, la vitalità e l’apoptosi sono stati misurati con metodi standardizzati.

Risultati. L’incubazione con HDL controllo riduce significativamente la produzione di ROS (-21%; $p=0.02$) e l’apoptosi (-21%; $p<0.01$) rispetto alle cellule non trattate, con conseguente aumento della vitalità (+29%; $p<0.01$ vs non trattato), confermando le proprietà cardioprotettive di queste lipoproteine in condizioni fisiologiche.

Nei pazienti con ACS, la concentrazione di LCAT, la sua attività e la CER risultano diminuite a 72 ore dopo l’evento (-22%, $p=0.011$; -15%, $p=0.015$ -33%, $p<0.01$ vs ammissione, rispettivamente). Le HDL di questi pazienti inducono una produzione di ROS significativamente maggiore dopo 72 ore (+35%, $p<0.05$) rispetto alle HDL controllo; la citoprotezione HDL-mediata viene compromessa sin dal momento dell’ammissione, con una riduzione significativa della vitalità (-58%, $p<0.01$) e una tendenza all’aumento dell’apoptosi.

Conclusione. Le HDL, in condizioni fisiologiche, presentano attività cardioprotettive, quali antiossidante e citoprotettiva, che vengono compromesse durante l’ACS.

EFFETTI MOLECOLARI DELL'ASSE NEUROMETABOLICO MUSCOLO-CERVELLO IN UN MODELLO SPERIMENTALE DI ANORESSIA NERVOSA

F. Mottarlini, F. Bonacina, B. Tarenzi, G. Bottan, P. Uboldi, G.D. Norata, F. Fumagalli, L. Caffino
Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano

L'anorexia nervosa (AN) è una patologia psichiatrica caratterizzata da una severa condizione di malnutrizione, causata da una dieta molto restrittiva ed intenso esercizio fisico.

È stato ipotizzato che lo squilibrio energetico, attraverso la disregolazione di molecole presenti in organi periferici, possa portare all'alterazione di neurocircuiti alla base dei processi motivazionali e cognitivi delle pazienti anoressiche. A questo proposito, lo scopo del nostro progetto è investigare il ruolo dell'asse neurometabolico muscolo-cervello Irisin/BDNF, nel modello sperimentale di anoressia nervosa noto come *activity-based anorexia* (ABA).

Ratte femmine adolescenti sono state esposte dal giorno postnatale (P)38 al P42 ad un programma nutrizionale restrittivo (2 ore/giorno) e libero accesso ad una ruota di attività. Un gruppo di animali è stato sacrificato al P42 (fase acuta della patologia), i rimanenti sono stati sacrificati dopo 7 giorni (P49), al recupero del peso corporeo.

Dopo tre giorni dall'induzione del fenotipo anoressico, il gruppo ABA mostra una riduzione del peso corporeo significativamente maggiore rispetto agli animali esposti alla sola restrizione calorica, in concomitanza con un aumento esponenziale della distanza percorsa sulla ruota. A livello plasmatico le ratte ABA mostrano una severa riduzione dei livelli di trigliceridi e colesterolo, condizione ripristinata a seguito del recupero del peso corporeo. Nel muscolo scheletrico soleo, le ratte ABA mostrano, al P42, un'alterazione dell'espressione genica di specifici determinanti metabolici (FASN, CTP1 e Glut4), che, a seguito del recupero del peso, vengono riportati a livelli fisiologici. Nonostante questi dati suggeriscano che il recupero del peso corporeo sia in grado di ripristinare la corretta omeostasi metabolica, i livelli di espressione proteica di PGC1 α e FNDC5, precursore della miochina Irisin, nel muscolo sono incrementati, indicando una iperattivazione dell'asse neurometabolico in esame. Inoltre, a livello ippocampale, l'espressione genica di *Bdnf* negli animali ABA è aumentata al P42, mentre è ridotta al P49, suggerendo un possibile ruolo mal-adattivo della neurotrofina nei processi di apprendimento legati alla ricompensa.

In conclusione, questi dati avvalorano l'ipotesi dell'esistenza di una connessione tra periferia e cervello mediata dall'asse neurometabolico Irisin/BDNF, in cui tali alterazioni molecolari sembrano contribuire, almeno in parte, al mantenimento del circolo vizioso dell'AN.

Progetto Cariplo: 2017-0865. Unveiling the role of the Irisin-BDNF axis in controlling muscle to brain metabolic crosstalk in anorexia nervosa.

EFFETTO DELL'IPERCOLESTEROLEMIA SUL PROFILO DI N-GLICOSILAZIONE DELLE CELLULE IMMUNITARIE CIRCOLANTI

R. Bellini¹, F. Bonacina¹, M. Svecla¹, F. Pellegatta^{2,3}, A.L. Catapano^{1,3}, G.D. Norata^{1,2}.
¹Dipartimento di Scienze farmacologiche e biomolecolari, Università di Milano;
²Centro S.I.S.A. Ospedale Bassini, Cinisello Balsamo, Milan;
³IRCCS MultiMedica, Sesto S. Giovanni, Milano

Obiettivo. I cambiamenti riguardanti le ramificazioni zuccherine presenti sulle glicoproteine di membrana delle cellule immunitarie influenzano la loro attivazione e funzionalità. Il nostro obiettivo è stato valutare come l'ipercolesterolemia influenzi la composizione dei glicani presenti sulle cellule immunitarie.

Metodi. Attraverso la citofluorimetria a flusso sono state analizzate le cellule immunitarie circolanti di topi LDL-R KO alimentati per 8 settimane a dieta standard (Chow diet) o con dieta arricchita di colesterolo (WTD). Parallelamente, la signature dei glicani è stata profilata nelle popolazioni circolanti di pazienti affetti da ipercolesterolemia familiare nella forma eterozigote (HeFH). Nel dettaglio è stata indagata l'espressione dei glicani più superficiali, come l'acido sialico (Sia), presente nelle due conformazioni di legame α 2,3 o α 2,6, il galattosio (Gal) o l'N-acetilglucosamina (GlcNAc). Il riconoscimento di questi residui zuccherini è stato reso possibile sfruttando il legame specifico con lectine, coniugate a fluorofori differenti.

Risultati. Confrontati con i rispettivi controlli, le popolazioni linfocitarie CD4⁺ e CD8⁺ presentano una significativa diminuzione nell'espressione dell'acido sialico in conformazione α 2,3 (0,68 \pm 0,040 fold* CD4⁺, 0,49 \pm 0,02 fold* CD8⁺ nel modello murino ipercolesterolemico e 0,75 \pm 0,03 fold** CD4⁺, 0,87 \pm 0,04 fold* CD8⁺ nei pazienti HeFH). (*p<0,05; **p<0,01).

Cambiamenti a livello del profilo zuccherino sono presenti anche a livello della linea mieloide, in particolare sui monociti degli animali ipercolesterolemici è presente un significativo aumento dell'espressione di acido sialico in conformazione α 2,6 (2,12 \pm 0,15 fold*) e galattosio (1,27 \pm 0,05 fold*), variazioni invece non osservate nei pazienti HeFH. I monociti CD14⁺ di questi ultimi mostrano, infatti, un lieve aumento riguardante unicamente l'espressione di GlcNAc, mentre i neutrofili CD16⁺ presentano anche una diminuzione dell'espressione dell'acido sialico in conformazione α 2,3 (0,68 \pm 0,11 fold*). (*p<0,05).

Conclusioni. L'aumento delle proteine N-glicosilate che presentano acido sialico in conformazione α 2,6/ α 2,3 sembra essere una caratteristica correlata con la presenza di ipercolesterolemia. L'aumento di acido sialico in conformazione α 2,6 è presente non solo nelle popolazioni linfocitarie (sia murine che umane), ma anche a livello dei monociti murini. Se le diverse conformazioni dell'acido sialico identifichino una diversa attività delle popolazioni immunitarie è adesso oggetto di studio.

GLYCOPROTEIN PATTERN DURING ATHEROGENESIS IN LDL-R KO MICE

M. Svecla¹, P. Uboldi¹, F. Bonacina¹, A.L. Catapano¹, G. Beretta², G.D. Norata¹

¹Department of Pharmacological and Biomolecular Sciences, University of Milan;

²Department of Environmental Science and Policy ESP, University of Milan

Background. Protein glycosylation is a post-translation modification consisting on the enzymatic attachment of glycans that are covalently attached to a nascent polypeptide chain. It starts in endoplasmic reticulum (ER) where 14 glucans are transferred as “en block” to a lipid linked anchor in a polypeptide chain. Aim of this work was to investigate changes in N-glycosylation maturation of proteins during atherosclerotic plaque development in animal models.

Methods. Shotgun proteomics was performed in aorta from LDL-R KO mice, fed in chow or WTD diet, using orbitrap Fusion™ Tribrid™ Mass Spectrometer followed by protein inference, label free quantification.

Total RNA was reverse transcribed into cDNA and gene expression analysis by qRT-PCR was performed.

Results. Shotgun proteomics has identified 1134 proteins, 1102 were quantified and matched for biological enrichment pathways where fatty acid metabolism (z -score=3.18). The second activated pathway was metabolism of proteins (z -score=1.48) where the unfolded protein response was significantly activated followed by activation of “conformational modification of proteins” pathway. Within the unfolded proteins response pathway observed on WTD mice, several enzymes were associated with the modulation in glycosylation of mice. Firstly, ribophorin unit that transfer the glycans in lipid anchored oligosaccharide was significantly upregulated, (an index of glycan assembly in ER); secondly glucosidase enzymes that tries to make a proper conformation of glycoproteins were significantly up-regulated (Ganab, p -value=0.03). In line with this we observed the up-regulation of chaperons such as calnexin, calreticulin and GRP78 (p -value=0.01) both at the mRNA and at the protein level. In addition, the abundance and side-specific N-glycosylation of integrin β -1, laminin subunit γ -1, integrin α -8 were reduced in the plaque of WTD fed mice.

Conclusion. Our data suggest that in aorta of LDL-R KO mice, fed in WTD there is an increased glycan assembly in ER and the up-regulation of glycoprotein chaperon expression, probably to compensate an uncorrected folding of glycoproteins.

LA TERAPIA CELLULARE A BASE DI CELLULE T REGOLATORIE ESPRIMENTI CX3CR1 RIDUCE LA RISPOSTA INFIAMMATORIA E MIGLIORA LA STABILITA' DI PLACCA IN MODELLI SPERIMENTALI.

J. Nour^{1*}, F. Bonacina^{1*}, E. Martini², M. Svecla¹, M. Cremonesi², F. Pellegatta³, A.L. Catapano^{1,4}, M. Kallikourdis², G.D. Norata^{1,3}

*hanno contribuito ugualmente

¹Dipartimento di Eccellenza di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano;

²IRCCS Fondazione Humanitas, Rozzano (MI);

³Centro SISA, Ospedale Bassini, Cinisello Balsamo (MI);

⁴IRCCS Multimedica, Milano

Scopo. Le cellule T regolatorie svolgono un ruolo fondamentale nella soppressione dell'attivazione immunitaria responsabile dell'infiammazione associata all'aterosclerosi. Pertanto, lo scopo di questo studio è stato investigare l'effetto di una terapia cellulare a base di Treg modificate per raggiungere la placca in modo selettivo sulla progressione dell'aterosclerosi in modelli animali della malattia.

Metodi. Cellule T regolatorie ingegnerizzate per overesprimere CX3CR1, o con un vettore controllo, sono state somministrate a topi knock-out per il gene dell'LDL-receptor dopo 8 settimane di dieta arricchita in colesterolo. A 4 settimane dall'iniezione, è stato valutato l'effetto sullo sviluppo delle lesioni aterosclerotiche mediante caratterizzazione istologica e studi di proteomica.

Risultati. L'espressione genica di CX3CL1 aumenta selettivamente nell'aorta durante l'aterogenesi. L'overespressione del suo recettore, CX3CR1, in Treg favorisce la localizzazione selettiva a livello della placca aterosclerotica. A 4 settimane, il gruppo sperimentale ricevente CX3CR1+/Treg mostra un miglioramento del fenotipo aterosclerotico. Nel dettaglio è stata osservata una riduzione dell'area della lesione negli animali trattati (65016±9446 μ m²) rispetto ai controlli (99658±11782 μ m²), in aggiunta a un aumento della stabilità per incremento di fibrosi (+25%) e di area positiva per α -sma (+29%), e a un minor contenuto lipidico (-12%). L'analisi di proteomica ha evidenziato che la terapia promuove l'attivazione di differenti pathway biologici, quali un aumento di mobilità dei fibroblasti (z -score=2,727) e signaling mediato dalle integrine (z -score=1,732) nell'aorta degli animali riceventi CX3CR1+/Treg. In parallelo, si osserva una riduzione di processi di apoptosi (z -score=-0,888), necrosi (z -score=-1,498) e infiltrazione cellulare (z -score=-2,206); in parallelo si osserva l'induzione di pathways chiave della fagocitosi quali endocitosi, riorganizzazione del citoscheletro e attivazione di LXR. Markers di efferocitosi, quali MFG8, LRP1 e calreticulina, sono più espressi nelle aorte dei topi riceventi CX3CR1+/Treg, mentre markers di ridotta fagocitosi, come HMGB1, sono ridotti. Questa osservazione è concorde con l'individuazione di cellule apoptotiche circondate da macrofagi nelle placche del gruppo sperimentale trattato, a conferma del miglioramento del fenotipo aterosclerotico.

Conclusioni. La terapia cellulare a base di cellule T regolatorie ingegnerizzate al fine di raggiungere la placca aterosclerotica, è in grado di apportare un significativo miglioramento della patologia, grazie ad aumento della stabilità della placca e riduzione dell'infiammazione associata.

TERAPIA CELLULARE CON LINFOCITI TREGOLATORI PER LE MALATTIE CARDIOVASCOLARI: RIPROGRAMMAZIONE DEL METABOLISMO CELLULARE PER RIPRISTINARNE LA FUNZIONE IMMUNOPPRESSIVA

F. Bonacina¹, M. Svekla¹, J. Nour¹, A. Moregola¹, F. Pellegatta², A.L. Catapano^{1,3}, G.D. Norata^{1,2}

¹Dipartimento di scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli studi di Milano;

²Centro SISA per lo studio dell'aterosclerosi, Ospedale Bassini, Cinisello Balsamo (MI);

³IRCCS MultiMedica, Sesto S. Giovanni (MI)

Gli elevati livelli di colesterolo plasmatico rappresentano il principale fattore di rischio delle malattie cardiovascolari; tuttavia, recentemente è stato descritto anche il ruolo giocato da un'eccessiva risposta immuno-infiammatoria nella patogenesi della malattia. Queste evidenze hanno suggerito come, accanto alle attuali strategie farmacologiche dirette a limitare l'ipercolesterolemia, risultati fondamentali individuare nuovi bersagli terapeutici nei meccanismi che coinvolgono l'alterata risposta immunitaria che caratterizza il processo aterosclerotico.

Il nostro gruppo ha recentemente dimostrato come i pazienti affetti da ipercolesterolemia familiare siano caratterizzati da una compromessa risposta immunitaria, in particolare come sia alterata la risposta immunosoppressiva a carico delle cellule Tregolatorie, e, al contrario, aumentata quella a carico dei linfociti T di tipo effettore. L'obiettivo del progetto è quindi indagare i meccanismi molecolari alla base dell'alterata funzione delle cellule Tregolatorie nella patogenesi del processo aterosclerotico e sfruttare, da un lato, la loro riprogrammazione metabolica (che sappiamo essere strettamente associata alla loro funzionalità) e, dall'altro, la loro ingegnerizzazione genetica per conferire selettività di migrazione verso la placca aterosclerotica. Questo approccio rappresenta un'innovativa strategia terapeutica per limitare la risposta immuno-infiammatoria localmente a livello della placca, riducendo così il rischio cardiovascolare senza compromettere la risposta immunitaria sistemica.

Questo progetto si pone quindi l'obiettivo di chiarire quali alterazioni metaboliche accompagnano la disfunzione delle cellule Tregolatorie nei soggetti affetti da ipercolesterolemia familiare, contribuendo così a delineare le basi molecolari dell'alterazione della risposta immuno-infiammatoria che partecipa alla progressione della patologia aterosclerotica e cardiovascolare. Comprendere i meccanismi che accoppiano il metabolismo con la funzionalità e la migrazione delle cellule Tregolatorie consentirà lo sviluppo, accanto alle attuali terapie ipolipidizzanti, di strategie mirate a sfruttare la loro azione immunosoppressiva per limitare la risposta immuno-infiammatoria a livello della placca aterosclerotica.

Progetto CARIPLO 2019-1560

ATEROSCLEROSI, PCSK9 E VESCICOLE EXTRACELLULARI

M.F. Greco¹, C. Macchi¹, L. Cantone², T. Sampietro³, C.R. Sirtori¹, A. Corsini¹, V. Bollati², N. Ferri⁴, M. Ruscica¹

¹Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano;

²EPIGET Dipartimento di Scienze Cliniche e di Comunità, Università degli Studi di Milano;

³U.O. Lipoferesi, Centro di riferimento regionale per la diagnosi

e il trattamento delle dislipidemie ereditarie, Fondazione Toscana "Gabriele Monasterio", Pisa;

⁴Dipartimento di Scienze Farmaceutiche e Farmacologiche,

Università degli Studi di Padova

Background. Le vescicole extracellulari (VE) sono particelle costituite da un doppio strato fosfolipidico che contengono proteine, lipidi e acidi nucleici. Le VE, considerate mediatori della comunicazione intercellulare, sono coinvolte in processi patogenetici, tra i quali l'aterosclerosi. I livelli circolanti di VE sembrano associarsi con la probabilità di sviluppare eventi vascolari e la loro secrezione è aumentata nei pazienti con fattori di rischio per le malattie cardiovascolari (es: ipercolesterolemia, ipertensione o sindrome metabolica).

Obiettivo. Valutare l'impatto delle VE isolate da cellule muscolari lisce umane sovraesprimenti e non PCSK9 (da ora denominate hSMC e hSMC^{PCSK9}) sull'infiammazione, la capacità migratoria e l'attività mitocondriale in modelli cellulari correlati all'aterosclerosi.

Metodi.

- linee cellulari: hSMC, hSMC^{PCSK9}, monociti umani (THP-1), macrofagi umani (THP-1 derivati);
- isolamento e caratterizzazione delle VE;
- espressione genica e proteica;
- migrazione cellulare.

Risultati. La concentrazione di VE rilasciate nel medium di coltura dalle cellule hSMC ($17.1 \cdot 10^9$ VE/ml) è maggiore di quella rilasciata dalle cellule hSMC^{PCSK9} ($6.2 \cdot 10^9$ VE/ml). Al contrario, non ci sono differenze nelle loro dimensioni (202 nm vs 210 nm). Nei modelli di monociti e di macrofagi, il trattamento per 24 ore con le VE isolate dalle cellule hSMC^{PCSK9} ha determinato un aumento nell'espressione genica della chemochina MCP-1 (circa 27 volte), dell'interleuchina (IL)-1 α (circa 28 volte), IL1 β (circa 25 volte), IL-6 (circa 94 volte) e IL-8 (circa 4 volte). In seguito al trattamento con le VE isolate dalle cellule hSMC^{PCSK9}, in tutti i modelli cellulari utilizzati l'espressione proteica di STAT3 e di SOCS3 è aumentata. Nessuna differenza è stata trovata per quanto riguarda l'espressione proteica dell'inflammasoma (NLRP3).

Le VE isolate dalle cellule hSMC^{PCSK9} hanno inibito la migrazione dei monociti: solo lo 0.21% delle cellule THP-1 ha migrato quando esposte alle VE isolate dalle hSMC^{PCSK9} rispetto al 2.83% delle THP-1 esposte alle VE isolate dalle cellule hSMC. L'effetto delle VE sull'attività mitocondriale è stata valutata mediante l'espressione proteica del complesso OXPHOS, la quale è risultata immutata in tutte le linee cellulari prese in esame.

Conclusioni. I nostri dati sono in linea con nostri studi precedenti che hanno evidenziato un effetto infiammatorio diretto esercitato da PCSK9.

RUOLO PCSK9 NEL METABOLISMO CARDIACO

L. Da Dalt¹, L. Castiglioni¹, A. Baragetti¹, M. Audano¹, M. Svecla¹, F. Pellegatta⁴, L. Sironi¹, N. Mitro¹, A.L. Catapano^{1,4*}, G.D. Norata^{1,3*}

¹Department of Pharmacological and Biomolecular Sciences, University of Milan;

²Department of Bioscience, University of Milan;

³IRCCS Multimedica Hospital, Sesto San Giovanni (MI);

⁴Centro SISA, Ospedale Bassini, Cinisello Balsamo (MI)

*These two authors equally contributed

Background e obiettivo. Le lipoproteine plasmatiche e gli acidi grassi legati all'albumina contribuiscono a fornire colesterolo e nutrienti ai cardiomiociti interagendo con specifici recettori della superficie cellulare tra cui l'LDLr e CD36. Un aumentato uptake e il conseguente accumulo lipidico nei cardiomiociti, detto lipotossicità, a sua volta, si associa a ridotta funzione mitocondriale e a una ridotta produzione di energia. Questo studio mira a studiare l'impatto della carenza di PCSK9 che regola i recettori delle lipoproteine e degli acidi grassi sulla lipotossicità cardiaca e sul riciclaggio metabolico del cuore.

Metodi. Topi maschi WT e PCSK9 KO di 2 mesi sono stati nutriti per 20 settimane con SFD (Standard Fat Diet - 10% Kcal fat). Su questi topi è stata eseguita l'analisi ecocardiografica e sono state svolte analisi per valutare funzionalità metabolica tra i quali l'oxigen consumption rate. È stata eseguita un'analisi metabolica e sono stati testati i cambiamenti nel profilo delle proteine mitocondriali mediante western blott, analisi metabolomica e proteomica.

Risultati. La carenza di PCSK9 porta a un'alterazione morfologica nel cuore dei topi PCSK9 KO che hanno uno spessore maggiore della parete ventricolare sinistra con frazione di eiezione conservata rispetto al WT. I topi PCSK9 KO mostrano una distanza e un tempo di corsa ridotti rispetto al WT mentre non è stata osservata alcuna differenza nella forza muscolare. La mancanza di PCSK9 è associata a un ridotto consumo di ossigeno nel cuore e una ridotta espressione delle proteine chiave dei complessi 1, 2 e 3 nei topi PCSK9 KO rispetto ai controlli. Inoltre la mancanza di PCSK9 porta all'accumulo di colesterolo a livello cardiaco. Come effetto netto a livello mitocondriale, tutti gli intermedi del ciclo di Krebs sono ridotti nei cuori KO PCSK9 rispetto ai campioni WT suggerendo un'attività ridotta di tutte le vie metaboliche mitocondriali.

Conclusione / Discussione. Il deficit di PCSK9 provoca un'alterazione morfologica e metabolica nel cuore che sviluppa insufficienza cardiaca con frazione di eiezione conservata.

Progetto Cariplo 2016-0852

IMPATTO DELLA PRODUZIONE EPATICA E PANCREATICA DI PCSK9 SULL'OMEOSTASI GLUCIDICA

A. Marku, L. Da Dalt, A. Galli, A.L. Catapano, D.G. Norata, C. Perego

Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano

La proproteina convertasi subtilisina/kexina tipo 9 (PCSK9), controllando l'espressione del recettore per LDL, gioca un ruolo fondamentale nella regolazione dei livelli ematici di colesterolo. Varianti geniche di PCSK9 caratterizzate da perdita di funzione si associano a concentrazione ematiche di LDL-colesterolo più basso, ma aumentata glicemia a riposo e rischio di diabete di tipo 2, suggerendo un ruolo di PCSK9 nel controllo dell'omeostasi glucidica. Inoltre, per quanto il fegato sia il principale produttore di PCSK9 circolante, anche il pancreas endocrino produce PCSK9, indicando un possibile ruolo diretto della proteina in questo tessuto. Scopo del lavoro è stato pertanto comprendere il contributo della produzione epatica e pancreatica di PCSK9 sul controllo dell'omeostasi glucidica.

Topi condizionali, privi dell'espressione di PCSK9 selettivamente nel fegato (topo AlbuminaCre/Pcsk9^{loxP/LoxP}) o nel pancreas (topo Pdx1Cre/Pcsk9^{loxP/LoxP}) mantenuti a dieta standard per 20 settimane (Standard fat diet, 10% ac grassi), sono stati analizzati per la tolleranza al glucosio (GTT), l'insulina ematica e la morfologia dell'isola.

I topi privi di PCSK9 epatica, come atteso, non presentano livelli circolanti di PCSK9 significativi, ma continuano ad esprimere PCSK9 nelle isole pancreatiche e mostrano curve GTT e livelli di glucosio ematico simili ai topi controllo. Le isole di questi animali presentano dimensioni, organizzazione e contenuto di insulina comparabili a quelli controllo, suggerendo che PCSK9 epatico giochi un ruolo minore nel controllo dell'omeostasi glucidica.

Topi privi di PCSK9 a livello pancreatico, presentano normali livelli circolanti di PCSK9 ma mancano dell'espressione di PCSK9 nell'isola e sono glucosio intolleranti. La glucosio-intolleranza sembra essere dovuta ad un difetto di insulino deficienza perché la secrezione di insulina indotta da un carico glucidico è significativamente più bassa in questi animali rispetto ai controlli. L'analisi della morfologia del pancreas rivela isole del Langerhans di dimensioni e contenuto insulinico paragonabili ai controlli. Sono in corso studi per comprendere il ruolo del PCSK9 pancreatico nella secrezione di insulina.

Questi dati indicano che PCSK9 pancreatico e non circolante (prodotto dal fegato) svolge un ruolo importante nell'omeostasi glucidica, suggerendo pertanto che terapie anti-PCSK9 rivolte verso la proteina circolante e proposte per soggetti con elevata colesterolemia non alterino la funzionalità pancreatica.

STUDIO DELL' INTERAZIONE TRA PCSK9 (PROPROTEINA CONVERTASI SUBTILISINA/KEXINA DI TIPO 9) E LIPOPROTEINE: UN' OTTIMIZZAZIONE METODOLOGICA

L. Canclini^{1,2}, A.M. Malvandi¹, P. Uboldi², V. Zampolieri^{2,3}, A. Baragetti^{2,3}, L. Grigore³, A.L. Catapano^{1,2}

¹Laboratorio di Dislipidemia Genetica ed Aterosclerosi, IRCCS MultiMedica, Milano;

²Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano;

³Centro per lo Studio dell'Aterosclerosi, Ospedale Bassini, Cinisello Balsamo (MI)

Introduzione e scopo. PCSK9 è una proteasi che modula i livelli ematici delle lipoproteine a bassa densità (LDL) promuovendo la degradazione epatica dei recettori LDL. Vari studi suggeriscono che PCSK9 circoli sia libero sia associato alle lipoproteine (LP) plasmatiche; tuttavia, i dati riportati sono discordanti. Una migliore comprensione della fisiologia di PCSK9 risulta fondamentale, considerato il crescente interesse rivolto alla sua inibizione farmacologica per il trattamento delle ipercolesterolemie. Scopo del nostro lavoro è stato quello di confermare l'esistenza dell'associazione PCSK9-LP, confrontando ed ottimizzando diverse metodiche per l'isolamento delle lipoproteine.

Metodi. Abbiamo isolato le lipoproteine dal siero di volontari sani utilizzando diversi approcci, tra cui: precipitazione mediata da acido fosforotungstico, cromatografia per esclusione molecolare (FPLC), ultracentrifugazione in gradiente di KBr e di iodixanolo (IGr). Sulle frazioni lipoproteiche ottenute è stata eseguita la quantificazione di PCSK9 tramite ELISA; apolipoproteina B, apolipoproteina A1, lipoproteina(a) e colesterolo sono stati dosati con reattivi di grado clinico.

Risultati e conclusioni. Mediante precipitazione fisica delle lipoproteine contenenti apoB, più dell'80% di PCSK9 è stato rilevato nel precipitato. Non sono state trovate tracce di PCSK9 nelle lipoproteine isolate mediante ultracentrifuga in gradiente di KBr. PCSK9 è stato trovato nelle frazioni LDL isolate sia tramite FPLC ($10.5 \pm 2.4\%$) sia con ultracentrifugazione in gradiente di iodixanolo ($17.9 \pm 3.3\%$). I nostri dati suggeriscono che l'associazione PCSK9-LDL esiste ed è sensibile ad alte concentrazioni saline. Inoltre, l'entità dell'associazione varia con la metodica utilizzata per l'isolamento delle lipoproteine. FPLC e ultracentrifuga con IGr sembrano essere entrambi metodi validi per futuri studi clinici e biologici relativi all'associazione in oggetto.

*media \pm SEM

PERS&O 2.0 (PERSISTENT SITAGLIPTIN TREATMENT & LONG-TERM OUTCOMES): EVOLUZIONE DEL RISCHIO CARDIOVASCOLARE NEL DIABETE TIPO 2 IN TERAPIA PERSISTENTE CON SITAGLIPTIN

V. De Mori¹, G. Meregalli¹, D. Bertola¹, D. Berzi¹, F. Forloni¹, C. Galeone², F. Turati², AC Bossi^{1,3}

¹UOC Malattie Endocrine - Centro Regionale per il Diabete Mellito, ASST Bergamo Ovest, Treviglio (Bg);

²Dipartimento di Scienze Cliniche e di Comunità, Università degli Studi, Milano;

³Diabetologia Humanitas-Gavazzeni, Bergamo

Introduzione. Sitagliptin è un inibitore dell'enzima DPP-IV, con documentata efficacia terapeutica e sicurezza in termini assoluti e cardiovascolari, per il trattamento del diabete mellito tipo 2 (DMT2). Nella pratica clinica, applicare algoritmi "predittivi" come UKPDS Risk Engine può risultare utile per calcolare il rischio CV e la sua evoluzione.

Scopo. PERS&O 2.0 è uno studio retrospettivo osservazionale monocentrico "real-world" che intende valutare nel lungo termine:

- l'evoluzione di UKPDS RE score in una coorte di soggetti italiani con DMT2, in trattamento con Sitagliptin, con o senza malattia cardio vascolare preesistente;
- l'effetto del trattamento persistente di Sitagliptin sui principali parametri glico-metabolici e antropometrici.

Materiali e metodi. Sono stati arruolati 440 pazienti con DMT2 (275 M; 165 F; età 64.1 ± 9.2 anni; durata mediana di malattia 12 anni) in terapia con Sitagliptin "add-on". Coloro che hanno dovuto sospendere il trattamento sono stati inseriti nel gruppo di controllo. Per ogni paziente è stato stimato il rischio cardio vascolare a 10 anni tramite UKPDS RE ad ogni visita semestrale di follow-up (FU).

Risultati. Al basale i pazienti presentavano (media \pm DS): BMI 30.2 ($26.6-33.9$) kg/m²; HbA1c 8.4 ($7.9-9$) %; glicemia a digiuno 172 ($153-200$) mg/dl; UKPDS RE score: 24.8% con rispetto delle differenze di genere: uomini 30.2% , donne 17.0% . 249 pazienti (56.5%) sono stati trattati con S per ≥ 24 mesi, 183 (41.6%) per ≥ 36 mesi, 139 (31.6%) per ≥ 48 mesi, 112 (25.5%) per ≥ 60 mesi e 79 (18%) per ≥ 72 mesi. Durante il follow-up si è osservato un rapido miglioramento dell'HbA1c (FU 6 mesi: 7.5% $p < 0,01$), che è proseguito nel tempo. I pazienti trattati con Sitagliptin nel lungo periodo, infatti, presentano differenze statisticamente significative ($p < 0,05$) nell'evoluzione dell'HbA1c (7.2%), UKPDS (18%) e BMI (27.4 kg/m²) rispetto ai controlli. Mediante curve di Kaplan-Meier si è stimata la persistenza media del trattamento con Sitagliptin: 32.8 mesi (considerando la sospensione per tutte le cause) e 58.4 mesi (valutando la sola perdita di efficacia della terapia). Anche UKPDS RE score e BMI hanno presentato un significativo miglioramento per coloro in terapia persistente con Sitagliptin rispetto ai controlli. Da sottolineare la scarsità di eventi avversi correlate all'uso di Sitagliptin.

Conclusioni. I pazienti trattati con Sitagliptin a medio-lungo termine hanno mostrato un progressivo miglioramento nel controllo glico-metabolico, una favorevole diminuzione del BMI e una riduzione di UKPDS RE score rispetto ai controlli (coloro che hanno dovuto sospendere Sitagliptin). Sitagliptin si conferma farmaco efficace, sicuro con una soddisfacente "durability".

PROPROTEINA CONVERTASI SUBTILISINA/ KEXINA DI TIPO 9: RELAZIONE CON MARKERS DI ATEROSCLEROSI SUBCLINICA E CLINICA

D. Coggi^{1,2}, N. Ferri³, M. Ruscica¹, M. Amato², B. Frigerio², D. Sansaro², A. Ravani², P. Ferrante², F. Veglia², A. Bonomi², N. Capra², M.G. Lupo³, C. Macchi¹, K. Savonni⁴, A. Silveira⁵, S. Kurl⁶, P. Giral⁷, M. Pirro⁸, R. Strawbridge^{9,10}, E. Tremoli², B. Gigante¹⁰, D. Baldassarre^{2,11}, a nome del gruppo di studio IMPROVE.

¹Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano;

²Centro Cardiologico Monzino, IRCCS, Milano; Dipartimento di Scienze del farmaco, Università degli Studi di Padova, Padova;

Foundation for Research in Health Exercise and Nutrition, Kuopio Research Institute of Exercise Medicine, Kuopio, Finland;

⁵Atherosclerosis Research Unit, Department of Medicine Solna, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden;

⁶Institute of Public Health and Clinical Nutrition, University of Eastern Finland, Kuopio Campus;

⁷Assistance Publique - Hôpitaux de Paris; Service Endocrinologie-Metabolisme, Groupe Hôpitalier Pitie-Salpêtrière, Unités de Prévention Cardiovasculaire, Paris, France;

⁸Internal Medicine, Angiology and Arteriosclerosis Diseases, Department of Clinical and Experimental Medicine, University of Perugia;

⁹Institute of Health and Wellbeing, University of Glasgow, Glasgow, United Kingdom;

¹⁰Cardiovascular Medicine Unit, Department of Medicine Solna, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden;

¹¹Department of Medical Biotechnology and Translational Medicine, Università degli Studi di Milano

La proproteina convertasi subtilisina/kexina di tipo 9 (PCSK9) aumenta indirettamente i livelli plasmatici di colesterolo LDL, uno dei principali fattori di rischio cardiovascolare. Nel presente studio, abbiamo valutato la relazione tra i livelli di PCSK9 circolante ed indici di aterosclerosi sia subclinica (ecolucenza) che clinica (eventi vascolari incidenti; EVs). È stata altresì valutata la relazione tra 4 varianti geniche di PCSK9 e lo spessore del complesso medio intima carotideo (IMT, dall'inglese intima-media thickness). Le relazioni genetiche rilevate sono state poi validate in un campione completamente indipendente (UK Biobank).

Lo studio è stato effettuato sfruttando campioni biologici, dati ed immagini ultrasonografiche dell'IMPROVE, uno studio in cui sono stati arruolati, e seguiti per 36 mesi, 3703 soggetti (54-79 anni; 48% uomini) asintomatici definiti ad alto rischio vascolare per la presenza di almeno 3 fattori di rischio. PCSK9 è stata misurata mediante ELISA. L'ecolucenza della parete arteriosa è stata misurata sia in zone libere da placca (ecolucenza del PF CC-IMT) sia a livello della più grossa placca rilevata nell'intero albero carotideo.

Anche dopo aggiustamento per diverse variabili confondenti, PCSK9 correlava con l'ecolucenza sia del PF CC-IMT che della placca. Durante il follow-up, sono stati registrati 215 EVs. La relazione fra PCSK9 e l'incidenza di EVs, significativa nell'analisi cruda, perdeva significatività nell'analisi multivariata. La mancata relazione con gli EVs era confermata anche nelle analisi effettuate escludendo i soggetti trattati con statine e nell'analisi focalizzata sugli eventi clinici hard (infarto miocardico, ictus e morte improvvisa). Per quanto riguarda il ruolo delle varianti genetiche, nessuno dei quattro SNPs considerati correlava con l'IMT carotideo quando l'analisi era effettuata nei soggetti dello studio IMPROVE.

Per contro, solo la variante rs11591147 correlava con l'IMT nella popolazione UK. Riunendo le 4 varianti genetiche in uno score, la relazione con l'IMT era non significativa nello studio IMPROVE, significativa nella popolazione UK.

Sebbene non correli con l'aterosclerosi clinica, la relazione fra PCSK9 e composizione delle lesioni carotidee, così come la relazione fra 4 varianti genetiche e l'IMT carotideo nello studio UK, suggeriscono l'utilità di ulteriori studi per comprendere meglio il ruolo di PCSK9 nella malattia aterosclerotica.

L'IMPORTANZA DIAGNOSTICA E PROGNOSTICA DELL'ANKLE-BRACHIAL INDEX IN MEDICINA GENERALE: UNO STUDIO PROSPETTICO E MONOCENTRICO

A. Sacchetti, A. Sgrò, M. Bottino, M.M. Coronelli
Università degli Studi di Pavia

Background. L'arteriopatia obliterante periferica è comune nella popolazione generale ed è associata ad un aumentato rischio di morte ed eventi ischemici. È diagnosticata attraverso la misurazione dell'Ankle-Brachial Index (ABI), indicatore di aterosclerosi sistemica e marker prognostico di futuri eventi cardiovascolari e limitazione funzionale. Questo studio propone una strategia di screening dell'arteriopatia obliterante che giustifichi strategie di modificazione del rischio in modo da ridurre il rischio di mortalità da cause cardiovascolari.

Metodi. In questo studio prospettico e monocentrico sono stati reclutati tutti i pazienti tra 20 e 79 anni di età senza una storia clinica di malattia aterosclerotica cardiovascolare che si sono presentati nell'ambulatorio di medicina generale di Bereguardo (Pavia) tra Novembre 2018 ed Aprile 2019. Per ogni paziente è stato calcolato l'ABI e il rischio cardiovascolare a 10 anni usando l'American Heart Association/American College of Cardiology Atherosclerotic Cardiovascular Disease Risk Calculator. Sono stati successivamente calcolati l'accuratezza diagnostica dello score di rischio di trovare pazienti con ABI patologico, il rischio relativo, l'errore standard e l'intervallo di confidenza al 95%. I p values $\leq 0,05$ sono stati considerati statisticamente significativi a priori.

Risultati. 207 pazienti hanno partecipato allo studio. Tra i pazienti con rischio a 10 anni calcolabile (n=181, 87.4%), la prevalenza dell'arteriopatia obliterante periferica è risultata 21% (n=38). La sensibilità, specificità e accuratezza diagnostica per il riscontro di un ABI patologico in caso di rischio a 10 anni \geq borderline sono state rispettivamente 92.1%, 38.5% e 49.7% (RR: 5.50, 95% CI: 1.76-17.15, p=0.003). Per un rischio a 10 anni \geq intermedio sono state rispettivamente 89.5%, 48.3% e 56.9% (RR: 5.74, 95% CI: 2.13-15.50, p<0.001). Per i pazienti con rischio a 10 anni elevato la sensibilità, specificità e accuratezza diagnostica per il riscontro di un ABI patologico sono state rispettivamente 60.5%, 72.7%, 70.2% (RR: 2.94, 95% CI: 1.66-5.22, p<0.001).

Conclusione. La misurazione dell'ABI contribuisce ad individuare pazienti con arteriopatia obliterante periferica asintomatica senza storia clinica di malattia aterosclerotica cardiovascolare. Il nostro suggerimento è di sottoporre a screening tramite ABI tutti i pazienti con un rischio cardiovascolare a 10 anni intermedio.

COME IMPLEMENTARE LA DIAGNOSI CLINICA DI IPERCOLESTEROLEMIA FAMILIARE IN BAMBINI E ADOLESCENTI? EVIDENZE PRELIMINARI DAL GRUPPO LIPIGEN PEDIATRICO

M. Gazzotti¹, E. Olmastroni¹, C. Pederiva², M.E. Capra³, A.L. Catapano^{1,4}, M. Casula^{1,4}, on behalf of LIPIGEN Paediatric Group*

¹Servizio di Epidemiologia e Farmacologia Preventiva (SEFAP), Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano;

²U.O. Clinica Pediatrica, Servizio Clinico Dislipidemie per lo Studio e la Prevenzione dell'Aterosclerosi in Età Pediatrica, Ospedale San Paolo, Milano;

³Centro Dislipidemie in Età Evolutiva U.O. Pediatria e Neonatologia, Ospedale G. da Saliceto, Piacenza;

⁴IRCCS MultiMedica, Sesto S. Giovanni (MI)

Background. L'identificazione precoce di ipercolesterolemia familiare (FH) durante l'infanzia/adolescenza risulta complicata sia per la mancanza di algoritmi diagnostici validati sia per la presenza di un fenotipo meno severo nelle prime decadi di età. La presente analisi ha confrontato il Dutch Lipid Clinic Network (DLCN) score tra soggetti adulti e pediatrici (<18 anni) affetti da FH geneticamente confermata.

Metodi. Sono stati selezionati 1204 (≥18 anni) e 798 (<18 anni) soggetti FH con test genetico positivo, arruolati nello studio LIPIGEN, studio osservazionale focalizzato sui soggetti FH in Italia. È stato effettuato un confronto dei parametri del DLCN score e della proporzione delle informazioni mancanti tra i due gruppi.

Sulla base della distribuzione per percentili delle classi di colesterolo LDL (c-LDL) negli adulti, sono stati identificati *cut-off* di c-LDL specifici per bambini/adolescenti. Inoltre, sono stati analizzati i dati relativi alla presenza di malattia coronarica prematura (CHD) nei parenti di secondo grado.

Risultati. Tra i soggetti con FH geneticamente confermata, è stata riscontrata una diagnosi di FH probabile/definita (punteggio ≥6, come da DLCN originale) nel 67,1% degli adulti ma solo nel 26,9% dei bambini/adolescenti. In quest'ultimo gruppo, la percentuale aumentava a 52,1% utilizzando le nuove classi di c-LDL identificate (142-162, 163-214, 215-261, ≥262 mg/dL). La bassa percentuale dei segni tipici di FH è stata confermata nei bambini/adolescenti vs adulti: xantoma tendineo 2,9% vs 17,5% ed arco corneale 1,7% vs 17,5%, rispettivamente. Nessun bambino presentava storia clinica positiva di CHD prematura o malattia vascolare cerebrale/periferica precoce, presenti invece rispettivamente nel 12,9% e 4,5% degli adulti. Informazioni relative a CHD prematura nei parenti di primo grado erano mancanti nel 4,7% degli adulti e nel 14,2% dei bambini/adolescenti. Escludendo i mancanti, la prevalenza di CHD prematura era 43,9% negli adulti e solo 22,0% nei bambini, aumentando in questi ultimi al 51,8% se considerati anche i parenti di secondo grado (dati al momento disponibili per 229 soggetti <18 anni), senza però portare a cambiamenti rilevanti nella porzione di soggetti con diagnosi probabile/definita di FH.

Conclusioni. Nei bambini/adolescenti, il DLCN score è chiaramente meno informativo rispetto agli adulti. È necessaria una rimodulazione e successiva validazione di uno score *ad hoc* per questa sottopopolazione.

*Responsabili dei centri del gruppo LIPIGEN pediatrico: Francesco Angelico (Roma), Marcello Arca (Roma), Maurizio Averna (Palermo), Giacomo Biasucci (Piacenza), Claudio Borghi (Bologna), Paola Sabrina Buonuono (Roma), Paolo Calabrò (Caserta), France-

sca Carubbi (Modena), Francesco Cipollone (Chieti), Nadia Citroni (Trento), Giuliana Fortunato (Napoli), Ornella Guardamagna (Torino), Arcangelo Iannuzzi (Napoli), Lorenzo Iughetti (Modena), Graziana Lupattelli (Perugia), Giuseppe Mandraffino (Messina), Lorenzo Maroni (Varese), Giuliana Mombelli (Milano), Sandro Muntoni (Cagliari), Cristina Pederiva (Milano), Fabio Pellegatta (Sesto San Giovanni (MI)), Livia Pisciotta (Genova), Arturo Pujia (Catanzaro), Francesco Purrello (Catania), Paolo Rubba (Napoli), Carlo Sabbà (Bari), Riccardo Sarzani (Ancona), Giovanni Battista Vigna (Ferrara), Josè Pablo Werba (Milano), Sabina Zambon (Padova), Maria Grazia Zenti (Verona)

Comitato scientifico LIPIGEN: Marcello Arca (Roma), Maurizio Averna (Palermo), Stefano Bertolini (Genova), Sebastiano Calandra (Modena), Alberico Catapano (Milano), Patrizia Tarugi (Modena) Laboratorio centralizzato: Veronica Zampolieri (Cinisello Balsamo (MI))

EFFICACIA IN VITRO DI UN NUOVO ATTIVATORE DELLA LECITINA: COLESTEROLO ACILTRANSFERASI (LCAT)

M. Turri¹, C. Pavanello¹, A. Ossoli¹, A. Strazzella¹, S. Simonelli¹, K. Kono², K. Yamada³, N. Kiyosawa², L. Calabresi¹

¹Centro E. Grossi Paoletti, Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano;

²Specialty Medicine Research Laboratories I, Daiichi Sankyo Co., Ltd., Tokyo, Japan;

³Medical Affairs Planning Department, Daiichi Sankyo Co., Ltd., Tokyo, Japan

Introduzione. La lecitina:colesterolo aciltransferasi (LCAT) è l'unico enzima in grado di esterificare il colesterolo nel plasma e nei fluidi biologici e svolge un ruolo chiave nella maturazione delle HDL. Il deficit familiare di LCAT (FLD, OMIM #245900) è una malattia genetica rara legata a mutazioni "loss of function" nel gene *LCAT*, per la quale non esiste cura. In questo studio è stata valutata l'efficacia *in vitro* di un nuovo attivatore di LCAT (composto DS).

Metodi. L'efficacia *in vitro* dell'attivatore di LCAT è stata valutata misurando LCAT activity e colesterolo esterificazione rate (CER) su plasma e su apo-B depleted plasma di 6 soggetti controllo e 5 soggetti FLD portatori di diverse mutazioni nel gene. Sono state testate tre differenti dosi del composto (0,1, 1 e 10 µg/mL).

Risultati. Il composto ha aumentato significativamente sia CER (P<0.001) che LCAT activity (P=0.007) in tutti i campioni di plasma dei controlli in modo dose-dipendente. Sia CER che LCAT activity sono aumentate di 4-5 volte, raggiungendo la massima attivazione alla dose di 1 µg/mL. Il composto ha prodotto un aumento della CER in 2 dei 5 plasmi di portatori (mutazioni Leu372-Arg e Val309-Met), mentre l'LCAT activity è aumentata nel plasma di 3 portatori (Arg147-Trp, Thr274-Ile e Leu372-Arg). La mutazione Pro254-Ser non è stata attivata in nessuna delle condizioni testate.

Conclusioni. Il composto DS è un nuovo attivatore di LCAT capace di aumentare l'esterificazione del colesterolo nel plasma di controlli e di pazienti FLD. Questi risultati pongono le basi per un intervento terapeutico personalizzato per i portatori di FLD e supportano la potenziale attivazione di LCAT in deficit secondari di enzima.

ASSOCIAZIONE TRA L'INDICE DIETETICO INFIAMMATORIO E ATEROSCLEROSI SUBCLINICA CAROTIDEA NELLA POPOLAZIONE GENERALE

E. Mattavelli¹, L. Redaelli¹, C. Tidone¹, L. Grigore^{1,3}, F. Pellegatta^{1,3}, V. Zampoleri^{1,2}, A. Baragetti¹, A.L. Catapano^{1,3}
¹SISA Center for the Study of Atherosclerosis, Bassini Hospital, Cinisello Balsamo (MI);

²Department of Pharmacological and Biomolecular Sciences, University of Milan;

³IRCCS MultiMedica Hospital, Milano

Introduzione. Le scorrette abitudini alimentari sono predittori indipendenti sia dell'insorgenza di patologie metaboliche come il diabete di tipo 2 (DMT2) e sindrome metabolica (MetS) sia dell'evoluzione della malattia cardiovascolare aterosclerotica (ACVD). Recenti studi epidemiologici hanno rivalutato il potere predittivo del consumo di acidi grassi saturi, carboidrati e zuccheri per un aumentato rischio ACVD. Questo aspetto richiama la necessità di investigare se vi sia un effetto dei nutrienti che, al di là del loro impatto metabolico, possa spiegare la loro importanza nel determinare il rischio di ACVD; può essere questo legato all'effetto pro-anti-infiammatorio di tutti i singoli nutrienti che compongono la dieta, a parità di assunzione calorica giornaliera?

Il nostro obiettivo è stato quello di valutare l'associazione tra il bilancio dell'assunzione di nutrienti anti- e pro-infiammatori e la presenza di aterosclerosi carotidea sub-clinica (SCA, marcatore pre-clinico di ACVD) in soggetti senza complicanze metaboliche (DMT2 e MetS).

Materiali e metodi. Sono state raccolte le informazioni relative alla storia clinica, misure antropometriche e abitudini alimentari di 339 soggetti (coorte PLIC) in prevenzione primaria per ACVD, attraverso le quali abbiamo calcolato l'Energy Adjusted-Dietary Inflammatory Index (EA-DII), parametro indicativo del bilancio tra l'assunzione di nutrienti anti- e pro-infiammatori. Sono stati raccolti i dati relativi al profilo lipidico, ematocrito e alla high sensitivity C-Reactive Protein (hs-CRP).

I soggetti sono stati classificati, mediante ultrasonografica carotidea, in base alla presenza/assenza di SCA (+/- SCA) e suddivisi in quattro fenotipi vascolari, combinando le informazioni sulla +/- SCA e l'ispessimento della tonaca intima (IMT>0.9 mm) (-/+ IMT).

Risultati. Il bilancio dell'assunzione di nutrienti anti- e pro-infiammatori nel primo quartile di EA-DII è risultato significativamente differente tra i soggetti +SCA (41.9% del campione) e i soggetti -SCA (-2.19±0.10 vs -1.87±0.10 p=0.030). Abbiamo rilevato le stesse differenze nel quarto quartile di EA-DII (2.21±0.14 vs 1.81±0.12, p=0.042).

Livelli maggiori di hs-CRP sono risultati significativamente associati a valori maggiori di EA-DII nei soggetti -SCA/-IMT e la stessa relazione (non significativa) è emersa nei soggetti +SCA/+IMT.

Conclusioni. I risultati suggeriscono la presenza di un'associazione tra SCA e un'assunzione sbilanciata di nutrienti anti- e pro-infiammatori. L'associazione rilevata tra EA-DII e hs-CRP necessita ulteriori approfondimenti.

PROFILO CARDIOMETABOLICO NELLE COORTI PLIC-MI E PLIC-CHIESA: UN CONFRONTO TRA DUE REALTÀ TERRITORIALI DIFFERENTI

O. Colpani^{1,2}, E. Tragni¹, M. Casula^{1,3}, E. Olmastroni¹,

A.L. Catapano^{1,3}, P. Magni^{1,3}, on behalf of PLIC Study Group

¹Centro Interuniversitario di Epidemiologia e Farmacologia Preventiva (SEFAP), Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari (DiSFeB), Università degli Studi di Milano;

²Fondazione Bruno Kessler, Trento;

³IRCCS MultiMedica, Sesto S. Giovanni (MI);

⁴SISA Centro per lo Studio della Aterosclerosi, Ospedale Bassini, Cinisello Balsamo (MI)

Introduzione. È noto come fattori ambientali ed esercizio fisico influenzino il benessere cardiovascolare. Abbiamo caratterizzato due coorti di soggetti arruolati in due progetti: il PLIC-MI (condotto nell'area urbana di Milano) e il PLIC-CHIESA (svolto a Chiesa in Valmalenco, in provincia di Sondrio). Essendo questi contesti geografici molto diversi, queste popolazioni differiscono per abitudini nutrizionali, socioculturali e stile di vita. Abbiamo quindi voluto analizzare il profilo cardiometabolico nelle due coorti, per indagare se questo riflettesse le diverse caratteristiche di queste popolazioni.

Metodi. I volontari degli studi PLIC-MI e PLIC-CHIESA sono stati sottoposti ad un esame clinico, un'ultrasonografia delle carotidi e ad un prelievo di un campione di sangue a digiuno. Per queste analisi, i soggetti delle due coorti sono stati appaiati 1:1 per età e sesso. I parametri clinici e biochimici e la storia di eventi cardiovascolari pregressi sono stati comparati. Per confrontare gli stili di vita, abbiamo calcolato uno score basato su attività fisica, consumo di alcol, fumo e aderenza alla dieta mediterranea (valutata tramite il questionario PREDIMED). Tale score andava da 0 a 4; valori ≥3 sono stati considerati come indicatori di uno stile di vita sano.

Risultati. Da ciascuna coorte è stato selezionato un totale di 406 soggetti (42,8% maschi, età media 55 anni). I volontari dello studio PLIC-MI avevano maggiori peso medio (72,1 vs 68,5 kg, p<0,001), indice di massa corporea (26,5 vs 25,8 kg/m², p<0,05) e circonferenza vita (91,0 vs 88,2 cm, p=0,001) e mostravano una maggior prevalenza di sindrome metabolica (25,1% vs 19,3%, p<0,05). Inoltre, la prevalenza di aterosclerosi subclinica e di malattia cardiovascolare erano maggiori nella coorte PLIC-MI (31,0% vs 24,9%, p<0,05; 8,1% vs 3,4%, p<0,01 rispettivamente). I soggetti PLIC-CHIESA erano meno aderenti alla dieta mediterranea (punteggio PREDIMED medio 7,38 vs 8,22, p<0,001) ma avevano una maggior prevalenza di attività fisica (77,8% vs 51,2%, p<0,001) e uno stile di vita più salutare (61,6% vs 53,5%, p<0,05).

Conclusioni. Nonostante una minor aderenza alla dieta mediterranea, i soggetti della coorte PLIC-CHIESA hanno mostrato un profilo cardiometabolico complessivamente più salutare. L'identificazione dei determinanti delle differenze emerse da questa analisi necessitano di ulteriori studi.

CARATTERIZZAZIONE TRAMITE SPETTROMETRIA DI MASSA DEI SITI DI FRAMMENTAZIONE DELLE CATENE LEGGERE DELLE FIBRILLE NELL'AMILOIDOSI AL

G. Mazzini¹, P. Rognoni¹, S. Caminito¹, G. Merlini¹, G. Palladini¹, S. Ricagno², F. Lavatelli¹

¹Centro per lo Studio e la Cura delle Amiloidosi Sistemiche, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo e Università di Pavia;

²Dipartimento di Bioscienze, Università degli Studi di Milano

Introduzione. L'amiloidosi AL è una patologia causata dall'aggregazione in fibrille di catene leggere (CL) immunoglobuliniche monoclonali nei tessuti bersaglio, con disfunzione degli organi coinvolti. La presenza di frammenti di CL nei depositi impone di definire se la frammentazione del precursore abbia un ruolo nella fibrillogenesi, o se, viceversa, la degradazione delle fibrille post-deposizione contribuisca alla rimozione del depositi. L'identificazione dei residui terminali dei frammenti è utile per comprendere enzimi e processi coinvolti nella frammentazione. In questa fase del progetto sono stati caratterizzati i residui terminali di frammenti di CL a livello delle fibrille di amiloide nel tessuto miocardico in due pazienti affetti da cardiomiopatia amiloide.

Metodi. Campioni di miocardio sono stati ottenuti da due pazienti affetti da amiloidosi AL durante autopsia e trapianto cardiaco. Il tessuto è stato omogeneizzato in tampone Tris-EDTA [1] con inibitore delle proteasi, poi sono state eseguite centrifugazioni per arricchire le fibrille di amiloide. Per caratterizzare i residui N- e C-terminali delle CL nelle fibrille, le ammine primarie e i gruppi carbosilici liberi sono stati marcati covalentemente ed i campioni sono stati analizzati tramite LC-MS/MS e ricerca in database. I siti di taglio identificati sono stati mappati sulle strutture native e fibrillari delle CL, precedentemente ottenute nell'ambito di questo progetto (1, 2).

Risultati. In entrambi i campioni, sono state rilevate sia la CL intatta che frammenti di diversa lunghezza. I siti di frammentazione identificati sono localizzati sia nella regione variabile che in quella costante della CL. Tuttavia, mentre nella regione variabile tali siti di frammentazione sono scarsi o concentrati in specifiche regioni della molecola, nella regione costante sono ampiamente distribuiti su tutta la sequenza. Il mappaggio dei siti di taglio sulle strutture delle CL ha permesso di rilevare come tali siti siano accomunati dal fatto di essere localizzati in regioni che, nella fibrilla, sono scarsamente strutturate.

Conclusioni. Questo studio fornisce importanti informazioni per comprendere il processamento post-traduzionale delle catene leggere amiloidogeniche. La mappatura dei siti di taglio suggerisce che il profilo di frammenti di CL nelle fibrille AL mature derivi ampiamente da fenomeni di degradazione dopo la deposizione.

Bibliografia

1. Swuec et al., Nat Commun. 2019; 10: 1269.
2. Oberti et al., Sci Rep. 2017; 7: 16809.

Cariplo giovani 2016-0489: "Systemic AL amyloidosis and the heart: molecular and cellular determinants of light chains proteotoxicity".