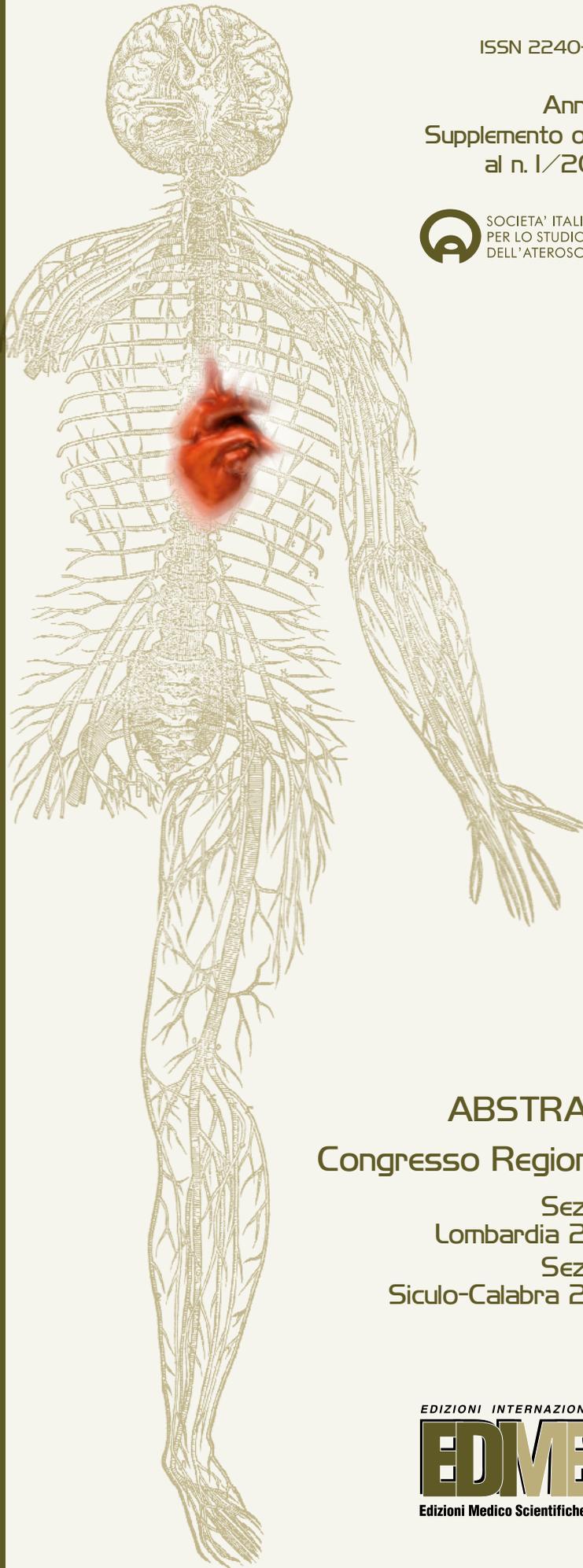


GIORNALE ITALIANO dell'ARTERIOSCLEROSI



ISSN 2240-4821

Anno 13
Supplemento online
al n. 1/2022



SOCIETÀ ITALIANA
PER LO STUDIO
DELL'ARTERIOSCLEROSI

ABSTRACT
Congresso Regionale
Sezione
Lombardia 2021
Sezione
Siculo-Calabria 2021

EDIZIONI INTERNAZIONALI s.r.l.

EDMES

Edizioni Medico Scientifiche - Pavia

SOCIETÀ ITALIANA PER LO STUDIO DELLA ATEROSCLEROSI (SISA)

XX Congresso della Sezione Lombardia

Milano, 7-9 ottobre 2021

Nei giorni 7-9 ottobre 2021 si è tenuto a Milano il 15° Congresso Nazionale della Società di Terapia Clinica e Sperimentale (SITECS). Come oramai 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.

Nelle letture plenarie, sono state affrontate alcune tematiche inerenti i metodi di ricerca scientifica, dai trial clinici agli studi genetici. Il congresso è stato inoltre occasione per approfondire la gestione delle dislipidemie, ripercorrendo le linee guida attuali e rivedendo i dati più recenti relativamente ai trattamenti disponibili, dagli omega-3, agli inibitori di PCSK9, fino alle terapie di combinazione. Un focus è stato dedicato alle dislipidemie rare su base genetica e alle ultime evidenze dai registri di popolazione.

Il tema della prevenzione cardiovascolare è stato anche affrontato al di là dell'intervento ipolipemizzante, discutendo del ruolo dell'infiammazione e della gestione appropriata del paziente cardiologico.

Infine, nel consueto simposio congiunto delle sezioni lombarde delle società AMD (Associazione Medici Diabetologi), SID (Società Italiana di Diabetologia) e SISA sono state discusse le più recenti evidenze circa i benefici cardiovascolari degli inibitori SGLT2 e si è affrontata la gestione del diabete in presenza di due comorbilità frequenti, quali la malattia renale e lo scompenso cardiaco.

COMUNICAZIONI ORALI

RUOLO DELLA PRENILCISTEINA OSSIDASI 1 NELL'ATEROGENESI

C. Banfi¹, S.S. Barbieri², M. Brioschi¹, A. Guarino³, S. Ghilardi¹, L. Sandrini², G. Polvani⁴, E. Tremoli², R. Baetta¹
¹Centro Cardiologico Monzino IRCCS, Unit of Proteomics, Milano;
²Centro Cardiologico Monzino IRCCS, Milano;
³Centro Cardiologico Monzino IRCCS, Cardiovascular Tissue Bank, Milano;
⁴Centro Cardiologico Monzino IRCCS, Department of Cardiovascular Disease, Development and Innovation Cardiac Surgery Unit, Milano

Grazie a studi di proteomica, abbiamo scoperto che la prenilcisteina ossidasi (PCYOX1), un enzima coinvolto nella degradazione delle proteine prenilate, è associata alle lipoproteine aterogene e, in presenza del suo substrato farnesilcisteina, può generare perossido di idrogeno.

Al fine di comprendere le funzioni biologiche di PCYOX1 ed il suo ruolo nello sviluppo dell'aterosclerosi, lo studio si è articolato in varie fasi che prevedevano l'analisi delle funzioni biologiche in colture cellulari, mediante l'integrazione di studi di proteomica con approcci di silenziamento genico, e studi in modelli sperimentali di aterosclerosi.

I risultati ottenuti indicano che l'ablazione genica di PCYOX1 è associata ad una ritardata progressione della lesione aterosclerotica. La delezione del gene codificante per PCYOX1 è associata ad una riduzione dell'area della lesione nella radice aortica pari al 30% circa in topi sottoposti a dieta aterogena per 4 e 8 settimane. L'ablazione genica di PCYOX1 altera inoltre in maniera favorevole il bilancio tra le componenti destabilizzanti (lipidi e macrofagi) e le componenti stabilizzanti (cellule muscolari lisce e collagene), con conseguente riduzione della vulnerabilità di placca.

Inoltre l'ablazione genica di PCYOX1 riduce il peso corporeo (-14%) e migliora il profilo lipoglucidico. In particolare, l'analisi del profilo lipidico e glucidico ha rivelato come il deficit di PCYOX1 sia associato a più bassi livelli plasmatici di colesterolo totale (-26%), colesterolo libero (-24%), colesterolo estere (-25%), trigliceridi (-44.5%), e fosfolipidi (-23%) e della glicemia (-23%). Ulteriori risultati indicano che topi *Pcyox1-/-/apoE-/-* mostrano una riduzione dei livelli di malondialdeide (MDA) sia nel plasma (-23%), sia nelle lesioni aterosclerotiche rispetto a topi *Pcyox1+/+/apoE-/-* sottoposti a dieta aterogena per 8 settimane. Infine l'ablazione genica di *Pcyox1* determina una riduzione della risposta infiammatoria nei macrofagi peritoneali isolati da topi *Pcyox1-/-/apoE-/-* e stimolata in vitro con endotossina batterica.

In conclusione, questi risultati identificano l'enzima pro-ossidante PCYOX1 come un nuovo attore nell'aterogenesi e, pertanto, è probabile che la comprensione della biologia e dei meccanismi di tutte le funzioni di questo enzima unico potrà fornire significative opportunità terapeutiche.

ALTERATA DEPOSIZIONE DI LIPIDI E AUMENTATO STATO INFIAMMATORIO IN TOPI NORMOCOLESTEROLEMICI CON DEFICIT DI HDL

A. Colombo¹, M. Busnelli¹, S. Manzini¹, E. Franchi¹, F. Arnaboldi², E. Donetti², E. Scanziani^{3,4}, G.D. Norata^{1,5}, G. Chiesa¹
¹Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano; ²Dipartimento di Scienze Biomediche per la Salute, Università degli Studi di Milano; ³Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Milano; ⁴Mouse and Animal Pathology Laboratory (MAPLab), Fondazione UniMi, Milano; ⁵Centro per lo Studio dell'Aterosclerosi, Ospedale Bassini, Cinisello Balsamo, Milano

Le lipoproteine ad alta densità (HDL) e la loro componente proteica principale, apolipoproteina A-I, rivestono un ruolo fondamentale nel regolare l'omeostasi del metabolismo del colesterolo e l'attivazione del sistema immunitario. Nel presente studio, è stato valutato come una manipolazione genetica dei livelli di HDL/apoA-I potesse impattare sulla deposizione lipidica nella cute, negli organi linfoidi e nelle coronarie di topi alimentati con una dieta standard per roditori.

Topi privi di apolipoproteina E (EKO), topi privi di apolipoproteina E e apolipoproteina A-I (DKO), topi DKO sovraespressanti l'isoforma umana di apoA-I (DKO/hA-I) e topi C57Bl/6 di controllo (WT) sono stati alimentati con una dieta chow fino a 30 settimane di età. Sono stati dosati i lipidi plasmatici, lo sviluppo di aterosclerosi è stato valutato nel seno aortico e nelle coronarie, l'ultrastruttura della cute è stata investigata mediante microscopia elettronica. Il sangue e gli organi linfoidi sono stati valutati mediante analisi istologiche/citofluorimetriche.

I topi DKO erano caratterizzati da una pressoché totale assenza di HDL e da livelli di colesterolo totale nel plasma paragonabili a quelli dei topi WT.

Solo i topi DKO hanno mostrato una alterazione del derma subpapillare, con deposito di cristalli di colesterolo e cellule schiumose. La deposizione di lipidi neutri era aumentata nel derma ispessito dei topi DKO rispetto agli altri genotipi. Segni di severa infiammazione erano presenti nei linfonodi drenanti la cute dei topi DKO. Inoltre, la deposizione di lipidi neutri nel parenchima linfonodale era estremamente ridotta nei topi WT, EKO e DKO/hA-I, mentre era estremamente elevata nei topi DKO.

Una aumentata presenza di linfociti T CD4+ effector memory era osservabile in sangue, milza e linfonodi drenanti la cute di topi DKO.

Un significativo peggioramento dello sviluppo di aterosclerosi era presente nel seno aortico e nelle coronarie di topi DKO rispetto ai topi EKO. La sovraespressione di apolipoproteina A-I umana, nel background DKO, è stata in grado di prevenire il fenotipo cutaneo, ridurre lo stato infiammatorio e rallentare marcatamente la progressione dell'aterosclerosi.

In conclusione, la mancanza di HDL, pur in assenza di iperlipidemia, si associa a severe modificazioni della morfologia cutanea, aumentata insorgenza di aterosclerosi e alterata attivazione del sistema immunitario.

IMPATTO DI ASGR1 SUL METABOLISMO DELLE LIPOPROTEINE E NELL'ATEROSCLEROSI

M. Svecla¹, A. Moregola¹, P. Ubaldi¹, L. Da Dalt¹, F. Bonacina¹, A.L. Catapano^{1,2}, G.D. Norata^{1,3}

¹Department of Pharmacological and Biomolecular Sciences, University of Milan; ²IRCCS Multimedica Hospital, Sesto San Giovanni, Milano; ³Centro SISA, Ospedale Bassini, Cinisello Balsamo, Milano

Introduzione: Il recettore epatico dell'asialoglicoproteina 1 (ASGR1) è coinvolto nella rimozione dalla circolazione di diverse glicoproteine desialilate tra cui vitamina B12, fosfatasi alcalina, LDL, residui di chilomicroni, fibronectina, IgA ma anche piastrine e cellule apoptotiche. Nei soggetti con mutazioni "loss of function" la perdita di funzione in ASGR1 si traduce in livelli più bassi di colesterolo plasmatico non HDL rispetto ai non portatori e una riduzione del 34% del rischio di malattia coronarica.

Scopo: Indagare il meccanismo molecolare di ASGR1 nel controllo del catabolismo delle lipoproteine e del metabolismo epatico in condizioni di ipercolesterolemia.

Metodi: La "Fast protein liquid chromatography" (FPLC) è stata eseguita sui plasmidi di topi LDL-R^{-/-} e ASGR1^{-/-}/LDL-R^{-/-}, alimentati con dieta ricca in colesterolo (WTD) per 16 settimane mentre sui fegati di questi animali è stata eseguita proteomica utilizzando lo spettrometro di massa Orbitrap Fusion™ Tribrid™ seguito da inferenza proteica e quantificazione.

Risultati: È stata osservata una riduzione nel colesterolo plasmatico in ASGR1^{-/-}/LDL-R^{-/-} rispetto a LDL-R^{-/-} (p=0,03). Quando l'analisi si è concentrata sugli enzimi della cascata di N-glicosilazione nel fegato, Ddost, che controlla il trasferimento di glicani da Dolicol-PP ad asparagina in ER, è risultato down-regolato (p<0,001) ed anche le glucosidasi (Ganab, Prkesh) che favoriscono un corretto ripiegamento delle proteine in concerto con il chaperon della lectina Calnexin/Calreticulin e ERp57 sono risultate down-regolate. In parallelo ERGIC-53 che opera il trasporto di glicoproteine da ER a Golgi è significativamente down-regolato mentre Derlin-1 (p<0,01) che aumenta in presenza di proteine "misfolded" viene up-regolato. Questi dati suggeriscono che durante l'aterosclerosi si verifica una ridotta produzione di proteine glicosilate, associata a una riduzione del trasporto di proteine dall'ER al Golgi.

Conclusione: I nostri dati suggeriscono che un'alterazione nella N-glicosilazione delle apolipoproteine avviene all'interno del fegato di topi LDL-R alimentati con WTD vs ASGR1/LDL-R KO. Ciò potrebbe riflettersi in un'ulteriormente alterazione del rilascio delle apolipoproteine nel plasma.

RUOLO DELLE CELLULE NATURAL KILLER IPER-ATTIVATE NELL'ATEROSCLEROSI SPERIMENTALE

J. Nour¹, F. Bonacina¹, A. Moregola¹, R. Bellini¹, C. Garlanda², A.L. Catapano^{1,3}, G.D. Norata^{1,4}

¹Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano; ²Dipartimento di Scienze Biomediche, Istituto Clinico Humanitas, IRCCS, Rozzano; ³IRCCS Multimedica, Milano; ⁴Centro SISA, Ospedale Bassini, Cinisello Balsamo, Milano

Scopo: Le cellule Natural Killer (NK) sono cellule linfoidi innate di particolare importanza nella risposta antitumorale e antivirale. La loro attività è influenzata dall'Interleukin 1 receptor 8 (Il-1r8), un recettore in grado di modulare l'eccessiva attivazione di recettori per le Interleuchine e Toll-like. Topi privi dell'espressione di Il-1r8 presentano un fenotipo di NK iper-attivate. Lo scopo di questo studio è quello di studiare l'impatto delle NK iper-attivate nell'aterosclerosi.

Metodi: Topi maschi C57BL/6J LDLR KO e Il-1r8/LDLR double KO (DKO) sono stati sottoposti a dieta standard (ChowD) o dieta arricchita in colesterolo (WTD) per 12 settimane per indurre la patologia aterosclerotica. Per valutare l'effetto della presenza di NK iper-attivate nell'aterosclerosi, sono state eseguite analisi del profilo lipidico e immunitario circolanti e analisi istologica della lesione aterosclerotica a livello dell'arco aortico.

Risultati: Le cellule Natural killer mature (CD27- CD11b+) circolanti aumentano in topi LDLR KO, quando sottoposti per 12 settimane a dieta ipercolesterolemizzante rispetto a dieta standard (p<0,01). Per meglio comprendere questo fenomeno, abbiamo indotto iperattivazione delle Natural Killer in un modello sperimentale di aterosclerosi, tramite delezione dell'Il-1r8 in topi LDLR KO. A dieta standard la mancanza di Il-1r8 non si riflette in cambiamenti delle popolazioni immunitarie circolanti né residenti, mentre il trattamento con WTD per 12 settimane induce un aumento sia di NK mature (p<0,0001), sia di monociti (p<0,05) in circolo rispetto al modello LDLR KO. Nonostante queste alterazioni immunitarie nei DKO, colesterolo e trigliceridi plasmatici non presentano differenze tra i due gruppi sperimentali. In parallelo, l'analisi delle placche aterosclerotiche a livello del seno aortico mostra lo sviluppo di una lesione paragonabile nei modelli LDLR KO e DKO, per area, stabilità e infiltrazione macrofagica.

Conclusioni: La presenza di Natural killer circolanti iper-attivate non influenza lo sviluppo di aterosclerosi e l'Il-1r8 svolge un'attività che può essere considerata ridondante nella patologia aterosclerotica.

IL TRATTAMENTO CON RUPATADINA IN TOPI KNOCKOUT PER APOLIPOPROTEINA È ASSOCIATO A UN PEGGIORAMENTO DELL'ATEROSCLEROSI E A UN ALTERATO RECLUTAMENTO DEI LINFOCITI T

E. Franchi¹, M. Busnelli¹, S. Manzini¹, A. Colombo¹, F. Bonacina¹, G.D. Norata¹, S. Castiglioni¹, C. Andronis², E. Lekka², E. Scanziani^{3,4}, G. Chiesa¹

¹Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano; ²Biovista, 34 Rodopoleos Street, 16777 Atene, Grecia; ³Mouse and Animal Pathology Laboratory (MAPLab), Fondazione UniMi, Milano; ⁴Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Milano

La rupatadina è un antistaminico di seconda generazione e antagonista del fattore di attivazione delle piastrine, in grado di ridurre il reclutamento di macrofagi e granulociti e di inibire l'aggregazione piastrinica. L'insieme di questi effetti suggerisce che il trattamento con rupatadina potrebbe rappresentare un approccio innovativo nel trattamento dell'aterosclerosi.

Per valutare questa ipotesi, topi femmina di 9 settimane di età, knockout per apolipoproteina E (n=15 per gruppo), sono stati alimentati con una dieta Western (controllo) o con dieta Western contenente rupatadina (0,017% p/p) per 12 settimane.

Il trattamento non ha influenzato l'assunzione di cibo/acqua, né ha avuto effetti sul peso corporeo o su quello degli organi valutati. I principali parametri istologici di fegato, rene, polmone e milza non sono stati modificati dal trattamento farmacologico.

I livelli di colesterolo e trigliceridi plasmatici erano paragonabili tra i due gruppi, ma, inaspettatamente, il trattamento con rupatadina ha determinato un maggiore sviluppo di placca nel seno aortico. Tra i due gruppi erano tuttavia paragonabili l'area del core necrotico, la quantità di matrice extracellulare, l'area occupata da lipidi neutri e la quantità di macrofagi. Indipendentemente dal trattamento, non è stata rilevata la presenza di mastociti all'interno delle placche, e quantità comparabili di mastociti erano presenti nel parenchima cardiaco dei due gruppi. Inaspettatamente, nei topi trattati si è osservato un aumento dei linfociti T infiltranti la placca (+70%) e il miocardio attorno al seno aortico (+80%).

A partire da quest'ultima osservazione, l'effetto della rupatadina sui linfociti T è stato valutato anche in vitro: il trattamento non ha influenzato la proliferazione cellulare né la polarizzazione CD4/CD8. Al contrario, la rupatadina ha promosso la polarizzazione Th1 e Th2 dei linfociti CD4+. I linfociti Th1 hanno note azioni pro-aterogene, mentre l'impatto dei Th2 sull'aterosclerosi è ancora controverso.

In conclusione, i risultati del presente lavoro mostrano, per la prima volta, che il trattamento con rupatadina in topi knockout per apolipoproteina e alimentati con dieta a elevato contenuto lipidico determina un peggioramento nello sviluppo di aterosclerosi associato ad un'aumentata attivazione linfocitaria.

IL RISCHIO TROMBOTICO ASSOCIAO AL POLIMORFISMO BDNFVAL66MET È MODULATO DALL'ATTIVAZIONE DEL RECETTORE $\alpha 2$

L. Sandrini¹, P. Amadio¹, A. Ieraci², A. Malara^{3,4}, J.P. Werba⁵, P.M. Soprano^{3,4}, A. Balduini^{3,4}, M. Zarà¹, A. Bonomi⁶, F. Veglia⁶, G.I. Colombo⁷, M. Popoli², F.S. Lee⁸, E. Tremolli⁹, S.S. Barbieri¹
¹Unità Asse Cuore-Cervello: Meccanismi Cellulari e Molecolari, Centro Cardiologico Monzino, IRCCS, Milano; ²Laboratorio di Neuropsicofarmacologia e Neurogenomica Funzionale, Dipartimento di Scienze Farmacologiche, Università degli Studi di Milano; ³Dipartimento di Medicina Molecolare, Università di Pavia; ⁴Laboratorio di Biochimica, Biotecnologia e Diagnostica Avanzata, Fondazione San Matteo, IRCCS, Pavia; ⁵Unità di Prevenzione dell'Aterosclerosi, Centro Cardiologico Monzino, IRCCS, Milano; ⁶Unità di Biostatistica, Centro Cardiologico Monzino, IRCCS, Milano; ⁷Unità di Immunologia e Genomica Funzionale, Centro Cardiologico Monzino, IRCCS, Milano; ⁸Dipartimento di Psichiatria, Weill Cornell Medical College, New York, USA; ⁹Ospedale Maria Cecilia, Cotignola, Ravenna

La depressione è considerato un fattore di rischio modificabile per le malattie coronariche (CAD) e la sua gestione in ambito clinico è perciò fortemente raccomandata. Il trattamento d'elezione per la depressione è basato sull'utilizzo di farmaci specifici i quali tuttavia mostrano un profilo di efficacia e sicurezza ancora non ben definito in pazienti con CAD.

Abbiamo precedentemente dimostrato come il polimorfismo Val66Met del brain-derived neurotrophic factor (BDNF), che si sa essere legato a depressione, è associato a trombosi arteriosa in un modello murino e ad un aumentato rischio di infarto acuto del miocardio. Nel presente studio, approfondendo tale argomento, mostriamo che, in topi recanti il polimorfismo BDNFVal66Met in omozigosi (BDNFMet/Met), la desipramina, un inibitore della ricaptazione della noradrenalina (NA), è in grado di revertire contemporaneamente i fenotipi simil-ansioso/depressivo e protrombotico, ridurre l'aumentata coagulazione e la iper-reattività piastrinica, normalizzare il numero di cellule circolanti nel sangue e il numero di megacariociti midollari ristabilendo i livelli fisiologici di NA.

I dati in vitro, ottenuti utilizzando cellule trasfettate con il plasmide BDNFMet o con il peptide clivabile pro-BDNFMet, confermano la maggiore attività procoagulante e l'aumentata espressione del recettore adrenergico $\alpha 2A$ ($\alpha 2A$ -ADR) osservata nei topi BDNFMet/Met e dimostrano che la presenza di NA associata con l'allele mutato Met è fondamentale per aumentare l'attività procoagulante e indurre una maggior generazione di piastrine.

Il trattamento con rauwolfscina, un antagonista $\alpha 2$ -ADR, reverte, così come avveniva inseguito al trattamento con desipramina, il fenotipo pro-trombotico sia nel modello murino sia nei modelli in vitro.

Infine, pazienti CAD con genotipo BDNFMet/Met hanno piastrine iper-attivate che esprimono maggiori livelli di $\alpha 2A$ -ADR. Il più alto numero di piastrine circolanti misurato nei pazienti BDNFMet/Met rispetto ai pazienti non recanti la mutazione ben riflette l'aumentato rilascio di propiastatine prodotte dai megacariociti differenziati dalle loro cellule ematiche.

Questi dati rivelano un ruolo critico, non descritto in precedenza, dell'allele Met nell'alterare il pathway NA/ $\alpha 2A$ -ADR. Aggiungono così un tassello fondamentale per spiegare la predisposizione alla trombosi associata alla mutazione BDNFVal66Met, e suggeriscono un potenziale bersaglio terapeutico per la cura della trombosi associata a depressione in questo specifico sottogruppo di pazienti CAD.

CER-001 MIGLIORA IL PROFILO LIPOPROTEICO NEL DEFICIT FAMILIARE DI LCAT

M. Turri¹, C. Pavanello¹, A. Strazzella¹, P. Tulissi², S. Pizzolitto³, G. De Maglio³, R. Nappi², G. Boscutti², L. Calabresi¹

¹Centro E. Grossi Paoletti, Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Milano; ²Unità di Nefrologia, Dialisi e Trapianto Renale, Ospedale S. Maria della Misericordia, Azienda Sanitaria Universitaria Friuli Centrale (ASUFC), Udine; ³Unità di Patologia, Ospedale S. Maria della Misericordia, Azienda Sanitaria Universitaria Friuli Centrale (ASUFC), Udine

Background: Il deficit familiare di LCAT (FLD) è una malattia rara e recessiva del metabolismo lipidico ad oggi senza cura. La causa maggiore di morbilità e mortalità nel FLD è l'insufficienza renale. La maggior causa di nefrotossicità è rappresentata dalla lipoproteina X (LpX), una lipoproteina assente in condizioni fisiologiche. L'infusione dell'HDL sintetica CER-001 ha mostrato una riduzione del danno renale nel modello murino di deficit di LCAT. CER-001 è stato testato in un portatore FLD con una ricomparsa estremamente veloce del danno renale allo scopo di rallentare la progressione della patologia.

Metodi: CER-001 è stato infuso alla dose di 10 mg/kg 3 volte a settimana per 3 settimane, seguito da 2 volte a settimana per 3 settimane ed infine una volta a settimana per 6 settimane. I campioni di plasma e urine sono stati collezionati a tutte le visite, prima dell'infusione di CER-001, e alla fine del trattamento. Il profilo lipidico-lipoproteico è stato determinato con l'analizzatore Roche Integra c311. La frazione lipoproteica 1.020-1.063 g/mL è stata separata ad ogni timepoint tramite ultracentrifugazione e poi analizzata in fast performance liquid chromatography. La distribuzione delle sottoclassi di HDL è stata caratterizzata da 2D-elettroforesi. L'ApoA1 nelle urine è stata analizzata con western blot.

Risultati: L'infusione di CER-001 non cambia sostanzialmente i livelli lipidici, tuttavia dopo 3 settimane di trattamento i livelli di trigliceridi diminuiscono in modo transiente, mentre il colesterolo non esterificato (UC) aumenta. L'HDL sintetica produce un rimodellamento del profilo lipoproteico, riducendo LpX circolante in favore di LDL di normali dimensioni. Il rimodellamento avviene lentamente, suggerendo una progressiva scomparsa dell'LpX, che probabilmente agisce come shuttle/sink di fosfolipidi e UC. La distribuzione delle sottoclassi di HDL non ha mostrato cambiamenti significativi. In accordo con la breve emivita, CER-001 non è stato ritrovato nel plasma, ma nei campioni d'urina.

Conclusioni: Questi risultati dimostrano che CER-001 induce una normalizzazione delle lipoproteine nel FLD tramite la riduzione di LpX con conseguente diminuzione dell'accumulo di colesterolo nelle cellule renali. CER-001 rappresenta una possibile terapia per il deficit di LCAT, che ad oggi ancora non ha cura.

ASSOCIAZIONE PCSK9-LDL DURANTE LA TERAPIA CON ANTICORPI MONOCLONALI ANTI-PCSK9

L. Canclini^{1,2}, A. Baragetti^{2,3}, N. Jabnati², A.M. Malvandi¹, 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, Milano

Introduzione e Scopo: Elevati livelli plasmatici di colesterolo LDL (LDL-C) aumentano il rischio cardiovascolare. La Proteina Convertasi Subtilisina/Kexina di tipo 9 (PCSK9), riducendo l'espressione del recettore per le LDL, modula i livelli di LDL-C. L'inibizione di PCSK9 con anticorpi monoclonali (mAbs) riduce i livelli di PCSK9 e quindi di LDL circolanti ed è di comprovata efficacia clinica nel ridurre eventi cardiovascolari su base ischemica. Nostri precedenti studi hanno documentato una specifica interazione tra PCSK9 ed LDL. Scopo del nostro studio è valutare se la somministrazione di mAbs possa modificare la presenza e quantità di PCSK9 associata alle LDL dopo trattamento.

Metodi: Abbiamo isolato le lipoproteine plasmatiche di 15 pazienti tramite ultracentrifuga in gradiente di Iodixanolo, sia prima di iniziare la terapia con mAbs anti-PCSK9 (T0, n=15), sia uno (T1, n=12), tre (T3, n=14) e sei (T6, n=12) mesi dopo l'inizio del trattamento con Alirocumab 75 mg (n=3)/150 mg (n=2) o Evolocumab 140 mg (n=10). Abbiamo quantificato colesterolo e trigliceridi nelle frazioni lipoproteiche ottenute mediante saggi colorimetrici. PCSK9 è stato dosato tramite ELISA (R&D Systems). Le frazioni lipoproteiche sono state analizzate tramite elettroforesi capillare ed immunoblotting.

Risultati: In seguito all'intervento terapeutico i livelli di LDL-C sono diminuiti da 150±74 mg/dL al T0, a 62±39 mg/dL al T1, 65±54 mg/dL al T3 e 49±25 mg/dL al T6. I livelli plasmatici di PCSK9, 412±140 ng/mL al T0, sono aumentati a 3792±1257 ng/mL al T1, 4043±969 ng/mL al T3 e 4039±1119 ng/mL al T6. In seguito alla separazione delle lipoproteine al T0, il 9.5±4.7% di PCSK9 era nella frazione LDL, percentuale che si attestava attorno al 6.1±3.4%, 5.6±3.8% e 5±3.8% rispettivamente al T1, T3 e T6.

Conclusioni: Nonostante la drastica riduzione di LDL-C conseguente la terapia, PCSK9 rimane associato ad una specifica sottofrazione LDL; post trattamento la quantità assoluta di PCSK9 legato aumenta di oltre 10 volte. Restano da definire le cause di questo incremento, così come il significato biologico e la caratterizzazione molecolare dell'interazione PCSK9-LDL che sono materia di ulteriore approfondimento nel nostro laboratorio.

DEPRESSIONE E RISCHIO CARDIOVASCOLARE: POSSIBILE RUOLO DELLA PROTEINA PCSK9

C. Macchi¹, M.F. Greco¹, C. Favero², L. Vigna³, M. Buoli^{4,5}, C.R. Sirtori¹, A. Corsini^{1,6}, V. Bollati², 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; ³Medicina del Lavoro, Fondazione Cà Granda, IRCCS Ospedale Maggiore Policlinico, Milano;

⁴Dipartimento di Fisiopatologia Medico-Chirurgica e dei Trapianti, Università degli Studi di Milano; ⁵Dipartimento delle Neuroscienze e Salute Mentale, Fondazione Cà Granda, IRCCS Ospedale Maggiore Policlinico, Milano; ⁶IRCCS, Multimedica, Sesto San Giovanni, Milano

La prevalenza globale della condizione di obesità è in continuo aumento a causa dell'assunzione di stili di vita scorretti caratterizzati da un'alimentazione non equilibrata e da un'eccessiva sedentarietà. L'obesità si associa ad un aumentato rischio di insorgenza di patologie cardiovascolari e di disturbi della sfera emotiva. La depressione, la cui prevalenza raddoppia nelle donne, affligge circa il 10% della popolazione aumentandone il rischio cardiovascolare. Sebbene sia chiara l'esistenza di un nesso tra obesità, depressione e patologie cardiovascolari, come queste condizioni siano interconnesse tra loro rimane un quesito aperto. Risulta fondamentale, quindi, la ricerca dei meccanismi molecolari che legano queste tre condizioni. La pro-proteina convertasi subtilisina/kexina di tipo 9 (PCSK9) è stata dosata in 1305 soggetti obesi della coorte SPHERE (Susceptibility to Particle Health Effects, miRNAs and Exosomes) e i suoi valori circolanti sono risultati positivamente associati ad uno stato depressivo (score BDI-II, Beck Depression Inventory). Inoltre l'11% della relazione tra depressione e insulino-resistenza, un ulteriore fattore di rischio cardiovascolare, era mediato da PCSK9. Per comprendere l'eventuale ruolo causale di PCSK9, la popolazione SPHERE è stata genotipizzata per la variante "loss-of-function" p.R46L, che coincide con un ridotto rischio cardiovascolare. In questi portatori, i livelli circolanti di PCSK9 non sono più risultati associati né al grado di depressione, né a una condizione di insulino-resistenza. Poiché i soggetti della coorte SPHERE erano obesi, sono stati valutati i possibili effetti di PCSK9 in un modello in vitro di adipociti umani, le cellule SW872. In tale modello, il silenziamento di PCSK9 ha aumentato il processo di differenziamento adipocitario valutato mediante l'espressione dei geni PPAR γ , C/EBP β e LPL. In seguito a stimolazione con insulina, nelle cellule silenziate si è osservata una riduzione dell'attivazione delle vie di segnalazione di AKT e ERK, suggerendo la presenza di una condizione di insulino-resistenza. L'analisi della funzionalità mitocondriale ha dimostrato come la mancanza di PCSK9 fosse associata ad una ridotta respirazione mitocondriale. In conclusione, PCSK9 sembra impattare su alcuni dei meccanismi biologici alla base dell'associazione tra depressione e insulino-resistenza, suggerendo un suo possibile ruolo nella modulazione dei fattori di rischio cardiovascolare in soggetti obesi caratterizzati da un fenotipo depressivo.

RUOLO DI PCSK9 NELLA MODULAZIONE METABOLICA A LIVELLO CARDIACO E NELLO SVILUPPO DI HFpEF

L. Da Dalt¹, L. Castiglioni², A. Baragetti^{1,7}, M. Audano¹, M. Svecla¹, F. Bonacina¹, S. Pedretti¹, P. Uboldi¹, P. Benzoni³, F. Giannetti³, A. Barbuti³, F. Pellegatta⁴, S. Indino⁵, E. Donetti⁵, L. Sironi^{2,6}, N. Mitro¹, A.L. Catapano^{1,7}, G.D. Norata^{1,4}

¹Department of Pharmacological and Biomolecular Sciences, Università degli Studi di Milano; ²Department of Pharmaceutical Sciences, Università degli Studi di Milano; ³Department of Biosciences, Università degli Studi di Milano;

⁴Centro SISA per lo Studio dell'Aterosclerosi, Ospedale Bassini, Cinisello Balsamo, Milano; ⁵Department of Biomedical Science for Health, Università degli Studi di Milano; ⁶IRCCS Centro Cardiologico Monzino, Milano; ⁷IRCCS Multimedica Hospital, Sesto San Giovanni, Milano

Introduzione: PCSK9 è una glicoproteina rilasciata in circolo principalmente dal fegato che interagendo con i recettori LDLR omologhi e no, compreso il CD36, ne regola la funzionalità, favorendone così la degradazione intracellulare. La mancanza di PCSK9 induce un incremento dell'uptake delle lipoproteine, promuovendo la rimozione di lipidi circolanti e il loro accumulo in differenti tessuti.

Scopo: Dato l'effetto che gli inibitori di PCSK9 mostrano sul metabolismo lipoproteico abbiamo voluto valutarne il conseguente impatto sul metabolismo e sulla funzionalità cardiaca.

Metodi e Risultati: Modelli murini WT, Pcsk9 KO, KO condizionali a livello epatico e Pcsk9/Ldlr doppi KO (DKO) sono stati nutriti per 20 settimane con una dieta SFD. È stata quindi valutata l'esercizio intollerance, la forza muscolare e le caratteristiche morfologiche del cuore. I Pcsk9 KO presentavano una ridotta endurance associata ad anomalie ecocardiografiche suggestive di una insufficienza cardiaca con frazione di eiezione preservata (HFpEF). La mancanza di PCSK9 ha quindi a un impatto sul metabolismo cardiaco che si rispecchia in un ridotto consumo di ossigeno a livello mitocondriale e alla conseguente riduzione dei livelli di ATP. Questa alterazione è stata associata a una maggiore espressione di LDLR e CD36 e quindi a un successivo accumulo di lipidi. Un fenotipo simile è stato osservato nei modelli Pcsk9/Ldlr DKO, escludendo così un contributo per LDLR sul danno cardiaco osservato nei topi Pcsk9 KO. Il profilo della funzionalità cardiaca nel modello PCSK9 KO selettivo del fegato ha ulteriormente escluso il coinvolgimento del PCSK9 circolante nello sviluppo dell'HFpEF, indicando un possibile ruolo per PCSK9 espresso localmente. In linea con quanto dimostrato, i portatori della variante R46L con perdita di funzione per PCSK9 presentano un aumento della massa ventricolare sinistra, ma una frazione di eiezione simile rispetto ai soggetti controllo.

Conclusioni: Possiamo affermare come la carenza di PCSK9, influenzando sul metabolismo lipidico cardiaco ed in modo indipendente dal recettore delle LDL, possa favorire lo sviluppo di HFpEF.

IL PROFILO DEGLI ESOSOMI PLASMATICI IN PAZIENTI STEMI SENZA E CON ARRESTO CARDIACO EXTRAOSPEDALIERO

M. Zarà¹, J. Campodonico¹, N. Cosentino¹, M. Biondi¹, P. Amadio¹, G. Milanese², E. Assanelli¹, S. Cerri³, M. Biggiogera², L. Sandrini¹, C.C. Tedesco¹, F. Veglia¹, D. Trabattoni¹, F. Blandini³, E. Tremoli¹, G. Marenzi¹, S.S. Barbieri¹

¹Centro Cardiologico Monzino IRCCS, Milano;

²University of Pavia, "L. Spallanzani", Pavia; ³Mondino Foundation IRCCS, Pavia

Nonostante gli enormi passi avanti fatti nel trattamento dell'infarto miocardico con soprallivellamento del tratto-ST (STEMI), l'identificazione di nuovi biomarcatori per una caratterizzazione più accurata dei pazienti STEMI è ancora necessaria e fonte di grande interesse. Gli esosomi, importanti mediatori della comunicazione intercellulare, rappresentano un potenziale strumento diagnostico nel contesto cardiovascolare. Tuttavia, le informazioni sulle loro caratteristiche e cargo proteico in relazione allo STEMI sono ancora scarse. Per investigare questi aspetti, sono stati reclutati 35 pazienti maschi ricoverati in Terapia Intensiva Cardiologica per primo STEMI e sottoposti ad angioplastica coronarica primaria (pPCI), di cui 18 senza altre complicanze cliniche importanti prima della presentazione in ospedale e 17 con arresto cardiaco extraospedaliero rianimato (OHCA-STEMI). Infine, 32 pazienti maschi con sindrome coronarica cronica (CCS) e con malattia aterosclerotica documentata all'angiografia coronarica sono stati inclusi nello studio come controlli. Il sangue venoso utilizzato per l'isolamento degli esosomi plasmatici è stato prelevato nei pazienti STEMI all'ingresso in ospedale e nei pazienti CCS prima dell'angiografia coronarica elettiva. Gli esosomi sono stati quindi caratterizzati tramite Nanoparticle tracking analysis e Western blotting.

Gli esosomi dei pazienti STEMI sono più numerosi, hanno dimensioni maggiori e una più abbondante espressione del marker piastrinici (GPIIb) ed endoteliali-vascolari (VE-caderina) rispetto a quelli dei CCS. Simile è invece la quantità di troponina cardiaca misurata negli esosomi plasmatici isolati dai due gruppi. Inoltre, gli esosomi dei pazienti STEMI presentano un differente cargo di proteine della fase acuta (ceruloplasmina, transtiretina e fibronectina) rispetto a quelli dei CCS. Infine, all'interno del gruppo STEMI emerge chiaramente come l'espressione di GPIIb e del marcatore cerebrale PLP1 sono in grado di discriminare accuratamente tra OHCA e STEMI non complicato.

In conclusione, per la prima volta, dimostriamo che il profilo dell'esosoma dei pazienti STEMI ha caratteristiche peculiari che lo differenziano da quello dei pazienti CCS e che probabilmente riflettono i meccanismi fisiopatologici coinvolti nello STEMI. Inoltre, l'espressione negli esosomi di marcatori specifici cerebrali e piastrinici potrebbe consentire l'identificazione di pazienti con sofferenza cerebrale nello STEMI. Studi futuri sull'associazione tra cargo proteico degli esosomi e la gravità del danno neurologico nello STEMI saranno importanti per definire il loro potenziale uso clinico.

ATEROSCLEROSI, PCSK9 E VESCICOLE EXTRACELLULARI

M.F. Greco¹, C. Macchi¹, L. Cantone², M. Hoxha², C. Banfi³, F. Zimetti⁴, M.P. Adorni⁴, I. Giusti⁵, V. Dolo⁵, A. Corsini¹, C.R. Sirtori¹, V. Bollati², N. Ferri⁶, 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; ³Centro Cardiologico Monzino, IRCCS, Milano;

⁴Dipartimento di Scienze degli Alimenti e del Farmaco, Università

degli Studi di Parma; ⁵Dipartimento di Medicina Clinica, Sanità

Pubblica, Scienze della Vita e dell'Ambiente, Università

degli Studi dell'Aquila; ⁶Dipartimento di Scienze Farmaceutiche

e Farmacologiche, Università degli Studi di Padova

Razionale: Le vescicole extracellulari (EVs), particelle costituite da un doppio strato fosfolipidico, trasportano proteine, lipidi e acidi nucleici. Le EVs sono mediatori della comunicazione intercellulare e sono coinvolte in processi patogenetici, tra i quali l'aterosclerosi. I livelli circolanti di EVs si associano 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).

Obiettivi: Valutare l'impatto delle EVs isolate da cellule muscolari lisce umane che sovra-esprimono e non PCSK9 (rispettivamente, hSMCPCSK9 e hSMC) sull'infiammazione, la capacità migratoria, l'uptake di colesterolo e l'attività mitocondriale in modelli cellulari di monociti e macrofagi.

Metodi:

- linee cellulari: hSMC, hSMCPCSK9, monociti umani (THP-1), macrofagi umani (THP-1 derivati);
- isolamento e caratterizzazione delle EVs (Nanoparticle Tracking Analysis, microscopia elettronica a trasmissione, analisi untargeted proteomica, citofluorimetria a flusso);
- espressione genica e proteica;
- migrazione cellulare;
- analisi della respirazione mitocondriale (Seahorse).

Risultati: Le cellule hSMC e hSMCPCSK9 rilasciano lo stesso numero di EVs con la stessa morfologia e dimensione. Entrambi i gruppi di EVs esprimono marcatori tipici di esosomi e microvescicole, quali le tetraspanine CD9 e CD63, Alix e integrina. L'analisi proteomica ha evidenziato come le EVs rilasciate da hSMCPCSK9 contengano maggiori livelli di PCSK9 rispetto al gruppo controllo. Nei monociti e nei macrofagi, il trattamento per 24 ore con le EVs isolate dalle cellule hSMCPCSK9 ha determinato un aumento nell'espressione genica della chemochina MCP-1 (circa 27 volte) e delle citochine interleuchina (IL)-1 α (circa 28 volte), IL-1 β (circa 25 volte), IL-6 (circa 94 volte) e IL-8 (circa 4 volte). In seguito al trattamento con le EVs isolate dalle cellule hSMCPCSK9 la fosforilazione della proteina STAT3 è aumentata e al contrario l'espressione della proteina SOCS3 è diminuita.

Le EVs isolate dalle cellule hSMCPCSK9 aumentano la capacità migratoria di monociti e macrofagi e ne determinano un maggiore uptake di LDL ossidate. Inoltre, monociti e macrofagi esposti a questo gruppo di EVs hanno una diminuzione nei valori basali e massimali di respirazione mitocondriale.

Conclusioni: I dati ottenuti evidenziano un effetto pro-aterogenico e pro-infiammatorio delle EVs arricchite in PCSK9.

VARIABILITÀ GIORNALIERA DELL'EFFETTO PRO-ANTI-INFIAMMATORIO DELLA DIETA E MARCATORI DELL'INFIAMMAZIONE SISTEMICA

E. Mattavelli^{1,2}, L. Redaelli², R. Domenighini², C. Tidone², L. Grigore^{2,3}, F. Pellegatta^{2,3}, P. Magni^{1,3}, A.L. Catapano^{1,3}, A. Baragetti^{1,3}

¹Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università di Milano; ²SISA Centro per lo Studio dell'Aterosclerosi, Ospedale Bassini, Cinisello Balsamo, Milano;

³IRCCS Ospedale Multimedica, Milano

Obiettivo: Malgrado le robuste evidenze sperimentali circa l'effetto pro/anti-infiammatorio di acidi grassi derivanti dalla dieta, gli studi epidemiologici non hanno fornito un'evidenza altrettanto univoca in merito ad una relazione significativa tra aumentata assunzione di alcuni grassi con la dieta e variazioni nei livelli di marcatori immuno-infiammatori.

In questi studi la valutazione dietetica si basa sull'utilizzo di questionari che non identificano quantitativamente il bilancio e la variabilità giornaliera nell'assunzione di nutrienti pro/anti-infiammatori.

Metodi: Sono stati raccolti dati clinici e le abitudini alimentari di 402 soggetti arruolati nello Studio PLIC. Il diario alimentare settimanale è stato utilizzato per calcolare il bilancio, per ognuno dei sette giorni, dell'effetto pro/anti-infiammatorio derivante dall'assunzione di nutrienti, ottenendo così un valore di Energy Adjusted-Dietary Inflammatory Index (day-EA-DII). La variabilità giornaliera è stata valutata derivando la Deviazione Standard del day-EA-DII (SD-EA-DII). Per tutti i soggetti era disponibile la quantificazione dei marcatori di infiammazione sistemica subclinica (Proteina C-Reattiva ad alta sensibilità, hsCRP) e della conta di cellule immunitarie circolanti (neutrofilii, linfociti, monociti e piastrine).

Risultati: Non abbiamo inizialmente osservato alcuna correlazione significativa tra il bilancio pro/anti-infiammatorio della dieta (day-EA-DII) e la sua variabilità giornaliera (SD-EA-DII), ($R=0.04$; $p=0.296$).

Successivamente, abbiamo suddiviso la popolazione in tre decili sia di day-EA-DII che di SD-EA-DII, per identificare se maggiori gradi dei due parametri fossero associati separatamente con aumentati livelli di marcatori di infiammazione sistemica subclinica e/o con le conte di cellule immunitarie.

All'aumentare dei terzili di day-EA-DII non abbiamo osservato un aumento statisticamente significativo nei livelli di neutrofilii (T1: 3.34 ± 0.12 ; T2: 3.46 ± 0.10 ; T3: 3.62 ± 0.10 ; $p=0.213$), di linfociti (T1: 2.12 ± 0.09 ; T2: 1.99 ± 0.08 ; T3: 1.95 ± 0.07 ; $p=0.318$) e di hsCRP (T1: 0.22 ± 0.03 ; T2: 0.18 ± 0.03 ; T3: 0.25 ± 0.03 ; $p=0.248$). Similmente, anche un aumento nella variabilità giornaliera del bilancio pro/anti-infiammatorio (aumentato SD-EA-DII) non si associava né ai livelli di hs-CRP né alle conte di cellule immunitarie circolanti.

Conclusioni: Questi dati preliminari suggeriscono che la variabilità giornaliera del bilancio pro/anti-infiammatorio della dieta fornisce un'informazione differente rispetto al calcolo di day-EA-DII, eseguito nella maggior parte degli studi.

Vi è la necessità di identificare approcci analitici alternativi per comprendere l'associazione di questi parametri con marcatori di infiammazione sistemica subclinica e/o conte di cellule circolanti (indici di attivazione infiammatoria acuta).

EFFECT OF LIPID-LOWERING THERAPIES ON C-REACTIVE PROTEIN LEVELS: A META-ANALYSIS OF RANDOMIZED CONTROLLED TRIALS

S. Xie¹, F. Galimberti^{1,2}, E. Olmastroni¹, M. Casula^{1,2}, A.L. Catapano^{1,2}

¹Epidemiology and Preventive Pharmacology Service (SEFAP), Department of Pharmacological and Biomolecular Sciences, University of Milan; ²IRCCS Multimedica, Sesto San Giovanni, Milano

Cardiovascular diseases are widely recognized as inflammatory-based diseases. Statin therapy has been reported to reduce plasma C-reactive protein (CRP) levels through an LDL-Cholesterol (LDL-C) independent mechanism, resulting in better clinical outcomes in patients with reduced CRP. This analysis aimed to directly assess the anti-inflammatory effect of lipid-lowering drugs (statins, ezetimibe, and PCSK9 inhibitors) on CRP levels, in parallel to lipid reduction.

We conducted a meta-analysis according to the PRISMA reporting guidelines. PubMed, Web of Science, EMBASE, Cochrane Library and ClinicalTrials.gov were searched since inception to June 2021. Inclusion criteria were:

- 1) randomized controlled trials (RCTs) in human, phase II, III or IV;
- 2) English language;
- 3) reporting the effects on lipid profile (LDL-C and triglycerides [TG]) and CRP;
- 4) with intervention duration more than 3 weeks;
- 5) and sample size (for each arm) over than 100 subjects.

Pooled estimates were assessed by random-effects model. Between-study heterogeneity was tested by Cochrane's Q test and measured with the I^2 statistics.

For statins, 11 RCTs were included in the meta-analysis, accounting for 45,234 participants (22,529 from intervention group and 22,705 from control group). A 23% (-23.24 [-28.34 to -18.13]) reduction of CRP concentration was observed for statin-treated group compared to placebo group. For lipid profile, there was a significant decrease of 36% for LDL-C levels and 16% for TG levels. For PCSK9 inhibitors, 5 RCTs were included with 47,709 participants (23,989 in the experimental group and 23,720 in the control group). A slight, but not significant, increase of CRP level (1.50 [-4.96 to 7.96]) was showed in the active group compared to control group. LDL-C and TG levels were significantly reduced by 58% and 16%, respectively. For ezetimibe, 8 RCTs were included in our analysis, totally 16,920 participants (8,419 in the treatment group and 8,501 in the control group). CRP, LDL-C and TG levels were significantly decreased by 9% (-8.80 [-14.87 to -2.73]), 16% and 8% in the ezetimibe-combined treatment group compared to single-drug treatment group.

In conclusion, we found that statin and ezetimibe administration help reducing serum CRP concentration. However, patients treated with PCSK9 inhibitors cannot get significant change in CRP levels.

IL RUOLO DELL'INFIAMMAZIONE NEL PROCESSO ATEROSCLEROTICO: STUDIO CLINICO NELL'AMBULATORIO DEL MEDICO DI MEDICINA GENERALE

F. Frè^{1,2}, M.M. Coronelli^{1,2}

¹Dipartimento di Medicina Interna e Terapia Medica, Università degli Studi di Pavia; ²Studio Medico Ticino di Bereguardo, Pavia

Background: L'aterosclerosi è una delle patologie più osservate nella popolazione generale. È di particolare interesse in quanto associata ad un aumentato rischio di morte per malattie cardiovascolari (ASCVD). Vengono comunemente utilizzati come markers diagnostici sul territorio colesterolo totale, HDL ed LDL, anche se al momento non è completamente noto l'anello patogenetico che collega ipercolesterolemia e formazione di placche aterosclerotiche. Il gold standard diagnostico prevederebbe l'uso di diagnostica con ecocolor Doppler dei tronchi sovra-aortici, raramente eseguibile da parte del MMG. Sarebbe utile, quindi, stratificare il rischio per i soggetti ipercolesterolemici di sviluppo di placche, definendo sistematicamente l'ampia "zona grigia" di pazienti con ASCVD subclinica.

Questo studio propone una strategia più efficace per lo screening dei diversi stadi dell'aterosclerosi attraverso l'analisi combinata di biomarcatori infiammatori e lipidici.

Metodi: In questo studio prospettico e monocentrico sono stati reclutati pazienti tra i 30 ed i 65 anni di età senza una storia clinica di malattia aterosclerotica cardiovascolare tra Dicembre 2020 e Maggio 2021. Per ogni paziente sono stati eseguiti gli esami del sangue di routine: sono stati valutati biomarcatori di infiammazione sistemica quali leucociti, acido urico, PCR, fibrinogeno e interleuchina-6, assieme agli indici AISI, SIRI, NLR, PLR e LMR; sono state eseguite misurazioni dell'Ankle Brachial Index (ABI) ed ecocolor Doppler dei tronchi sovraortici. È stato considerato un intervallo di confidenza del 95% e valori di $p \leq 0,05$ sono stati considerati statisticamente significativi.

Risultati e conclusioni: I dati mostrano i valori più alti di sensibilità e specificità per IL-6 (75% di sensibilità e 100% di specificità al cut-off di 2,39 pg/ml, valore $p \leq 0,05$), PCR (81% di sensibilità e 54% di specificità a 0,03 mg/dl cut-off, valore $p \leq 0,05$) e fibrinogeno (sensibilità del 75% e specificità del 69% a 317 mg/dl cut-off, valore $p \leq 0,05$) selezionando i pazienti con (>0% di ecografia (misurazioni dello spessore basate su ultrasuoni) o senza (0% delle misurazioni dello spessore basate sugli ultrasuoni) placche aterosclerotiche.

Placche aterosclerotiche sono state trovate anche in soggetti con valori di colesterolo normali o leggermente fuori range. Questi pazienti non catturerebbero l'attenzione del Medico di Medicina Generale, che non avrebbe gli strumenti necessari ad eseguire un'ecografia dei tronchi sovraortici e considererebbe le statine come la migliore via terapeutica per stabilizzare e innescare la regressione della placca aterosclerotica.

Ci sono ancora troppe incertezze sulla patogenesi dell'aterosclerosi e, nonostante la terapia a base di statine, il rischio di sviluppare placche aterosclerotiche è ancora piuttosto elevato. Placche apparentemente non allarmanti, di modesto spessore, possono ulcerarsi, soprattutto se di recente formazione, causando ASCVD.

IMPATTO DELL'USO DI STATINE SULL'INCIDENZA DI DEMENZA E ALZHEIMER: UNA REVISIONE SISTEMATICA E METANALISI DI STUDI OSSERVAZIONALI

G. Molari¹, E. Olmastroni², N. De Beni², O. Colpani², F. Galimberti², M. Gazzotti², A. Zamboni^{1,3}, A.L. Catapano^{1,2}, M. Casula^{1,2}

¹IRCCS Multimedica, Sesto San Giovanni, Milano; ²Department of Pharmacological and Biomolecular Sciences, Epidemiology and Preventive Pharmacology Service (SEFAP), University of Milan; ³Department of Medicine-DIMED, University of Padua

Introduzione: L'impatto delle statine sulla sfera cognitiva è ancora questione di dibattito. Abbiamo quindi deciso di effettuare una revisione sistematica e meta analisi di studi osservazionali, per indagare il ruolo delle statine nell'incidenza di demenza e malattia di Alzheimer.

Metodi: Sono stati ricercati studi su Pubmed, Cochrane ed EMBASE, pubblicati fino a gennaio 2021. Sono stati poi selezionati gli studi che presentassero i seguenti criteri di inclusione:

- 1) studi osservazionali (di coorte o caso-controllo);
- 2) su soggetti adulti;
- 3) in cui l'uso di statine fosse confrontato con il non utilizzo;
- 4) che riportassero come outcome una stima aggregata (odds ratio, risk ratio o hazard ratio) e intervallo di confidenza al 95%, dell'incidenza di demenza e/o Alzheimer.

I risultati degli studi sono stati aggregati utilizzando un modello a effetti casuali, e riportati come odds ratio (OR), con il rispettivo intervallo di confidenza al 95%.

Risultati: Sono stati selezionati 46 studi, di cui 38 di coorte e 8 caso-controllo. L'utilizzo di statine è risultato significativamente associato a una riduzione del rischio di incidenza di demenza (36 studi, OR 0,80 [IC 95% 0,75-0,86]) e Alzheimer (21 studi, OR 0,68 [0,56-0,81]). Questa riduzione del rischio ad opera delle statine è stata confermata anche dalle analisi stratificate in base al disegno di studio, al sesso dei partecipanti e alla solubilità delle statine. Infatti, è stata osservata una riduzione del rischio comparabile per le statine idrofile e lipofile, sia per la demenza (OR 0,83 [0,76-0,90] e OR 0,80 [0,71-0,89], rispettivamente) che per Alzheimer (OR 0,61 [0,46-0,81] e OR 0,59 [0,43-0,82], rispettivamente). Inoltre, una sotto-analisi sulla popolazione anziana, notoriamente più a rischio per le patologie considerate, ha confermato l'effetto osservato per la popolazione generale, con una riduzione del rischio per gli utilizzatori di statine pari al 18% per la demenza e del 27% per Alzheimer.

Conclusioni: Questi risultati suggeriscono che l'uso di statine potrebbe essere associato in maniera significativa a una diminuzione del rischio di sviluppare demenza e Alzheimer. Saranno necessari ulteriori studi appositamente disegnati per gli outcome di interesse per confermare i potenziali effetti delle statine sulla sfera cognitiva.

IMPATTO DELLA PANDEMIA DI COVID-19 SULLA GESTIONE DELLE TERAPIE CRONICHE CARDIOVASCOLARI IN LOMBARDIA

F. Galimberti^{1,2}, M. Casula^{1,2}, E. Olmastroni², A.L. Catapano^{1,2}, E. Tragni²

¹IRCCS Multimedica, Sesto S. Giovanni, Milano; ²Servizio di Epidemiologia e Farmacologia Preventiva (SEFAP), Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari (DiSFeB), Università degli Studi di Milano

Introduzione: La sindrome respiratoria acuta grave coronavirus 2 (SARS-CoV-2) e la conseguente pandemia di COVID-19 hanno posto grandi sfide ai sistemi sanitari e alle politiche di sanità pubblica, comportando in primo luogo un ridotto accesso alle cure non urgenti ed elettive. Obiettivo dello studio è stato indagare l'impatto della pandemia sulla gestione di terapie croniche cardiovascolari (ipolipemizzanti, antipertensivi, antidiabetici orali, anticoagulanti) utilizzando i database amministrativi di Regione Lombardia.

Metodi: Il periodo di studio tra gennaio e giugno 2020 è stato confrontato con il semestre di controllo gennaio-giugno 2019. Per tutti i pazienti adulti (≥ 40 anni) aventi almeno 1 prescrizione dei farmaci in studio, è stata valutata la variazione percentuale nel consumo di farmaci, nell'aderenza alla terapia (calcolata come % di soggetti con PDC=100%) e nel ricorso a prestazioni sanitarie (esami ematici, indagini diagnostiche, visite specialistiche).

Risultati: Nel periodo in studio sono stati arruolati un totale di 911.566 pazienti (età media: 70,9 anni; maschi: 52,2%) in terapia con ipolipemizzanti, 2.147.386 (età media: 70,1 anni; maschi: 47,7%) con antipertensivi, 392.678 (età media: 70,7 anni; maschi: 56,4%) con antidiabetici, e 621.976 (età media: 78,8 anni; maschi: 51,1%) con anticoagulanti, e confrontati, rispettivamente, con 879.881, 2.128.334, 381.752, e 601.204 controlli. In generale, nel periodo in studio si è registrato solo un lieve cambiamento nel numero di confezioni dispensate (ipolipemizzanti: +3,8%; antipertensivi: -1,8%; antidiabetici: -5,9%; anticoagulanti: -5,2%); tuttavia, in tutte le coorti, si è osservato un leggero aumento nei primi due bimestri, e una forte diminuzione nell'ultimo (ipolipemizzanti: -6,7%; antipertensivi: -11,4%; antidiabetici: -21,3%; anticoagulanti: -22,6%). Parallelamente, l'aderenza ai trattamenti ha subito un incremento nei mesi di marzo e aprile, e una riduzione nei due mesi successivi. Si è invece rilevato un drastico calo delle prestazioni sanitarie rispetto al periodo di controllo (ipolipemizzanti: -23,2%; antipertensivi: -29,6%; antidiabetici: -25,6%; anticoagulanti: -20,4%), con un picco negativo in corrispondenza del secondo bimestre (ipolipemizzanti: -65,2%; antipertensivi: -66,0%; antidiabetici: -63,5%; anticoagulanti: -53,9%).

Conclusioni: La pandemia di COVID-19 ha influito negativamente sul ricorso alle prestazioni sanitarie da parte di pazienti affetti da patologie croniche cardiovascolari. D'altra parte, la corsa alla scorta di farmaci a cavallo dell'inizio del lock-down ha fatto sì che più soggetti fossero coperti in maniera ottimale dal trattamento rispetto allo stesso periodo dell'anno precedente (effetto che, però, si perde nel tempo).

RUOLO DELLA LIPASI ACIDA LISOSOMIALE NELLA MATURAZIONE DELLE CELLULE DENDRITICHE

R. Bellini¹, F. Bonacina¹, A.L. Catapano^{1,2}, M. Gomaschi³, G.D. Norata^{1,4}

¹Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano; ²IRCCS MultiMedica, Sesto S. Giovanni, Milano; ³Centro Grossi Paoletti, Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano; ⁴Centro per lo Studio dell'Aterosclerosi, Ospedale E. Bassini, Cinisello Balsamo, Milano

Introduzione: La lipasi acida lisosomiale (LAL) è un enzima attivo a pH acido responsabile della degradazione dei trigliceridi e degli esteri del colesterolo in acidi grassi e colesterolo libero. È noto che sia la regolazione del metabolismo lipidico cellulare che le alterazioni a livello della LAL influenzino il fenotipo e la funzionalità cellulare di alcune popolazioni immunitarie, come linfociti e macrofagi. Scopo del progetto consiste nel determinare il ruolo della LAL durante il processo di differenziamento e maturazione delle cellule dendritiche (DCs), responsabili quest'ultime del cross-talk tra immunità innata e adattativa.

Metodi: Le cellule dendritiche sono state ottenute in vitro partendo da PBMCs di donatori sani o da monociti murini in seguito a stimolazione con fattori di crescita (GM-CSF e IL-4) per 6 giorni. Al termine di questi, è stata indotta la maturazione delle DCs in seguito a stimolazione con LPS O/N in presenza o meno dell'inibitore selettivo della LAL (Lalistat-2). Le analisi citofluorimetriche hanno consentito di studiare il fenotipo di queste cellule, parallelamente ad un monitoraggio dell'attività della LAL durante il differenziamento e la maturazione.

Risultati: Il differenziamento in cellule dendritiche sia umane che murine è accompagnato da un aumento dell'attività della LAL (+70%, $p < 0,01$), mentre il trattamento con LPS determina una diminuzione dell'attività della lipasi acida lisosomiale (-26%). L'aumento dell'espressione di CD80, un indice di maturazione delle DCs, in seguito a trattamento con LPS viene influenzato dall'inibizione della LAL (-58%, $p < 0,05$) sia nel modello murino che nell'uomo.

Conclusioni: La lipasi acida lisosomiale, enzima centrale nell'omeostasi lipidica intracellulare, potrebbe rappresentare un anello di congiunzione tra il metabolismo lipidico e la riprogrammazione funzionale durante il differenziamento e la successiva maturazione delle cellule dendritiche; tuttavia, i meccanismi molecolari responsabili di questo effetto sono ancora oggetto di studio.

MODULAZIONE DI EVENTI CELLULARI CON IMPATTO CARDIOMETABOLICO: STUDIO DEGLI EFFETTI DI UNA SERIE DI ESTRATTI DI PIANTE ORIGINARIE DEL CAMERUN IN CELLULE DI LIPOSARCOMA UMANO SW 872

A. Passarelli¹, A. Parfait Atchan Nwakiban², L. Da Dalt¹, T. Nur Demirci¹, S. Piazza¹, E. Sangiovanni¹, G. Martinelli¹, A. Deutou Tchamgoue³, G. Agbor Agbor³, J.-R. Kuitat², G.D. Norata¹, M. Dell'Agli¹, M. Daglia⁴, P. Magni^{1,5}

¹Department of Pharmacological and Biomolecular Sciences, Università degli Studi di Milano; ²Centre for Research on Medicinal Plants and Traditional Medicine, Institute of Medical Research and Medicinal Plants Studies, Yaoundé-Cameroon;

³Institute of Medical Research and Medicinal Plants Studies (IMPM), Yaoundé, Cameroon; ⁴Department of Pharmacy, Nutraceutical Lab, University of Naples Federico II, Naples; ⁵International Research Center for Food Nutrition and Safety, Jiangsu University, Zhenjiang, China; ⁵IRCCS Multimedia, Sesto San Giovanni, Milano

Il tessuto adiposo viscerale ectopico e disfunzionale svolge un ruolo centrale nella fisiopatologia dell'obesità, della sindrome metabolica e delle malattie cardiovascolari. In questo contesto, vari estratti vegetali, anche derivati dalla medicina tradizionale africana, possono fornire un'utile opportunità di trattamento. Le loro specifiche attività vanno però ben definite a livello molecolare e cellulare. A tal fine, abbiamo valutato la modulazione di alcuni eventi cellulari di rilevanza cardiometabolica da parte di 11 estratti di piante medicinali del Camerun, usando, come modello, cellule di liposarcoma umano SW872, differenziate ad adipociti maturi con acido oleico (OA) 100 µM per 7 giorni. La tossicità degli estratti idroetanolicci su queste cellule è stata valutata con saggio MTS; la concentrazione di trigliceridi è stata valutata mediante kit colorimetrico; l'uptake di glucosio fluorescente 2NBDG è stato quantificato mediante analisi FACS; la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) è stata valutata con la sonda fluorescente CM-H2DCFDA; interleuchina-6 e -8 (IL-6, IL-8) sono state misurate mediante ELISA.

Tutti gli estratti vegetali hanno ridotto (-12-19%; p<0,05) l'accumulo di trigliceridi in cellule SW872. In modo più specifico, Tetrupleura tetraptera, Aframomum melegueta e Zanthoxylum leprieurii hanno significativamente (p<0,05) aumentato l'uptake di glucosio da parte di queste cellule. Tetrupleura tetraptera, Echinops giganteus, Dichrostachys glomerata e Aframomum melegueta hanno ridotto la secrezione di IL-6, mentre Xylopiya parviflora, Monodora myristica, Zanthoxylum leprieurii, Xylopiya aethiopica hanno ridotto la secrezione di IL-8, evidenziando interessanti proprietà antinfiammatorie. Da notare, invece, che Dichrostachys glomerata e Aframomum citratum hanno aumentato il rilascio di IL-8. Inoltre, Xylopiya parviflora, Echinops giganteus e Dichrostachys glomerata hanno notevolmente ridotto la produzione di ROS nelle cellule SW872 dopo trattamento con H₂O₂, a seguito di un'attività di scavenging di ROS concentrazione-dipendente.

I risultati ottenuti suggeriscono che questi estratti di piante del Camerun posseggono interessanti proprietà, potenzialmente rilevanti in campo cardiometabolico. Sarà necessaria un'ulteriore attività di ricerca per chiarirne meglio le attività biologiche e il potenziale uso clinico, come prodotti nutraceutici.

STUDIO IN VITRO DEI MECCANISMI ALLA BASE DEGLI EFFETTI SULL'OMEOSTASI DEL COLESTEROLO DA PARTE DI UNA MISCELA DI LACTOBACILLUS PLANTARUM DA SOLA O IN COMBINAZIONE CON BERBERINA E RISO ROSSO FERMENTATO

F. Bordonaro¹, S. Mazza¹, A. Granata¹, E. Frisa¹, F. Di Vincenzo², P. Sperandeo², A. Polissi², A. Corsini^{1,3}, L. Arnaboldi¹

¹Laboratorio di Farmacologia Cellulare dell'Aterosclerosi;

²Laboratorio di Microbiologia Molecolare, Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari DISFeB, Università degli Studi di Milano; ³IRCCS Multimedia, Milano

Per la riduzione della colesterolemia in soggetti con dislipidemia lieve-moderata a basso rischio cardiovascolare e in pazienti intolleranti alle statine, accanto a nutraceutici ampiamente utilizzati (berberina, estratti di carciofo, bergamotto, fitosteroli), recentemente annoveriamo probiotici, quali alcuni ceppi di Lactobacilli (LB), tra cui il Lactobacillus plantarum, microorganismo del microbiota intestinale umano. Anche il riso rosso fermentato è efficace, ma non somministrabile agli intolleranti alle statine, in quanto il suo stesso principio attivo (monacolina K) è una statina.

Scopo del presente lavoro è stato dimostrare i meccanismi, ancora non del tutto compresi, alla base dei benefici clinici sull'omeostasi del colesterolo da parte di questi probiotici. Per gli esperimenti abbiamo utilizzato una miscela di tre ceppi di L. Plantarum, da sola od associata a berberina e riso rosso fermentato.

La miscela si è rivelata efficace almeno su tre parametri studiati:

a) Rimozione del colesterolo dal medium di coltura.

LB in crescita od inattivati con calore rimuovono dal medium di coltura fino al 50-60% del colesterolo somministrato diluito in etanolo (concentrazione nel medium 20-200ug/ml) dopo 20 ore di incubazione (esperimenti condotti con tecniche gascromatografiche). Tale effetto, non saturabile nelle nostre condizioni sperimentali, si verifica anche con altri fitosteroli, quali betasitosterolo e stigmasterolo.

b) Attività della Idrolasi degli Acidi Biliari (BSH).

La BSH dei LB, idrolizzando gli acidi biliari intestinali, previene il riassorbimento di colesterolo libero, contribuendo quindi a diminuirne le concentrazioni plasmatiche. L'attività di BSH è presente solo nei LB vivi, come dimostrato mediante analisi cromatografica (semiquantitativa) e colorimetrica (quantitativa) dopo incubazione con acidi taurocolico e glicocolico (0,3% nel medium di coltura).

c) Riduzione della biosintesi di colesterolo.

LB vivi riducono l'incorporazione di acetato marcato (15-20%) nel colesterolo neosintetizzato da cellule di epatoma umano HuH-7, quando somministrati nel medium di coltura per 20 ore. L'associazione con berberina (15 ug/ml) e riso rosso fermentato (0,1-1 uM in monacolina K, dopo titolazione con HPLC) sortisce una riduzione additiva (-30/70%).

Riassumendo, questi effetti in vitro sostengono l'efficacia clinica dei ceppi di LB, suggerendone anche l'associazione con altri nutraceutici nel caso di colesterolemia più elevata o in pazienti già in terapia ipolipidizzante ma che non raggiungono l'obiettivo ottimale.

Zc3H10 CONTROLLA IL RIMODELLAMENTO DELL'F-ACTINA E LA FUNZIONALITÀ MITOCONDRIALE NELLA FASE INIZIALE DELL'ADIPOGENESI

S. Ligorio¹, M. Audano¹, S. Pedretti¹, F. Gualdrini², S. Polletti², M. Russo², S. Ghisletti², M. Crestani¹, D. Caruso¹, E. De Fabiani¹, N. 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: Il progressivo incremento dell'obesità rappresenta uno dei maggiori fattori di rischio per patologie cardiovascolari e metaboliche. Uno dei processi chiave nell'adipogenesi è la riorganizzazione del citoscheletro attraverso il rimodellamento dell'actina filamentosa (F-actin). Recenti studi dimostrano la capacità dell'F-actina nel controllare fusione e fissione mitocondriale, il cui equilibrio regola la funzionalità del mitocondrio stesso.

Nel nostro laboratorio abbiamo isolato un nuovo regolatore mitocondriale, Zinc-finger-CCCH-typecontaining-10 (Zc3h10), e abbiamo valutato il suo ruolo nel metabolismo cellulare durante il processo adipogenico.

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

Risultati: I livelli proteici di Zc3h10 aumentano durante le prime fasi dell'adipogenesi. Il silenziamento di Zc3h10 nelle prime fasi dell'adipogenesi (pre-adipociti) compromette l'accumulo lipidico (colorazione Oil Red O, Ctrl: 265±0,02 vs ShZc3h10: 192±0,008, p<0,001). 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. Il silenziamento di Zc3h10 altera l'organizzazione dell'F-actina e dei mitocondri, risultando in una maggior interazione fra questi due diversi organelli (colocalizzazione: Ctrl 0,06±0,08 vs ShZc3h10 0,09±0,08, p<0,05). Questo causa un'aumentata fissione e ridotta fusione mitocondriale generando mitocondri disfunzionali. In linea con questi risultati, analisi funzionali evidenziano una ridotta respirazione disaccoppiata massima (nmolO₂: Ctrl 3,42±0,64 vs ShZc3h10 2,69±0,46, p<0,05) accompagnata da un diminuito stato energetico cellulare (ratio: Ctrl 1±0,14 vs ShZc3h10 0,83±0,13, p<0,05). Il silenziamento di Zc3h10 porta ad un riarrangiamento del metabolismo che favorisce la beta ossidazione degli acidi grassi invece che il loro accumulo. Nello specifico, abbiamo osservato un aumento dell'indice di beta ossidazione ottenuto dal rapporto tra acetilcarnitina (C2)/carnitina (C0) (ratio: Ctrl 1±0,17 vs ShZc3h10 1,4±0,18, p<0,01) e dell'attività della carnitina palmitoiltransferasi ottenuta dalla somma di palmitoil-carnitina e stearilcarnitina (C16+C18)/C0 (ratio: Ctrl 1±0,39 vs ShZc3h10 1,63±0,29, p<0,05). Coerentemente, abbiamo osservato un maggiore rilascio di glicerolo nel terreno (ratio: Ctrl 1±0,02 vs ShZc3h10 1,31±0,06, p<0,01), indice di un'aumentata lipolisi.

Conclusioni: Zc3h10 è un fattore di trascrizione richiesto nelle prime fasi dell'adipogenesi per controllare la struttura del citoscheletro che di conseguenza influenza la dinamica e il metabolismo mitocondriale per favorire l'accumulo lipidico.

IL METABOLISMO CELLULARE DEGLI ACIDI GRASSI REGOLA LA FUNZIONALITÀ DELLE CELLULE T REGOLATORIE: RUOLO DI SREBP1c

F. Bonacina¹, M. Audano¹, S. Pedretti¹, S. Stucchi¹, D. Caruso¹, A.L. Catapano^{1,2}, N. Mitro¹, G.D. Norata^{1,3}

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

²*IRCSS Multimedica, Milano;*
³*Centro SISA per lo Studio dell'Aterosclerosi, Ospedale Bassini, Cinisello Balsamo, Milano*

Introduzione: Le cellule T regolatorie svolgono un'azione immunosoppressiva nella risposta infiammatoria associata all'aterosclerosi; ciò giustifica la ricerca di strategie terapeutiche volte ad aumentare la loro efficacia in tali condizioni. Il nostro gruppo ha contribuito a dimostrare che il trattamento con cellule T regolatorie riduce l'infiammazione associata all'aterosclerosi in modelli LDLR KO, suggerendo la ricerca di strategie volte a migliorare la migrazione delle cellule T regolatorie nella placca. Poiché la funzionalità delle cellule T regolatorie dipende da un delicato equilibrio del metabolismo lipidico, scopo di questo progetto è studiare il ruolo di SREBP1c (Sterol element binding protein 1c) nella regolazione del metabolismo cellulare degli acidi grassi delle cellule T regolatorie.

Metodi: Le cellule T regolatorie isolate dai tessuti linfoidi di topi Srebp1c WT e KO o indotte in vitro (attivazione in presenza di IL-2 e TGFβ) sono state caratterizzate attraverso analisi di citofluorimetria, saggi funzionali e metabolici.

Risultati: I topi Srebp1c KO presentano una riduzione dei livelli di T regolatorie in circolo e nei tessuti linfoidi (-66%, p<0,01) associata ad una riduzione dell'espressione di tipici marcatori funzionali (FoxP3, Helios, PD-1, p<0,01). Funzionalmente, le cellule KO sono meno soppressive (saggio di soppressione della proliferazione, -21%, p<0,01) ma presentano una maggior capacità migratoria verso la chemochina infiammatoria CXCL10 (+40%, p<0,05) rispetto alle WT. Da un punto di vista metabolico, tramite saggi Seahorse non sono emerse differenze nella funzione mitocondriale (MitoStress test), mentre il test della glicolisi (Glycolysis stress test) ha mostrato uno shift verso la glicolisi anaerobica delle cellule Srebp1c KO rispetto alle WT, confermato anche dall'aumentata espressione di pS6 (+45%, p<0,01), una molecola downstream l'attivazione di mTORC1, regolatore centrale del metabolismo anabolico della cellula.

Conclusioni: I nostri dati suggeriscono che Srebp1c sia cruciale nella regolazione del metabolismo energetico cellulare e nel bilancio tra la funzione soppressiva e migratoria. Comprendere i meccanismi molecolari che determinano tale shift verso il metabolismo glicolitico potrà offrire nuove strategie per promuovere una più efficiente migrazione delle cellule T regolatorie nella placca aterosclerotica.

EFFETTO INDIVIDUALE E COMBINATO DELL'INDICE DI MASSA CORPOREA E DELLA PREDISPOSIZIONE POLIGENICA AD ELEVATI LIVELLI DI BMI SUL RISCHIO DI SVILUPPO DEL DIABETE DI TIPO 2

E. Olmastroni¹, B.A. Ference², Q. Guo², D.L. Bhatt³, N.J. Samani^{4,5}, K.K. Ray⁶, S.J. Nicholls⁷, T.B. Ference², F. Galimberti^{1,8}, G.D. Smith⁹, M.V. Holmes¹⁰, C. Baigent¹⁰, S.E. Nissen¹¹, C.T. Ruff¹², M.S. Sabatine¹², A.L. Catapano^{1,8}, N. Sattar¹³, J.E. Deanfield¹⁴

¹Department of Pharmacological and Biomolecular Sciences, Epidemiology and Preventive Pharmacology Service (SEFAP), University of Milan; ²Centre for Naturally Randomized Trials, University of Cambridge, UK; ³Brigham and Women's Hospital Heart and Vascular Center, Harvard Medical School, Boston, MA; ⁴Department of Cardiovascular Sciences, University of Leicester, UK; ⁵National Institute for Health Research Leicester Cardiovascular Biomedical Research Centre, Leicester, UK; ⁶Imperial Centre for Cardiovascular Disease Prevention, Department of Primary Care and Public Health, School of Public Health, Imperial College London, UK; ⁷Victorian Heart Institute, Monash University, Melbourne, Australia; ⁸Multimedica IRCCS, Milano; ⁹MRC Integrative Epidemiology Unit, University of Bristol, UK; ¹⁰MRC Population Health Research Unit and the Clinical Trial Service Unit and Epidemiological Studies Unit, Nuffield Department of Population Health, University of Oxford, UK; ¹¹Cleveland Clinic Coordinating Center for Clinical Research, Department of Cardiovascular Medicine, Cleveland Clinic, Cleveland, Ohio; ¹²Thrombolysis in Myocardial Infarction (TIMI) Study Group, Division of Cardiovascular Medicine, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston, USA; ¹³Institute of Cardiovascular and Medical Sciences, University of Glasgow, UK; ¹⁴Institute of Cardiovascular Science, University College London, UK

Introduzione: Non è noto se l'indice di massa corporea (BMI) e la predisposizione poligenica ad elevati livelli di BMI, considerati congiuntamente, possano stimare il rischio di sviluppare diabete di tipo 2 (T2D). Obiettivo dello studio è stato valutare gli effetti separati e combinati di BMI e predisposizione poligenica sul rischio di T2D, valutando se il BMI ha un effetto cumulativo sul rischio di diabete nel tempo.

Metodi: Gli effetti di BMI e di uno score poligenico (PGS) composto da 2.037.596 varianti sul rischio di T2D sono stati confrontati tra 445.765 partecipanti arruolati nell'UK Biobank. Il rischio cumulativo è stato stimato tramite le curve di Kaplan-Meier, utilizzando l'età come scala temporale. L'esposizione genetica ad elevati livelli di BMI è stata stimata utilizzando un PGS a 96 varianti.

Risultati: L'età media dei partecipanti all'arruolamento era 57,3 anni (54,3% donne), con 28.563 partecipanti diagnosticati con T2D dopo i 35 anni. Un aumento di una deviazione standard del BMI (4,77 unità, misurato al momento dell'arruolamento) e del PGS è stato associato rispettivamente ad un odds ratio (OR) per T2D di 2,26 (IC95% 2,23-2,28) e di 1,50 (IC95% 1,49-1,52). Il passaggio dal quintile più basso a quello più alto di entrambe le distribuzioni era associato a traiettorie di rischio sempre più ripide nel tempo. Nelle analisi stratificate, il rischio di diabete variava di almeno 10 volte all'interno di ciascun quintile di PGS a seconda delle differenze nel BMI. Al contrario, non sono state osservate variazioni significative del rischio all'interno dei quintili di BMI sulla base delle classi di PGS. L'esposizione genetica ad un aumento di una unità di BMI ha avuto sul rischio di T2D un effetto molto simile a quello di variazio-

ni della stessa entità di BMI che possono verificarsi in età avanzata (OR 1,21, 95%CI 1,21-1,22 vs OR 1,23, 95%CI 1,21-1,25).

Conclusioni: Il BMI è un fattore di rischio più impattante per T2D rispetto alla predisposizione poligenica, che comporta cambiamenti metabolici reversibili che non si accumulano nel tempo. Pertanto, la maggior parte dei casi di diabete può essere potenzialmente prevenuta se interventi mirati vengono messi in atto nelle prime fasi della malattia.

SOCIETÀ ITALIANA PER LO STUDIO DELLA ATEROSCLEROSI (SISA)

XXII Congresso della Sezione Siculo-Calabra

Lamezia Terme, 4 Novembre 2021

Nel corso del Congresso Regionale della Sezione Siculo-Calabra della Società Italiana per lo Studio dell'Aterosclerosi (S.I.S.A.), che si è svolto il 4 Novembre 2021 a Lamezia Terme (CZ), sono state affrontate diverse tematiche cardio-metaboliche, ponendo particolare attenzione al trattamento dei pazienti a rischio cardiovascolare elevato. Il primo "hot topic" affrontato è stato l'aggiornamento sull'approccio farmacologico nei pazienti ipertesi, in particolare il beneficio dell'approccio farmacologico combinato rispetto alla monoterapia. Il secondo tema discusso è il ruolo dei nuovi biomarcatori circolanti di danno aterosclerotico, quali nuovi possibili target terapeutici.

E' stato inoltre affrontato l'aggiornamento farmacologico in campo diabetologico e, tra gli argomenti trattati, è stata posta particolare attenzione sul ruolo del doppio agonismo GLP1 e GIP.

In risalto anche il tema dell'approccio nutrizionale nel paziente dismetabolico, e gli effetti della dieta mediterranea e degli alimenti funzionali per ridurre il rischio cardiovascolare. Tematica centrale del congresso è stata l'approccio farmacologico ipolipemizzante con particolare risalto alle difficoltà di raggiungimento dei target terapeutici, soprattutto nei pazienti intolleranti a terapia statinica o che vanno incontro a miopatia da statina, come anche il ruolo chiave della terapia ipolipemizzante intensiva nei pazienti affetti da ipercolesterolemia familiare e l'importanza dell'utilizzo degli inibitori di PCSK9 nelle fasi precoci dell'evento cardiovascolare.

Il Congresso ha dato largo spazio ai giovani ricercatori della sezione Siculo-Calabra, che hanno rappresentato il "cuore pulsante" del congresso. In momenti distinti della giornata, i giovani ricercatori hanno presentato i risultati scientifici del loro lavoro più recente, facendo emergere, nel corso della discussione, spunti di riflessione e stimoli di approfondimento per nuovi filoni di ricerca.

COMUNICAZIONI ORALI

GESTIONE DI UN PAZIENTE CON DIAGNOSI TARDIVA DI IPERCOLESTEROLEMIA FAMILIARE OMOZIGOTE

A. Giammanco¹, R. Scicali², C. Scrimali¹, A. Di Pino², F. Brucato¹, R. Spina¹, S. Piro², D. Noto¹, A.B. Cefalù¹, F. Purrello², M.R. Averna¹

¹Dipartimento di Promozione della Salute, Materno-Infantile, di Medicina Interna e Specialistica di Eccellenza "G. D'Alessandro" (PROMISE), Università degli Studi di Palermo; ²Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Università degli Studi di Catania

Background: L'ipercolesterolemia familiare omozigote (HoFH) è una malattia genetica rara e pericolosa per la vita caratterizzata da livelli estremamente elevati di colesterolo LDL-C e malattia cardiovascolare aterosclerotica grave e accelerata (ASCVD). In questo studio descriviamo la gestione clinica e la caratterizzazione molecolare di un soggetto con grave ipercolesterolemia.

Metodi: Il probando è un uomo di 50 anni con una storia familiare di malattie cardiovascolari precoci e ipercolesterolemia (entrambi i genitori e i suoi due figli). L'ipercolesterolemia grave (LDL-C 450 mg/dL) è stata documentata per la prima volta all'età di 32 anni ed è stato iniziato il trattamento con statine. All'età di 47 anni, durante un esame cardiologico di routine, un'angiografia coronarica ha rivelato una malattia coronarica stenotica diffusa ed è stato sottoposto a procedura di Bypass aorto-coronarico. I livelli di LDL-C erano 230 mg/dl durante il trattamento con statine ad alta intensità alla dose massima tollerata in combinazione con ezetimibe. L'analisi genetica dei geni candidati FH è stata effettuata tramite Next Generation Sequencing (NGS). Ulteriori opzioni terapeutiche ipolipemizzanti sono state prese in considerazione per la gestione di questo paziente.

Risultati: L'analisi genetica ha rivelato che il paziente era eterozigote composto di due mutazioni patogene del gene LDLR già note e classificate come difettive (c.1118G>A - p.Gly373Asp - e c.1195G>A - p.Ala399Thr). È stato eseguito uno screening a cascata e quattro membri della famiglia sono risultati portatori in eterozigosi. Prima che i dati genetici fossero disponibili, il paziente è stato trattato con alirocumab 150 mg a settimane alterne in aggiunta alla terapia ipolipemizzante standard. Una volta effettuata la diagnosi genetica di HoFH, alirocumab è stato sostituito con evolocumab 420 mg una volta al mese. Nonostante un'efficace riduzione dei livelli di LDL-C, l'obiettivo lipidico non è stato raggiunto e quindi abbiamo deciso di potenziare il trattamento ipolipemizzante aggiungendo una bassa dose di lomitapide (10 mg/die) che è stata ben tollerata e molto efficace (LDL-C 42 mg/dL).

Conclusioni: In un paziente HoFH portatore di mutazioni difettive a carico del gene LDLR la combinazione di evolocumab con lomitapide a basso dosaggio è stata un'opzione terapeutica aggiuntiva efficace e ben tollerata.

IDENTIFICAZIONE MEDIANTE NEXT GENERATION SEQUENCING DI UNA NUOVA MUTAZIONE NONSENSENTO NEL GENE CREB3L3 IN UN PAZIENTE CON IPERTRIGLICERIDEMIA SEVERA

F. Brucato¹, R. Scicali², C. Scrimali¹, M. Gueli Alletti¹, R. Spina¹, V. Ingrassia¹, G.I. Altieri¹, D. Noto¹, G. Misiano¹, A. Giammanco¹, C.M. Barbagallo¹, A. Ganci¹, A.B. Cefalù¹, F. Purrello², M.R. Averna¹

¹Dipartimento di Promozione della Salute, Materno-Infantile, di Medicina Interna e Specialistica di Eccellenza "G. D'Alessandro" (PROMISE), Università degli Studi di Palermo; ²Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Università degli Studi di Catania

Introduzione: L'ipertrigliceridemia (HTG) è una forma comune di dislipidemia associata ad un aumentato rischio di malattie cardiovascolari e pancreatite. Le forme severe sono caratterizzate da livelli plasmatici di trigliceridi (TG) molto elevati (> 1000 mg/dL -11,2 mmol/l). Nelle forme monogeniche autosomiche recessive i soggetti, omozigoti o eterozigoti composti, presentano mutazioni con perdita di funzione nei geni coinvolti nella lipolisi intravascolare delle lipoproteine ricche in trigliceridi. I principali geni coinvolti sono: LPL (lipoprotein lipase), APOC2 (apolipoprotein C2), APOA5 (apolipoprotein A5), GPIHBP1 (glycophosphatidylinositol (GPI)-anchored high-density lipoprotein-binding protein 1), LMF1 (lipase maturation factor 1) e GPD1 (glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1). Le mutazioni in CREB3L3 (CRE-binding protein 3-like 3) e in GCKR (glucokinase regulator) sono coinvolte nell'ipertrigliceridemia autosomica dominante.

Materiali e Metodi: Abbiamo analizzato mediante Next Generation Sequencing (NGS) le regioni codificanti e le regioni di splicing introne/esone dei geni che influenzano le principali vie di sintesi e metabolismo dei trigliceridi in pazienti affetti da ipertrigliceridemia severa.

Risultati e Conclusione: Nella maggior parte dei soggetti non sono state identificate mutazioni patogenetiche nei geni LPL, APOC2, APOA5, GPIHBP1 e LMF1. Due pazienti sono risultati portatori di mutazioni nel gene CREB3L3. Una donna di 54 anni con livelli di TG molto elevati (fino a 1900 mg/dL) è risultata portatrice in eterozigosi di una nuova mutazione nonsenso (c.610C>T p.Arg204Ter) mentre una donna di 51 anni con livelli di TG fino a 1000 mg/dL è risultata eterozigote per una mutazione patogenetica già nota (c.718G>A p.Glu240Lys). La variante p.Arg204Ter determina la formazione di un codone di stop prematuro e la sintesi di una proteina troncata con possibile perdita di funzione. La metodica NGS è un potente strumento per la diagnosi genetica di HTG e le mutazioni del gene CREB3L3 possono essere associate a forme severe di ipertrigliceridemia.

CARATTERIZZAZIONE GENETICO-MOLECOLARE MEDIANTE NEXT GENERATION SEQUENCING DI UN CASO INSOLITO DI MALATTIA DA ACCUMULO DEGLI ESTERI DEL COLESTEROLO (CESD)

C. Scrimali¹, F. Brucato¹, M. Caserta², M. Gueli Alletti¹, C. Castana², R. Spina¹, V. Ingrassia¹, G.I. Altieri¹, F. Fayer¹, D. Noto¹, G. Misiano¹, A. Giammanco¹, C.M. Barbagallo¹, A. Ganci¹, M. Piccione³, A.B. Cefalù¹, M.R. Averna¹

¹Dipartimento di Promozione della Salute, Materno-Infantile, di Medicina Interna e Specialistica di Eccellenza "G. D'Alessandro" (PROMISE), Università degli Studi di Palermo; ²Clinica Pediatrica, ARNAS Civico Di Cristina Benfratelli, Palermo; ³Centro di Riferimento Malattie genetiche rare, cromosomiche e della sindrome di Down, Università degli Studi di Palermo, Azienda Ospedaliera Ospedali Riuniti "Villa Sofia-Cervello", Palermo

Introduzione: Il gene LIPA, localizzato sul cromosoma 10, codifica per la lipasi acida lisosomiale (LAL), un enzima che idrolizza gli esteri del colesterolo (CE) e i trigliceridi (TG). La malattia da accumulo degli esteri del colesterolo (CESD) è una patologia rara, a trasmissione autosomica recessiva, causata da mutazioni nel gene LIPA che comportano un'attività residua dell'enzima LAL. Il deficit completo di LAL è associato a una forma più grave della malattia nota come malattia di Wolman. L'iperlipidemia e la steatosi epatica sono caratteristiche cliniche comuni della CESD.

Materiali e metodi: Il probando è un bambino di 2 anni caratterizzato da microcefalia, alti livelli di colesterolo totale (243 mg/dL) e di trigliceridi (272 mg/dL). Abbiamo eseguito un'analisi Next generation sequencing mediante Ion GeneStudio S5 Plus, utilizzando un pannello custom di 50 geni correlati al metabolismo di LDL, HDL e trigliceridi.

Risultati e conclusioni: Nessuna mutazione patogenetica è stata identificata nei principali geni candidati per l'ipercolesterolemia familiare e l'ipertrigliceridemia. Tuttavia, il probando è risultato portatore di due mutazioni nel gene LIPA (c.883C>T -p.His295Tyr- e c.929G>A -p.Trp310Ter). Successivamente è stata valutata l'attività dell'enzima LAL mediante DBS (Dried Blood Spot) che è risultata < 5%. La variante His295Tyr è una mutazione missenso già nota e associata a CESD, mentre la variante Trp310Ter è stata precedentemente identificata in omozigosi in due neonati di origine siciliana con malattia di Wolman. Lo screening familiare a cascata ha rilevato la presenza della mutazione His295Tyr nel padre e della mutazione Trp310Ter nella madre. Questa analisi ci ha permesso di identificare un soggetto eterozigote composto per due mutazioni nel gene LIPA con caratteristiche cliniche non comuni.

METABOLISMO POSTPRANDIALE DELLE LIPOPROTEINE IN PAZIENTI CON CHILOMICRONEMIA FAMILIARE IN TRATTAMENTO CON LOMITAPIDE E TIPARVOVEC

M. Gueli Alletti¹, P. Bigolin², F. Brucato¹, C. Scrimali¹, R. Spina¹, V. Ingrassia¹, G.I. Altieri¹, F. Fayer¹, D. Noto¹, G. Misiano¹, A. Giammanco¹, C.M. Barbagallo¹, A. Ganci¹, A.B. Cefalù¹, A. Zambon², M.R. Averna¹

¹Dipartimento di Promozione della Salute, Materno-Infantile, di Medicina Interna e Specialistica di Eccellenza "G. D'Alessandro" ProMISE Università degli Studi di Palermo; ²Dipartimento di Medicina – DIMED Università degli studi di Padova

Introduzione: La sindrome da chilomicronemia familiare (FCS) è una malattia monogenica rara a trasmissione recessiva caratterizzata da livelli di trigliceridi (TG)>10 mmol/L. Sebbene la FCS sia causalmente associata a mutazioni in uno dei principali geni candidati (LPL, LMF1, GPIHBP1, ApoAV e ApoCII), la maggior parte dei pazienti con FCS presenta mutazioni nel gene della lipoproteina lipasi (LPL). Difetti nell'enzima LPL comportano una riduzione della clearance dei chilomicroni (CM) dal plasma e lo sviluppo di pancreatite acuta.

Il trattamento dei pazienti con FCS è difficile: l'azione combinata di una dieta a ridotto contenuto di lipidi e carboidrati in aggiunta alle terapie ipolipemizzanti disponibili (fibrati, statine e acidi grassi omega-3) spesso non permette di raggiungere i livelli di TG desiderati.

Recentemente sono stati sviluppati diversi farmaci innovativi: tiparvovec (terapia genica), lomitapide (inibitore MTP), volanesorsen (oligonucleotide antisense che inibisce la formazione di apoC-III) e anticorpi monoclonali (anti-ApoCIII e anti-ANGPTL3).

Materiali e Metodi: Sono stati arruolati cinque pazienti portatori di mutazioni causali di FCS nei principali geni candidati. Ad ogni paziente è stato somministrato un carico orale di grasso modificato per evitare il rischio di pancreatite indotta dall'iperchilomicronemia postprandiale ma comunque sufficiente per valutare la cinetica e la composizione dei CM postprandiali. Il pasto è stato integrato con retinolo palmitato (RP) come biomarcatore dei CM.

Per valutare l'andamento dei livelli di TG post-prandiali sono stati eseguiti dieci prelievi di sangue venoso: nove sono stati effettuati serialmente ogni ora mentre un singolo prelievo è stato eseguito 24h dopo rispetto al primo.

Abbiamo confrontato i livelli di TG e RP dopo la somministrazione del carico orale di grasso prima e dopo il trattamento con lomitapide o con tiparvovec.

Risultati e conclusioni: Presentiamo i dati preliminari di quattro pazienti trattati con la lomitapide per ventisei settimane e l'unico paziente che ha ricevuto il tiparvovec in Italia. Le aree sotto la curva dei pazienti in terapia con la lomitapide hanno subito una riduzione approssimativamente dell'87% per i TG e del 27% per le non-HDL-C. Non è stato osservato alcun miglioramento nel paziente trattato con il tiparvovec. La lomitapide è stata efficace nel migliorare il metabolismo postprandiale delle lipoproteine nei soggetti con FCS mentre non è stato riscontrato alcun beneficio nel trattamento con tiparvovec.

PREVALENZA DELL'IPERCOLESTEROLEMIA FAMILIARE POLIGENICA TRA I PAZIENTI AD ALTO RISCHIO AFFERENTI AD UN AMBULATORIO DI TERZO LIVELLO

A. Messineo, A. Sangiorgio, M. Scuruchi, M. Cinquegrani, S. Verachtert, A. Toscano, G. Squadrito, G. Mandraffino
Internal Medicine Unit; Department of Clinical and Experimental Medicine, University of Messina

Le cause genetiche di ipercolesterolemia sono molto comuni, tanto che fino al 50% delle condizioni caratterizzate da alti livelli di LDL ematici (LDL-C >160 mg/dl) potrebbero essere geneticamente determinate. Le forme più studiate e geneticamente meglio caratterizzate sono rappresentate dalle ipercolesterolemie familiari monogeniche (FH), mentre cause meno comuni comprendono ARH (ipercolesterolemia familiare autosomica recessiva), la Sitosterolemia, la malattia da accumulo di esteri del colesterolo (LALD), la disbetalipoproteinemia familiare e il deficit della lipasi epatica.

L'ipercolesterolemia Familiare (FH) è considerata una condizione strettamente associata ad un alto rischio di incorrere in eventi cardiovascolari correlati all'aterosclerosi. Più recentemente, alla FH causata da mutazioni di un singolo gene (monogenica) è stata affiancata una seconda forma di ipercolesterolemia a carattere familiare, attribuita al riassortimento di polimorfismi genetici e fattori ambientali, definita come ipercolesterolemia familiare poligenica. L'FH monogenica può essere identificata in eterozigosi od in omozigosi. La forma in eterozigosi è nettamente più comune e riguarda circa 1 caso su 250 nella popolazione generale, la forma in omozigosi invece coinvolge 1 caso su 160000-300000. Le mutazioni in questione riguardano: il gene che codifica per il recettore delle LDL (implicato nell'internalizzazione delle LDL in circolo), una loss of function del gene per l'Apo-B100 (condizione che determina un maggiore contenuto di colesterolo dentro la cellula e quindi una minore efficienza del LDLr) ed una gain of function del recettore di PCSK9 (enzima che facilita il turn over del recettore LDL).

Recentemente sono stati scoperti altri due geni considerati associati alla patologia: STAP1 e APOE. Per la diagnosi di FH le linee guida ESC prevedono l'utilizzo del Dutch Lipid Clinic Network score che fornisce un punteggio complessivo basandosi sia sulla storia familiare (patologie cardiovascolari precoci o segni di dislipidemia quali arco corneale, xantomi tendinei), sia sulla storia clinica del paziente (cardiopatie ischemiche o ischemie cardiovascolari in altre sedi, xantomi tendinei o arco corneale, valutazione biochimica dei valori di colesterolo LDL). L'età di insorgenza dei sintomi è strettamente correlata all'attività dell'LDLr. Di fatto nei soggetti aventi la mutazione in omozigosi la bassa attività recettoriale determina un esordio clinico di malattia già nella prima decade di vita. Nella forma in eterozigosi data una maggiore funzionalità di LDLr l'esordio clinico e la diagnosi avvengono in età adulta a meno che i pazienti non vengano sottoposti ad esami di screening in età giovanile.

A differenza della FH monogenica, la forma poligenica dovuta alla presenza di polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs) può essere ipotizzata in base ad uno score che ne predica la probabilità (LDLC score), che associa valori elevati di LDL con alcune mutazioni SNPs. La diagnosi viene posta in caso di valori di score superiori a 0.73 in assenza di mutazioni monogeniche. Nel nostro studio abbiamo valutato la frequenza dell'ipercolesterolemia Familiare Poligenica in un campione di soggetti Siciliani con diagnosi clinica di FH. I dati presentati derivano dal progetto LIPIGEN, finalizzato alla creazione di un registro Nazionale delle Dislipidemie Familiari.

Risultati: Da dicembre 2020, abbiamo revisionato tutti i record dell'Ambulatorio per la Diagnosi e la Cura delle Dislipidemie della AOU G. Martino di Messina, individuando 134 soggetti sottoposti a sequenziamento per i geni ritenuti causali per ipercolesterolemia familiare [LDLR gene, PCSK9 gene (12 exons), LDLRAP1 gene (9 exons), APOB gene (exon 26 and 29), APOE gene (region of exon 4), STAP1 gene (9 exons)].

Lo score medio DLCN è stato 6.1±3.4; i valori medi di LDL-C sono stati 203.1±79.2 mg/dl. Come atteso, abbiamo trovato una correlazione significativa tra DLCN score e livelli di LDL-C ($r = 0.536$, $p < 0.001$).

Di 83 pazienti abbiamo ricevuto il report definitivo (41 Progenika, 42 LipidInCode), che identifica 59 mutazioni da 41 pazienti (49.4% del campione), mentre 43 pazienti NON presentano mutazioni nelle sequenze prese in esame per forma monogenica;

Dei pazienti portatori di mutazione, 37/41 presentano almeno una mutazione per LDLR. I rimanenti 4 pazienti sono risultati positivi rispettivamente:

- 1 paziente è risultato portatore di una mutazione su PCSK9
- 1 paziente è risultato portatore di una mutazione su LDLRAP1
- 1 paziente è risultato portatore di una mutazione su ApoE
- 1 paziente è risultato portatore di una mutazione su STAP1
- 1 paziente è risultata portatrice di **quattro mutazioni**: una mutazione sul gene che codifica per LDLR in omozigosi, portatrice di due diverse mutazioni su LDLRAP1 (in doppia eterozigosi).
- 3 pazienti sono risultati portatori di tre diverse mutazioni: doppia eterozigosi per una mutazione sul gene che codifica per LDLR associata ad una mutazione a carico di ApoB;
- 1 paziente è risultato portatore di tre diverse mutazioni: doppia eterozigosi per una mutazione sul gene che codifica per PCSK9 associata ad una mutazione a carico di LDLR;
- 4 pazienti sono risultati doppi eterozigoti per una mutazione sul gene che codifica per LDLR;
- 3 pazienti sono risultati doppi eterozigoti compound per mutazioni sul gene che codifica per LDLR e per ApoB;
- 2 pazienti sono risultati doppi eterozigoti compound per mutazioni sul gene che codifica per LDLR e per PCSK9;

I restanti 51 campioni sono attualmente in attesa di sequenziamento/conferma.

In relazione alle mutazioni identificate:

Sul gene che codifica per LDL-R sono state individuate complessivamente 16 diverse mutazioni, ripetute per un totale di 43 volte:

LDL-receptor gene			
		Frequency	Percent
Valid	c.1474G>A p.Asp492Asn	6	14,0
	c.1109A>C p.Asn370Thr	5	11,6
	c.761A>C p.Gln254Pro	5	11,6
	c.1246C>T p.Arg416Trp	4	9,3
	c.185C>T p.Thr62Met	3	7,0
	<i>INCONCLUSIVE</i>		
	c.1860G>A p.Trp620*	3	7,0
	c.418G>T p.Glu140*	3	7,0
	c.58G>A p.Gly20Arg	3	7,0
	c.1301C>G p.Thr434Arg	2	4,7
	c.2140+1G>T	2	4,7
	c.2282C>T p.Thr761Met	2	4,7
	<i>INCONCLUSIVE</i>		
	c.*198C>A	1	2,3
	c.1207_1209del p.Phe403del	1	2,3
	c.1691A>G Asn564Ser	1	2,3
c.2389G>A p.Val797Met	1	2,3	
c.940+16G>A <i>INCONCLUSIVE</i>	1	2,3	
Total		43	100,0

Abbiamo individuato 4 diverse mutazioni sul gene che codifica per APOB, ripetute complessivamente 6 volte

APOB	
	Frequency
c.2728G>T p.Gly910Cys	2
c.7285T>A p.Ser2429Thr	2
c.-318G>A	1
c.4299G>A p.Ser1433=	1
Total	6

Abbiamo individuato 4 diverse mutazioni sul gene che codifica per PCSK9, ripetute complessivamente 5 volte (delle quali 2 nello stesso paziente).

PCSK9	
	Frequency
c.*887C>T	2
c.157G>C p.ALa53Pro	1
c.213G>A p.Pro71=	1
c.60_65dupGCTGCT p.Leu22_Leu23dup	1
Total	5

Abbiamo individuato 3 diverse mutazioni sul gene che codifica per LDLRAP1, ripetute ciascuna 1 sola volta (delle quali 2 nello stesso paziente).

LDLRAP1	
	Frequency
c.569G>C	1
c.*297G>A	1
c.850G>A	1
Total	3

Sul gene che codifica per APOE è stata individuata una mutazione (c.500_502delTCC p.Leu149del), una sola volta in un solo paziente. Sul gene che codifica STAP1 è stata individuata una mutazione (c.788A>C p. Asn263thr (*INCONCLUSIVE*)), una sola volta in un solo paziente.

In entrambi questi ultimi due casi le mutazioni individuate non erano associate ad altre mutazioni sui geni sequenziati.

Di 25 probandi inoltre è stato stimato lo SCORE LDL-C per la forma poligenica di ipercolesterolemia familiare; lo score medio è stato di 0.95 (range 0.65-1.28). A parte un caso (nel quale l'indice di probabilità -0.65- non conferma l'ipotesi di ipercolesterolemia familiare poligenica), nei restanti 24 casi (negativi per mutazioni associate ad ipercolesterolemia monogenica) lo score LDL-C ottenuto dall'analisi genotipica delle varianti individuate (valori superiori a 0.73 indicano alta probabilità che l'ipercolesterolemia abbia causa poligenica) ha confermato la diagnosi di ipercolesterolemia familiare poligenica.

VALUTAZIONE DEI LIVELLI DI ENDOCANO NEI PAZIENTI AFFETTI DA COVID-19

D. Sinicropi¹, F. Spadaro¹, M. Scuruchi¹, M. Marino¹, G. Calì¹, M. Cinquegrani¹, E. Venanzi-Rullo², M.S. Franzè¹, C. Morace¹, G. Nunnari², A. David³, G. Squadrito¹, G. Mandraffino¹
¹Internal Medicine Unit; ²Infectious Disease Unit; ³Intensive Care Unit; ^{1,2}Department of Clinical and Experimental Medicine; ³Department of Human Pathology, University of Messina

La pandemia di COVID-19 dovuta al nuovo coronavirus SARS-CoV2 ha causato, e sta ancora causando, un numero elevato di decessi in tutto il mondo. Il decorso clinico del COVID è molto eterogeneo e imprevedibile, spaziando da una malattia lieve e autolimitante, fino alle forme più gravi caratterizzate da sindrome da distress respiratorio acuto (ARDS), embolia polmonare, insufficienza multiorgano e morte. Il decorso più grave della malattia sembra essere supportato da una risposta infiammatoria inappropriata, derivante da un effetto patogeno sia diretto che indiretto che SARS-CoV2 esercita sulle cellule endoteliali, con conseguente attivazione disfunzionale in senso protrombotico.

In quest'ottica, individuare un profilo biochimico associato al maggior rischio di evoluzione verso le forme più gravi potrebbe essere di aiuto per riconoscere precocemente i pazienti che necessitano di cure di maggiore intensità.

Endocano è una molecola recentemente riconosciuta come potenziale marker immuno-infiammatorio associato ad eventi cardiovascolari. Livelli più elevati di endocano sono stati riportati in alcune malattie infiammatorie con coinvolgimento endoteliale, suggerendo un suo possibile ruolo come marker di disfunzione endoteliale. In questo lavoro abbiamo valutato i livelli sierici di endocano in due piccoli gruppi di pazienti con COVID-19, ricoverati in un reparto ad intensità di cure medio-alto o in terapia intensiva, cercando eventuali differenze e potenziali correlazioni tra i livelli di endocano ed altre variabili (tra cui terapia medica, test di laboratorio e la necessità di ossigenoterapia).

Abbiamo riscontrato valori del mediatore incrementati in media di 2.45 volte rispetto ai controlli sani; suddividendo i pazienti in base al reparto di degenza (ordinaria o terapia intensiva), i pazienti ricoverati in terapia intensiva presentavano valori significativamente più elevati (3.01 volte di incremento) rispetto ai pazienti ricoverati in reparto ordinario (2.1 volte di incremento; p<0.01).

Come atteso, anche i valori di FiO2 assicurati ai pazienti erano differenti (42% vs 34%).

Altre variabili potenzialmente associate all'incremento di sintesi di endocano verranno valutate.

I risultati preliminari sembrano confermare una correlazione significativa tra i livelli sierici di endocano e la necessità di cure più intensive nei pazienti ricoverati per COVID-19.

STIMA DELLA PREVALENZA DELLE SINDROMI CHILOMICRONEMICHE IN UNA POPOLAZIONE DI PAZIENTI AFFERENTI A UN AMBULATORIO DI TERZO LIVELLO

A. Toscano, S. Verachtert, M.A. Aragona, A. Messineo,

G. Squadrito, G. Russo, G. Mandraffino

Internal Medicine Unit; Department of Clinical and Experimental Medicine; University of Messina

L'ipertrigliceridemia è una condizione comune nella popolazione generale, della quale, ad oggi, non è stata ancora individuata una chiara base genetica. Livelli di trigliceridi moderatamente elevati (200-750 mg/dL) sembrano essere associati a mutazioni/polimorfismi su vari geni coinvolti nella produzione e nel catabolismo delle lipoproteine a densità molto bassa (VLDL). Altri studi hanno invece identificato una correlazione tra mutazioni in omozigosi o eterozigosi di cinque geni (Lipoprotein Lipasi - *LPL*, Apolipoproteina C-II - *Apo-CII*, Apolipoproteina A-V - *Apo-AV*, Glicosilfosfatidilinositolo ancorato alla proteina ad alta densità legante le lipoproteine 1 - *GPI-HBPI* e Fattore di maturazione delle lipasi - *LMFI*) e livelli fortemente elevati di chilomicroni e trigliceridi plasmatici (>886 mg/dL).

Tali mutazioni costituiscono la base genetica della Sindrome Chilomicronemica Familiare (FCS), rara malattia monogenica a trasmissione autosomica recessiva con una prevalenza di circa 1-2 casi su 1.000.000. Simili livelli di trigliceridemia possono essere individuati in soggetti affetti da sindrome chilomicronemica multifattoriale (MCS), la quale si sviluppa a seguito di interazioni tra mutazioni poligeniche e altri fattori, tra i quali DMT2 ed eccessivo introito di alcol.

FCS/MCS possono presentarsi con dolore addominale ricorrente, epatosplenomegalia e/o, nei casi più gravi, pancreatite acuta o ricorrente o, in pazienti asintomatici, con alterazioni ematochimiche del profilo lipidico. La Società Italiana per lo Studio dell'Aterosclerosi ha recentemente sviluppato uno score per una più accurata identificazione di soggetti affetti da FCS/MCS. Tale score (FCS/MCS score) si basa su parametri ematochimici quali i livelli di trigliceridi sia in età adulta che infantile, su dati clinici quali la presenza di manifestazioni eruttive cutanee, lipemia retinalis, dolore addominale ricorrente, pancreatite ed epatosplenomegalia, e sulla risposta dell'ipertrigliceridemia al trattamento con fibrati ed omega-3.

L'attribuzione di un punteggio ad ognuno di questi parametri consente di classificare gli individui con: a) improbabile diagnosi di FCS/MCS (FCS/MCS score <6), b) probabile diagnosi di FCS/MCS (6 ≤ FCS/MCS score <8) e c) diagnosi definitiva di FCS/MCS (FCS/MCS score ≥8). La diagnosi di FCS è difficile a causa della sua rarità e della mancanza di segni/sintomi specifici che la possano distinguere dalla forma poligenica, anche se quest'ultima si manifesta con un corteo sintomatologico meno eclatante. Al contrario, nei pazienti affetti da FCS, l'ipertrigliceridemia spesso compare già in età pre-adolescenziale e gli episodi di pancreatite acuta si manifestano nei giovani adulti senza altre cause apparenti. Lo screening tramite utilizzo di FCS/MCS score permette di individuare pazienti da sottoporre ad ulteriori indagini genetiche che permettano di confermare la diagnosi e di candidarli a nuove prospettive terapeutiche.

Lo scopo del nostro studio è di valutare la prevalenza di FCS/MCS in pazienti inviati dai MMG presso i nostri ambulatori di III livello - Ambulatorio per la Diagnosi e la Cura delle Dislipidemie e Ambulatorio di Diabetologia - della U.O.C. di Medicina Interna della A.O.U. G. Martino di Messina.

Sono stati valutati 213 pazienti nei primi 60 giorni (31 inviati all'Ambulatorio Dislipidemie, 182 all'Ambulatorio di Diabetologia).

I pazienti con score ≥6 sono stati 4 su 213 (1.88%), dei quali 2 con score tra 6 e 8 (0.94% - diagnosi probabile) e 2 con score >8 (0.94% - diagnosi definitiva).

Ai quattro pazienti identificati sulla base dello score clinico è stato offerto il test genetico per la ricerca delle mutazioni causative; nelle settimane precedenti sono stati già identificati altri 4 pazienti con score significativo, dei quali abbiamo appreso l'esito del sequenziamento (1 paziente è risultato portatore di mutazione causativa in eterozigosi, 1 campione dovrà essere sottoposto a nuovo sequenziamento, e i rimanenti 2 sono risultati non portatori di mutazioni causative).

IMPATTO DELL'EPIDEMIA DA SARS-COV2 IN PAZIENTI AFFETTI DA IPERCOLESTEROLEMIA FAMILIARE

V. Ferrara¹, R. Scicali², A. Di Pino¹, M.G. Farina¹, S. Conti¹, S. Piro¹, F. Purrello¹

¹Unità Operativa Complessa di Medicina Interna, ARNAS Garibaldi – PO Nesima, Catania; ²Unità Operativa Complessa di Geriatria, ARNAS Garibaldi – PO Centro, Catania

Razionale: L'infezione da SARS-COV2 provoca un'accentuata cascata infiammatoria incrementando così il rischio di eventi cardiovascolari; inoltre, l'epidemia da SARS-COV2 ha avuto un impatto negativo sulla gestione delle malattie cardiovascolari, portando a ritardi diagnostici e terapeutici delle stesse. Pertanto, l'impatto dell'epidemia da SARS-COV2 potrebbe essere deleterio nei pazienti ad elevato rischio cardiovascolare come i soggetti affetti da ipercolesterolemia familiare (FH).

Obiettivo dello studio: Valutare gli effetti diretti ed indiretti dell'epidemia da SARS-COV2 in una coorte di soggetti affetti da ipercolesterolemia familiare.

Metodi: In questo studio osservazionale retrospettivo, abbiamo arruolato tutti i soggetti di età maggiore o uguale a 18 anni e affetti da ipercolesterolemia familiare geneticamente confermata seguiti presso gli ambulatori per la gestione e la cura delle dislipidemie della UOC di Geriatria e la UOC di Medicina dell'ARNAS Garibaldi di Catania. Tutti i pazienti sono stati sottoposti a questionario telefonico per sapere se avessero eseguito follow-up clinico e diagnostico nei 12 mesi prima del lockdown di Marzo 2020 e per valutare l'effetto diretto ed indiretto dell'epidemia da SARS-COV2 da Marzo 2020 a Maggio 2021. L'effetto diretto è stato definito come positività ad infezione da SARS-COV2. L'effetto indiretto è stato definito come mancata aderenza a: terapia medica e/o follow-up di visita ambulatoriale e/o follow-up cardiologico e/o follow-up vascolare.

Risultati: 260 soggetti FH parteciparono allo studio; il 49.6% dei soggetti studiati era di sesso maschile; inoltre, il 30.8% aveva già avuto un evento cardiovascolare. Inoltre, la variante patogenica più frequentemente riscontrata era la mutazione genetica a carico di LDLR ed il 98% dei soggetti FH erano eterozigoti. Per quanto riguarda la presenza di ulteriori fattori di rischio, 6 (2.3%) pazienti erano diabetici, 72 (27.7%) erano ipertesi e 59 (22.7%) fumatori; inoltre, il 13.1% dei soggetti FH presentava almeno 2 fattori di rischio. Per quanto riguarda la terapia ipolipemizzante, quasi tutti i pazienti erano in terapia statinica, di cui il 69.2% praticava statina ad alta intensità ed il 28.9% statina a moderata intensità; solo 5 pazienti (1.9%) non assumevano statina per intolleranza farmacologica. Inoltre, l'86.5% dei pazienti assumeva ezetimibe ed il 23.8% dei pazienti era in terapia con inibitori di PCSK9; infine la percentuale di soggetti in terapia con statina + ezetimibe + PCSK9i era pari al 21.9%. Per quanto riguarda l'assetto lipidico, in seguito al lockdown la percentuale di soggetti FH che ha eseguito l'analisi ematochimica dell'assetto lipidico era inferiore rispetto al periodo antecedente (56.5% vs 100.0%, $p < 0.01$); inoltre, valutando l'assetto lipidico dei soggetti FH che hanno eseguito l'analisi ematochimica dopo lockdown, è stata evidenziata una riduzione significativa dei valori di colesterolo HDL (47.78 ± 10.12 vs 53.2 ± 10.38 mg/dL, $p < 0.05$) ed un significativo aumento dei livelli di colesterolo Non HDL (117.24 ± 18.83 vs 133.09 ± 19.01 mg/dL, $p < 0.05$) e la percentuale di soggetti FH che raggiungevano il target di colesterolo LDL era inferiore dopo lockdown (31.2% vs 40.4%, $p = 0.09$). Inoltre, la percentuale di soggetti FH che ha effettuato follow-up lipidologico e/o cardiologico e/o di imaging vascolare era inferiore dopo lockdown rispetto al periodo precedente (per il follow-up lipidologico 33.5% vs 100.0%, $p < 0.001$; per il follow-up cardiologico 22.3% vs 60.8%, $p < 0.01$; per il follow-up di imaging vascolare 19.6% vs 100.0%, $p <$

0.001). Andando ad indagare le possibili cause dell'effetto indiretto del SARS-CoV2 abbiamo notato come la maggior parte dei soggetti (73.8%) ha ridotto l'aderenza diagnostica e terapeutica per la paura di contagio. Infine, la percentuale di soggetti FH che ha contratto l'infezione da SARS-CoV2 è stata 7.3%. Considerando le caratteristiche dei 19 FH soggetti FH positivi ad infezione da SARS-CoV2, l'età media era 58.7 ± 5.18 , il 52.6% dei soggetti era di sesso maschile e la percentuale di soggetti con storia di eventi cardiovascolari era del 78.9%. Nonostante la completa aderenza dei soggetti alla terapia ipolipemizzante, soltanto il 42.1% aveva raggiunto l'adeguato target di colesterolo LDL; inoltre, il 52.6% dei soggetti aveva più di due fattori di rischio. Per quanto riguarda la terapia ipolipemizzante, La maggior parte dei soggetti era in terapia con statina ad alta intensità, tutti i soggetti praticavano ezetimibe e la percentuale di soggetti che assumeva statina più ezetimibe più inibitore di PCSK9 era del 63.2%.

Conclusioni: In conclusione, il nostro studio ha mostrato come la pandemia da Sars-CoV2 ha portato effetti deleteri per quanto riguarda lo screening sanitario nei soggetti ad alto rischio cardiovascolare come i soggetti affetti da ipercolesterolemia familiare. Inoltre, tra i soggetti FH affetti da Sars-CoV2, i valori di colesterolo HDL erano notevolmente ridotti, avevano un'età più alta e un BMI più elevato rispetto la coorte di studio; infine, la maggior parte dei soggetti FH affetti da Sars-CoV2 avevano un colesterolo LDL fuori dal target e presentavano almeno due fattori di rischio cardiovascolare. Ulteriori studi su coorti più ampie di soggetti FH sono necessari per confermare i nostri dati preliminari.

HIGH TG TO HDL RATIO PLAYS A SIGNIFICANT ROLE ON ATHEROSCLEROSIS EXTENSION IN PREDIABETES AND NEWLY DIAGNOSED TYPE 2 DIABETES SUBJECTS

R. Scicali¹, P. Giral^{2,3}, L. D'Erasmus^{2,4}, P. Cluzelet^{5,6}, A. Redheuil^{5,6}, A. Di Pino¹, A.M. Rabuazzo¹, S. Piro¹, M. Arca⁴, S. Béliard⁷, F. Purrello¹, E. Bruckert^{2,3}, A. Gallo^{2,5}

¹Department of Clinical and Experimental Medicine, University of Catania; ²Cardiovascular Prevention Unit, Department of Endocrinology and Metabolism, Paris Hospital Public Assistance, Pitié-Salpêtrière Hospital Group – Sorbonne University, Paris; ³Dyslipoproteinemia and Atherosclerosis Research Unit, UMRS 939, National Institute for Health and Medical Research (INSERM) and Pierre et Marie Curie University (UPMC – Paris VI), Paris; ⁴Department of Translational and Precision Medicine, Sapienza Università di Roma; ⁵Laboratoire d'imagerie Biomédicale, INSERM 1146, - CNRS 7371, Sorbonne University, Paris; ⁶Département d'imagerie cardiovasculaire et de radiologie interventionnelle, Pôle Imagerie-Groupes Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris; ⁷Aix Marseille Univ, INSERM, INRAE, C2VN, Marseille

Aims: We investigated the role of TG to HDL ratio (TG/HDL) on atherosclerosis extension, defined as presence of coronary artery calcium (CAC), carotid and femoral plaque, in prediabetes or newly diagnosed type 2 diabetes (T2D).

Methods: We performed a retrospective, cross-sectional, single center study involving 440 prediabetes or newly diagnosed controlled T2D subjects. Participants underwent CAC analysis by computed tomography and carotid and femoral plaque evaluation by ultrasonography and were stratified in high TG/HDL (H-TG/HDL) or low TG/HDL (L-TG/HDL) group according to TG/HDL median value. We estimated atherosclerosis extension according to the number of involved vascular districts.

Results: CAC was higher in the H-TG/HDL group than L-TG/HDL group (29.15 [0.0-95.68] vs 0.0 [0.0-53.97] AU, $p < 0.01$) and CAC > 0 was more prevalent in the H-TG/HDL group than L-TG/HDL group (64.5% vs 45%, $p < 0.001$). Femoral atherosclerosis was higher in the H-TG/HDL group than L-TG/HDL group (57.3% vs 43.6%, $p < 0.01$). H-TG/HDL group exhibited a lower prevalence of subjects with 0-TWP compared to L-TG/HDL group (21.8% vs 38.6%, $p < 0.01$) and higher percentages of subjects with 2-TWP or 3-TWP than L-TG/HDL group (for 2-TWP 29.5% vs 21.5%, $p < 0.05$; for 3-TWP 32.7% vs 20.9%, $p < 0.01$). Multiple logistic regression analysis showed that a H-TG/HDL was inversely associated to 0-TWP ($p < 0.05$) and positively associated with 2-TWP ($p < 0.05$) and 3-TWP ($p < 0.01$).

Conclusions: Our data suggest that TG/HDL is a marker of increased atherosclerotic extension in prediabetes and newly diagnosed T2D and may be useful to identify subjects with a higher cardiovascular risk profile.

LA FRAZIONE POLIFENOLICA DEL BERGAMOTTO CON L'ESTRATTO DELLE FOGLIE DEL CARCIOFO RIDUCE L'ACIDO URICO SIERICO NEGLI UOMINI CON STEATOSI EPATICA NON ALCOLICA

M. Frosina, e Y. Ferro, G. Marafioti, M. Prastaro, L. Lascalea, R. Pujia, E. Mazza, G. Boragina, M. Gliozzi, S. Nucera, V. Musolino, A. Mirarchi, V. Mollace, A. Pujia, T. Montalcini Università degli Studi "Magna Graecia", Catanzaro

Background: Numerosi studi osservazionali hanno documentato la forte associazione tra elevati livelli di acido urico sierico e un maggior rischio di malattie cardiovascolari, comprese le sue manifestazioni cliniche e subcliniche. È stato recentemente dimostrato che un acido urico sierico > 5.6 mg/dL è associato ad un aumento del rischio di mortalità per malattie cardiovascolari. Inoltre, è un fattore indipendente di rischio per lo sviluppo di steatosi epatica non alcolica e per la progressione in steatoepatite non alcolica. Gli uomini hanno più alti livelli di acido urico sierico rispetto alle donne, così come i soggetti con steatosi epatica rispetto ai soggetti sani. È stato dimostrato che un nutraceutico contenente la frazione polifenolica del bergamotto (BPF) e l'estratto di carciofo (CyC) riduce il grasso intraepatico in adulti con steatosi. Inoltre, alcuni studi, per la maggior parte condotti su modelli murini, suggeriscono che i polifenoli contenuti negli agrumi e nel carciofo potrebbero anche avere effetti ipouricemizzanti. Perciò, lo scopo dello studio è stato quello di valutare gli effetti di nutraceutico contenente BPF e CyC sull'uricemia in adulti con steatosi epatica non alcolica.

Metodi: È stata effettuata un'analisi secondaria di un trial clinico randomizzato (ID ISRCTN12833814). Sono stati analizzati i dati, separati per genere, di adulti non diabetici con steatosi, che hanno assunto 1 cps/die contenente BPF e CyC o 1 cps/die di placebo (maltodestrine) per 6 settimane.

Risultati: Nel genere maschile l'età media era di 50 ± 11 anni, e al basale non vi erano differenze nella prevalenza di soggetti che avevano livelli di acido urico > 5.6 mg/dL (50% vs 39%, $p = 0.59$) o dell'uso di agenti ipouricemizzanti tra i soggetti che hanno assunto BPF e CyC rispetto al placebo (7% vs 0%, $p = 0.49$; rispettivamente). Dopo 6 settimane l'assunzione del nutraceutico ha determinato una riduzione del 3.8% dell'uricemia rispetto al placebo (+6.9%, $p = 0.02$). Una maggiore riduzione si ha nei soggetti con valori di acido urico > 5.6 mg/dL ($-9.7 \pm 3\%$ vs $+3.6 \pm 4\%$, $p = 0.03$). Il nutraceutico determina inoltre una maggiore riduzione del peso corporeo ($-4.0 \pm 3\%$ vs $-2.7 \pm 2\%$, $p = 0.04$) e della circonferenza vita (-4.8 ± 4 cm vs -2.3 ± 3 cm, $p = 0.01$) rispetto al placebo. Nelle donne, il nutraceutico non determina una differenza statisticamente significativa nella variazione dei livelli ematici di acido urico rispetto al placebo dopo 6 settimane di trattamento (0.15 ± 0.6 mg/dL vs 0.19 ± 0.7 mg/dL, $p = 0.84$; rispettivamente), né degli altri parametri antropometrici ed ematochimici analizzati.

Conclusioni: Un nutraceutico contenente la frazione polifenolica del bergamotto con l'estratto delle foglie del carciofo riduce i livelli ematici di acido urico negli maschi con steatosi epatica, ma non nelle donne, dopo 6 settimane di trattamento. Sono necessari studi ad hoc per valutare l'efficacia di questo nutraceutico nelle donne, in soggetti con iperuricemia e nella prevenzione del rischio cardiovascolare.

LIVELLI CIRCOLANTI DI PCSK9 E DANNO VASCOLARE IN PAZIENTI DIABETICI DI TIPO 2

G. Armentaro, V. Cassano, E. Clausi, G. Mannino,
T.V. Fiorentino, M. Perticone, E. Succurro, F. Andreozzi,
F. Carbone, F. Montecucco, G. Sesti, A. Sciacqua
Università degli Studi "Magna Graecia", Catanzaro

Background: La proprotein convertasi Subtilisina/Kexina 9 (PCSK9), molecola espressa principalmente nel fegato e rilevata nel plasma umano, è implicata nella degradazione del recettore delle lipoproteine a bassa densità (LDLR) e nella regolazione della concentrazione plasmatica del colesterolo. Una sovraespressione del gene codificante PCSK9, è correlata all'aumento della concentrazione plasmatica di colesterolo LDL ed al rischio cardiovascolare (CV). Inoltre, è stato dimostrato che esiste una correlazione tra i livelli di PCSK9, lo spessore intima media (IMT) e la velocità dell'onda del polso (PWV), gold standard per la valutazione della rigidità arteriosa. I livelli plasmatici di PCSK9 sono risultati essere più elevati nei pazienti con diabete mellito di tipo 2 (DM2) rispetto ai soggetti non diabetici. Il DM2 è un fattore di rischio indipendente di danno vascolare precoce, rilevabile attraverso la rigidità arteriosa, che è associata ad un aumentato rischio di eventi CV e mortalità per tutte le cause nei pazienti diabetici. Lo scopo del nostro studio è stato quello di analizzare la correlazione esistente tra i livelli sierici circolanti di PCSK9 e la rigidità arteriosa, in un'ampia coorte di pazienti affetti da DM2, senza precedenti eventi CV.

Materiali e metodi: Abbiamo arruolato 401 pazienti Caucasi, diabetici ed ipertesi (241 uomini e 160 donne, età media 60±11 anni). I principali criteri di esclusione erano l'evidenza di angina, infarto miocardico, cardiopatia valvolare, ipercolesterolemia, vasculopatia periferica, coagulopatie. Tutti i pazienti presentavano normale funzione renale (FG >60 ml/min/1,73 m²). PCSK9 è stato misurato con il test colorimetrico ELISA. La rigidità arteriosa è stata stimata con un sistema convalidato, che utilizza la tonometria ad applanazione ad alta fedeltà. La PWV aortica è stata determinata dalle onde di pressione carotidea e femorali. Il test Anova è stato eseguito per variabili continue, inoltre è stata eseguita un'analisi di correlazione lineare per testare la correlazione tra PWV e diverse covariate.

Risultati: I pazienti sono stati suddivisi in tre terzili in base all'aumento del livello di PCSK9 circolante. Dal I al III terzile, c'è stato un aumento statisticamente significativo della proteina C-reattiva ad alta sensibilità (hs-CRP) (p=0.032), del fibrinogeno (p<0.0001) e dei globuli bianchi (WBC) (p=0.004) ed una riduzione della velocità di filtrazione glomerulare (eGFR) (p=0.034). Inoltre, i soggetti con livelli più elevati di PCSK9 presentavano un aumento della pressione arteriosa sistolica (PAS) (p<0.0001), della pressione arteriosa diastolica (PAD) (p<0.0001), della pressione del polso (PP) (p=0.004), della PP centrale (p=0.04), augmentation index (AI) (p=0.003) e PWV (p<0.0001). Nell'intera popolazione dello studio, l'analisi di regressione lineare ha mostrato che la PWV era significativamente e direttamente correlata con fibrinogeno (r=0.131; p<0.0001), leucociti (r=0.666; p<0.0001), età (r=0.122; p=0.024), PCSK9 (r=0.408; p=0.003), sesso (r=-0.023; p=0.009) ed indirettamente con l'indice di massa corporea (IMC) (r=0.18; p=0.001) e terapia diuretica (r=-0.007; p=0.001). Dall'analisi di regressione multipla stepwise, PCSK9 è risultato essere il principale predittore di PWV, giustificando il 16.9% della sua variazione, seguito dall'età che ha aggiunto un altro 2.9%, iRAS che ha giustificato l'1.9%, PPc e HDL che ha aggiunto un altro 0.8%.

Conclusioni: Il nostro studio ha dimostrato una stretta associazione tra i livelli circolanti di PCSK9 e PWV, corroborando l'importante correlazione tra PCSK9 e rigidità arteriosa nell'identificazione precoce dei soggetti ad alto rischio CV ed i dati ottenuti confermano questa correlazione nei soggetti diabetici senza precedenti eventi CV.

STRESS OSSIDATIVO E PERFORMANCE VENTRICOLARE SINISTRA IN PAZIENTI IPERTESI CON DIFFERENTE PROFILO GLICOMETABOLICO

V. Cassano, S. Miceli, G. Armentaro, K. Barbara, D. Crescibene, V. Condoleo, G. Severini, V. Monaco, M. Perticone, F. Andreozzi, G. Sesti, A. Sciacqua
Università degli Studi "Magna Graecia", Catanzaro

Background: Studi recenti hanno dimostrato che in soggetti normotolleranti al glucosio (NGT), un valore glicemico plasmatico ad 1 ora post carico ≥ 155 mg/dl (NGT ≥ 155), durante il test di tolleranza al glucosio orale (OGTT), identifica i pazienti con un peggiore profilo cardio-metabolico e con un aumentato rischio di sviluppare Diabete Mellito di Tipo 2 (DM2). È noto che pazienti affetti da DM2 presentano un aumento dello stress ossidativo, il quale svolge un ruolo centrale nello sviluppo delle complicanze CV. Il global longitudinal strain (GLS) è in grado di identificare alterazioni precoci delle fibre longitudinali subendocardiche, evidenziando una disfunzione sistolica ventricolare sinistra molto prima che si verifichino variazioni della frazione di eiezione (FE). Lo scopo del presente studio è stato quello di analizzare lo stress ossidativo e la possibile correlazione esistente tra quest'ultimo ed il danno miocardico subclinico valutato con ecocardiografia speckle tracking.

Materiali e metodi: Sono stati arruolati 100 pazienti Caucasici (61 uomini e 39 donne, età media 61.4 ± 10.7) afferenti allo studio CATAMERI. Sono state escluse le cause di ipertensione secondaria, evidenza clinica di complicanze CV, storia di malattie respiratorie maligne o croniche, patologie endocrinologiche, abuso di alcol, droghe o fumo. Tutti i soggetti sono stati sottoposti a valutazione antropometrica, OGTT e valutazione clinica. Il glucosio plasmatico è stato misurato con il metodo di ossidazione del glucosio e la concentrazione plasmatica insulinica mediante chemiluminescenza. La sensibilità insulinica è stata valutata con l'indice HOMA. I valori sierici dei marker di stress ossidativo (8-isoprostano e NOX-2) sono stati analizzati con metodo ELISA. La valutazione ecocardiografica è stata eseguita utilizzando un sistema ecografico E-95 Pro con trasduttore da 2,5 MHz. Il test ANOVA è stato eseguito per analizzare le differenze tra i gruppi ed è stata eseguita un'analisi di correlazione lineare per associare i valori di GLS e gradiente endo/epi a differenti covariate. Le variabili che hanno raggiunto la significatività statistica sono state inserite in un modello di regressione lineare multipla stepwise.

Risultati: In base ai valori di glicemia ottenuti durante OGTT, i pazienti sono stati divisi in 4 gruppi: NGT < 155 (n=30), NGT ≥ 155 (n=24), IGT (n=28), pazienti con DM2 (n=18). Non ci sono state differenze significative tra i gruppi per quanto riguarda età, pressione sanguigna sistolica (PAS), colesterolo totale, HDL e LDL. Tra i 4 gruppi, sono state riscontrate differenze significative per valori di glicemia basale ($p < 0.0001$), ad 1 ora (PG60) ($p < 0.0001$) ed a 2 ore ($p < 0.0001$), insulinemia a digiuno ($p < 0.0001$), ad 1 ora ($p = 0.029$) e 2 ore ($p < 0.0001$) durante OGTT. I soggetti NGT ≥ 155 hanno mostrato valori più elevati di glucosio plasmatico ad 1 ora ($p < 0.0001$), aumentati valori di proteina C reattiva ad alta sensibilità (hs-CRP) ($p = 0,006$), quando confrontati con i soggetti NGT < 155. Al contrario, non sono state osservate differenze statisticamente significative nel confronto tra NGT ≥ 155 e IGT. Dal primo al quarto gruppo è stato osservato un aumento significativo dei livelli di 8-isoprostano ($p < 0.0001$) e NOX-2 ($p < 0.0001$), indicando un aumento dello stress ossidativo con il peggioramento dello stato metabolico. I livelli sierici di 8-isoprostano e NOX-2 erano significativamente aumentati nel gruppo NGT ≥ 155 rispetto al gruppo NGT < 155, ma simili al gruppo IGT. La funzione sistolica globale sinistra, valutata come deformazione miocardica e GLS, è apparsa progressivamente infe-

riore procedendo dal gruppo NGT < 155 al gruppo DM2 ($p < 0.0001$). Inoltre, per valori simili di FE, i soggetti NGT ≥ 155 presentavano ridotto GLS rispetto agli NGT < 155 ($p = 0.001$), ma simile ai pazienti IGT. Con il peggioramento dello stato metabolico, è stata osservata una progressiva riduzione del gradiente GLS endo ($p < 0.0001$) e GLS endo/epi ($p < 0.0001$). L'analisi di correlazione lineare ha mostrato che il gradiente endo/epi era significativamente e inversamente correlato con la glicemia ad 1 ora ($r = -0.632$, $p < 0.0001$), NOX-2 ($r = -0.638$, $p < 0.0001$), 8-isoprostano ($r = -0.508$, $p < 0.0001$), mentre il GLS era correlato inversamente con glicemia ad 1 ora ($r = -0.734$, $p < 0.0001$) e direttamente con 8-isoprostano ($r = 0.564$, $p < 0.0001$), NOX-2 ($r = 0.625$, $p < 0.0001$). Dal modello di regressione lineare multivariata stepwise, NOX-2 è risultato il principale predittore del GLS endo/epi, giustificando il 40.7% della sua variazione. La glicemia ad 1 ora invece è risultata essere il secondo predittore giustificando un altro 9.2% della variazione del gradiente endo/epi. Analogamente la glicemia ad 1 ora risultava essere il più forte predittore del GLS, spiegando rispettivamente il 53.9% della sua variazione, e NOX-2 aggiungeva un altro 4.7%.

Conclusioni: I risultati del presente studio confermano l'importante ruolo del cut-off di 155 mg/dl a 1 ora durante OGTT per identificare, precocemente, i soggetti a maggior rischio metabolico e CV. Il nostro studio, inoltre, ha aggiunto nuovi dati che dimostrano come i soggetti NGT ≥ 155 presentano, molto precocemente, alterazioni funzionali delle fibre contrattili miocardiche, ancor prima della variazione della FE, e come queste alterazioni siano correlate con i livelli di stress ossidativo, risultati già alterati in questi pazienti. Questi dati potrebbero ricoprire un ruolo centrale nella continua ricerca sull'associazione esistente tra iperglicemia ad 1 ora post carico e rischio CV.

PROGRESSI NEL DIABETE DI TIPO 2: EFFETTO DEL C-PEPTIDE SULLA MASSA MUSCOLARE

S. Maurotti, S. Nucera, V. Musolino, R. Mare, M. Frosina,
N. Geirola, M. D. Floccari, P. Riillo, A. Pujia, T. Montalcini
Università degli Studi "Magna Graecia", Catanzaro

Introduzione: Nel diabete mellito vi sono ridotti livelli di C-peptide e di insulina, fenomeno che è stato osservato anche nell'invecchiamento, indipendentemente dalla presenza del diabete. Evidenze scientifiche suggeriscono che il C-peptide ha un ruolo indipendente dall'insulina, e che ridotti livelli si associano allo sviluppo di complicanze. Il paziente diabetico, così come il soggetto anziano, può sviluppare sarcopenia, una patologia caratterizzata da una riduzione quali-quantitativa della massa muscolare che predispone che ad un aumento del rischio di malattie cronico-degenerative. È stato tuttavia dimostrato che la terapia sostitutiva con C-peptide è in grado di ridurre le complicanze del diabete, e potrebbe avere effetti benefici su quelle alterazioni o disfunzioni tipiche dell'anziano, come la sarcopenia. Tuttavia, ad oggi nessuno ha mai investigato gli effetti del C-peptide sul muscolo. Perciò lo scopo dello studio è stato quello di valutare gli effetti della terapia sostitutiva con il C-peptide sui parametri glico-metabolici e muscolari in un modello animale di diabete.

Metodi: In questo studio sono stati impiegati n.20 ratti wistar maschi suddivisi in 3 gruppi: un gruppo di n.6 animali è stato utilizzato come controllo senza diabete (CTR), mentre ai restanti n.17 animali è stato indotto il diabete mediante somministrazione intraperitoneale di streptozotocina alla dose di 60 mg/Kg. Dopo l'induzione del diabete, ad un gruppo n.8 di animali è stato somministrato C-peptide alla dose di 72 nM/Kg/24h per 42 giorni mediante l'inserimento di un'osmopompa sottocutanea (C-PEP), mentre i restanti n.6 animali hanno subito una sham operation (D-CTR). È stato eseguito il prelievo ematico a inizio e fine trattamento con C-peptide per le valutazioni del quadro metabolico ed il prelievo a fine studio dei muscoli dell'arto inferiore, per le analisi di espressione di geni e proteine associate alla via proteolitica ubiquitina-proteasoma.

Risultati: È stato osservato che l'infusione con C-peptide ha protetto significativamente il gruppo C-PEP dall'iperglicemia ($p=0.02$, C-PEP vs D-CTR) e dall'ipertrigliceridemia ($p=0.02$, C-PEP vs D-CTR) osservata nel gruppo D-CTR. È stato riscontrato che nel gruppo C-PEP i livelli ematici di proteine totali erano nella norma come il gruppo CTR ed i livelli di ubiquitina sierica nel gruppo trattato con C-peptide erano significativamente inferiori rispetto al gruppo con diabete ($p=0.03$, C-PEP vs D-CTR). Inoltre, nel gruppo trattato con C-peptide viene preservato il peso corporeo e la massa muscolare. In particolare, il gruppo C-PEP ha una perdita di peso statisticamente minore rispetto al gruppo D-CTR ($p=0.02$), condizione riscontrata anche nel peso dei muscoli dell'arto inferiore rispetto al gruppo D-CTR ($p=0.02$). In un sottogruppo di animali (n.3 CTR; n. 2 D-CTR e n.3 C-PEP) sono stati analizzati i livelli proteici di ubiquitina nel muscolo. I livelli di ubiquitina nel soleo degli animali del gruppo trattato con C-PEP era statisticamente inferiore rispetto al gruppo D-CTR ($p=0.03$, C-PEP vs D-CTR). Infine, l'espressione genica dell'E3 ubiquitina ligasi muscolo-specifica, Atrogin-1, risulta essere statisticamente ridotta nel gruppo con C-peptide rispetto al gruppo con solo diabete ($p=0.01$, C-PEP vs D-CTR).

Conclusione: Lo studio mostra un'azione del C-peptide sul profilo glico-metabolico e sulle complicanze muscolari del diabete. Con elevata probabilità, ridotti livelli di C-peptide determinano una riduzione della massa muscolare, con aumento della sua degradazione, fattore che a sua volta aggrava il diabete, o addirittura

ne è la prima causa. I risultati di questo studio avvalorano l'ipotesi di un possibile uso del C-peptide come terapia sostitutiva nel diabete al fine di ridurre l'insorgenza delle complicanze ad esso correlate. Questi sono meccanismi affascinanti che però meritano ulteriori approfondimenti.

EFFETTI DEL LICOPENE ESTRATTO DA DIFFERENTI SALSE DI POMODORO SU CELLULE DI OSTEOLASTI UMANI

R. Mare, Y. Ferro, S. Maurotti, N. Geirola, M. Frosina, F. Micale, R. Isabella, G. Puteri, L. Perri, M.D. Floccari, T. Montalcini, A. Pujia
Università degli Studi "Magna Græcia", Catanzaro

Background: I nutraceutici svolgono un ruolo chiave nella prevenzione e mitigazione di varie malattie croniche grazie alle molecole bioattive che contengono. Tuttavia, i processi di lavorazione e stoccaggio industriale possono ridurre il contenuto di molecole benefiche come il licopene, carotenoide antiossidante in grado di esercitare diversi effetti benefici sulla salute umana.

Questo studio si prefigge il duplice scopo di trovare un metodo economico e veloce per estrarre e quantificare il licopene da matrice semisolida, nonché di comparare gli effetti *in vitro* degli estratti ottenuti da diverse salse di pomodoro disponibili sul mercato locale con quelli esercitati da Osteocol[®], una salsa di pomodoro del sud Italia recentemente brevettata perché naturalmente ricca di carotenoidi.

Metodi: Abbiamo eseguito l'estrazione del licopene con diversi solventi e miscele. I campioni ottenuti sono stati analizzati mediante spettrofotometria Uv-visibile e HPLC. Il licopene estratto è stato incapsulato in micelle di Tween80[®] e infine testato *in vitro* su cellule Saos-2. Gli effetti esercitati dal licopene sui pathway Wnt/ β -catenina e sull'espressione proteica della fosfatasi alcalina (ALP) sono stati studiati tramite Western-blotting.

Risultati: L'esano è stato il miglior solvente per l'estrazione del licopene dopo incubazione di 2 ore. Lo spettrofotometro UV-Vis e l'analisi HPLC hanno mostrato andamenti simili. Analizzando 100 g di passata, Osteocol[®] conteneva $\sim 39 \pm 4$ mg di licopene, mentre il miglior prodotto commerciale ne conteneva $\sim 19 \pm 1$ mg, entrambi costituiti da $\sim 16\%$ p/p dell'isoforma all-trans del carotenoide. L'estratto di licopene Osteocol[®] ha aumentato l'espressione delle proteine ALP e β -catenina in modo dose-dipendente, mostrando anche risultati statisticamente significativi ($p < 0.05$ rispettivamente).

Conclusioni: La qualità delle materie prime e le metodiche di lavorazione possono influenzare in maniera rilevante la concentrazione di bioattivi negli alimenti. Anche comparata alla migliore passata in commercio nel Sud Italia, Osteocol[®] ha dimostrato di avere il contenuto più alto di licopene. La veicolazione micellare di licopene su cellule ossee influenza positivamente la differenziazione degli osteoblasti e aumenta l'espressione delle proteine ALP e β -catenina. Pertanto, Osteocol[®] può essere considerato un nutraceutico utile nella prevenzione dell'osteoporosi.