

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. Banfi<sup>1</sup>, S.S. Barbieri<sup>2</sup>, M. Brioschi<sup>1</sup>, A. Guarino<sup>3</sup>, S. Ghilardi<sup>1</sup>, L. Sandrini<sup>2</sup>, G. Polvani<sup>4</sup>, E. Tremoli<sup>2</sup>, R. Baetta<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Centro Cardiologico Monzino IRCCS, Unit of Proteomics, Milano;  
<sup>2</sup>Centro Cardiologico Monzino IRCCS, Milano;  
<sup>3</sup>Centro Cardiologico Monzino IRCCS, Cardiovascular Tissue Bank, Milano;  
<sup>4</sup>Centro 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 INFIAMMATOARIO IN TOPI NORMOCOLESTEROLEMICI CON DEFICIT DI HDL

A. Colombo<sup>1</sup>, M. Busnelli<sup>1</sup>, S. Manzini<sup>1</sup>, E. Franchi<sup>1</sup>, F. Arnaboldi<sup>2</sup>, E. Donetti<sup>2</sup>, E. Scanziani<sup>3,4</sup>, G.D. Norata<sup>1,5</sup>, G. Chiesa<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano; <sup>2</sup>Dipartimento di Scienze Biomediche per la Salute, Università degli Studi di Milano; <sup>3</sup>Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Milano; <sup>4</sup>Mouse and Animal Pathology Laboratory (MAPLab), Fondazione UniMi, Milano; <sup>5</sup>Centro 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. Svecla<sup>1</sup>, A. Moregola<sup>1</sup>, P. Ubaldi<sup>1</sup>, L. Da Dalt<sup>1</sup>, F. Bonacina<sup>1</sup>, A.L. Catapano<sup>1,2</sup>, G.D. Norata<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Department of Pharmacological and Biomolecular Sciences, University of Milan; <sup>2</sup>IRCCS Multimedica Hospital, Sesto San Giovanni, Milano; <sup>3</sup>Centro 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<sup>-/-</sup> e ASGR1<sup>-/-</sup>/LDL-R<sup>-/-</sup>, 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<sup>-/-</sup>/LDL-R<sup>-/-</sup> rispetto a LDL-R<sup>-/-</sup> (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. Nour<sup>1</sup>, F. Bonacina<sup>1</sup>, A. Moregola<sup>1</sup>, R. Bellini<sup>1</sup>, C. Garlanda<sup>2</sup>, A.L. Catapano<sup>1,3</sup>, G.D. Norata<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano; <sup>2</sup>Dipartimento di Scienze Biomediche, Istituto Clinico Humanitas, IRCCS, Rozzano; <sup>3</sup>IRCCS Multimedica, Milano; <sup>4</sup>Centro 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. Franchi<sup>1</sup>, M. Busnelli<sup>1</sup>, S. Manzini<sup>1</sup>, A. Colombo<sup>1</sup>, F. Bonacina<sup>1</sup>, G.D. Norata<sup>1</sup>, S. Castiglioni<sup>1</sup>, C. Andronis<sup>2</sup>, E. Lekka<sup>2</sup>, E. Scanziani<sup>3,4</sup>, G. Chiesa<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano; <sup>2</sup>Biovista, 34 Rodopoleos Street, 16777 Atene, Grecia; <sup>3</sup>Mouse and Animal Pathology Laboratory (MAPLab), Fondazione UniMi, Milano; <sup>4</sup>Dipartimento 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. Sandrini<sup>1</sup>, P. Amadio<sup>1</sup>, A. Ieraci<sup>2</sup>, A. Malara<sup>3,4</sup>, J.P. Werba<sup>5</sup>, P.M. Soprano<sup>3,4</sup>, A. Balduini<sup>3,4</sup>, M. Zarà<sup>1</sup>, A. Bonomi<sup>6</sup>, F. Veglia<sup>6</sup>, G.I. Colombo<sup>7</sup>, M. Popoli<sup>2</sup>, F.S. Lee<sup>8</sup>, E. Tremolli<sup>9</sup>, S.S. Barbieri<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Unità Asse Cuore-Cervello: Meccanismi Cellulari e Molecolari, Centro Cardiologico Monzino, IRCCS, Milano; <sup>2</sup>Laboratorio di Neuropsicofarmacologia e Neurogenomica Funzionale, Dipartimento di Scienze Farmacologiche, Università degli Studi di Milano; <sup>3</sup>Dipartimento di Medicina Molecolare, Università di Pavia; <sup>4</sup>Laboratorio di Biochimica, Biotecnologia e Diagnostica Avanzata, Fondazione San Matteo, IRCCS, Pavia; <sup>5</sup>Unità di Prevenzione dell'Aterosclerosi, Centro Cardiologico Monzino, IRCCS, Milano; <sup>6</sup>Unità di Biostatistica, Centro Cardiologico Monzino, IRCCS, Milano; <sup>7</sup>Unità di Immunologia e Genomica Funzionale, Centro Cardiologico Monzino, IRCCS, Milano; <sup>8</sup>Dipartimento di Psichiatria, Weill Cornell Medical College, New York, USA; <sup>9</sup>Ospedale 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. Turri<sup>1</sup>, C. Pavanello<sup>1</sup>, A. Strazzella<sup>1</sup>, P. Tulissi<sup>2</sup>, S. Pizzolitto<sup>3</sup>, G. De Maglio<sup>3</sup>, R. Nappi<sup>2</sup>, G. Boscutti<sup>2</sup>, L. Calabresi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro E. Grossi Paoletti, Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Milano; <sup>2</sup>Unità di Nefrologia, Dialisi e Trapianto Renale, Ospedale S. Maria della Misericordia, Azienda Sanitaria Universitaria Friuli Centrale (ASUFC), Udine; <sup>3</sup>Unità 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<sup>1,2</sup>, A. Baragetti<sup>2,3</sup>, N. Jabnati<sup>2</sup>, A.M. Malvandi<sup>1</sup>, L. Grigore<sup>3</sup>, A.L. Catapano<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio di Dislipidemia Genetica ed Aterosclerosi, IRCCS MultiMedica, Milano; <sup>2</sup>Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano; <sup>3</sup>Centro 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. Macchi<sup>1</sup>, M.F. Greco<sup>1</sup>, C. Favero<sup>2</sup>, L. Vigna<sup>3</sup>, M. Buoli<sup>4,5</sup>, C.R. Sirtori<sup>1</sup>, A. Corsini<sup>1,6</sup>, V. Bollati<sup>2</sup>, M. Ruscica<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano; <sup>2</sup>EPIGET, Dipartimento di Scienze Cliniche e di Comunità, Università degli Studi di Milano; <sup>3</sup>Medicina del Lavoro, Fondazione Cà Granda, IRCCS Ospedale Maggiore Policlinico, Milano;

<sup>4</sup>Dipartimento di Fisiopatologia Medico-Chirurgica e dei Trapianti, Università degli Studi di Milano; <sup>5</sup>Dipartimento delle Neuroscienze e Salute Mentale, Fondazione Cà Granda, IRCCS Ospedale Maggiore Policlinico, Milano; <sup>6</sup>IRCCS, 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 $\gamma$ , C/EBP $\beta$  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 Dalt<sup>1</sup>, L. Castiglioni<sup>2</sup>, A. Baragetti<sup>1,7</sup>, M. Audano<sup>1</sup>, M. Svecla<sup>1</sup>, F. Bonacina<sup>1</sup>, S. Pedretti<sup>1</sup>, P. Uboldi<sup>1</sup>, P. Benzone<sup>3</sup>, F. Giannetti<sup>3</sup>, A. Barbuti<sup>3</sup>, F. Pellegatta<sup>4</sup>, S. Indino<sup>5</sup>, E. Donetti<sup>5</sup>, L. Sironi<sup>2,6</sup>, N. Mitro<sup>1</sup>, A.L. Catapano<sup>1,7</sup>, G.D. Norata<sup>1,4</sup>

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

<sup>4</sup>Centro SISA per lo Studio dell'Aterosclerosi, Ospedale Bassini, Cinisello Balsamo, Milano; <sup>5</sup>Department of Biomedical Science for Health, Università degli Studi di Milano; <sup>6</sup>IRCCS Centro Cardiologico Monzino, Milano; <sup>7</sup>IRCCS 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. Zarà<sup>1</sup>, J. Campodonico<sup>1</sup>, N. Cosentino<sup>1</sup>, M. Biondi<sup>1</sup>, P. Amadio<sup>1</sup>, G. Milanese<sup>2</sup>, E. Assanelli<sup>1</sup>, S. Cerri<sup>3</sup>, M. Biggiogera<sup>2</sup>, L. Sandrini<sup>1</sup>, C.C. Tedesco<sup>1</sup>, F. Veglia<sup>1</sup>, D. Trabattoni<sup>1</sup>, F. Blandini<sup>3</sup>, E. Tremoli<sup>1</sup>, G. Marenzi<sup>1</sup>, S.S. Barbieri<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro Cardiologico Monzino IRCCS, Milano;

<sup>2</sup>University of Pavia, "L. Spallanzani", Pavia; <sup>3</sup>Mondino 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. Greco<sup>1</sup>, C. Macchi<sup>1</sup>, L. Cantone<sup>2</sup>, M. Hoxha<sup>2</sup>, C. Banfi<sup>3</sup>, F. Zimetti<sup>4</sup>, M.P. Adorni<sup>4</sup>, I. Giusti<sup>5</sup>, V. Dolo<sup>5</sup>, A. Corsini<sup>1</sup>, C.R. Sirtori<sup>1</sup>, V. Bollati<sup>2</sup>, N. Ferri<sup>6</sup>, M. Ruscica<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano; <sup>2</sup>EPIGET Dipartimento di Scienze Cliniche e di Comunità, Università degli Studi di Milano; <sup>3</sup>Centro Cardiologico Monzino, IRCCS, Milano;

<sup>4</sup>Dipartimento di Scienze degli Alimenti e del Farmaco, Università degli Studi di Parma; <sup>5</sup>Dipartimento di Medicina Clinica, Sanità Pubblica, Scienze della Vita e dell'Ambiente, Università degli Studi dell'Aquila; <sup>6</sup>Dipartimento 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  $\alpha$  (circa 28 volte), IL-1 $\beta$  (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<sup>1,2</sup>, L. Redaelli<sup>2</sup>, R. Domenighini<sup>2</sup>, C. Tidone<sup>2</sup>, L. Grigore<sup>2,3</sup>, F. Pellegatta<sup>2,3</sup>, P. Magni<sup>1,3</sup>, A.L. Catapano<sup>1,3</sup>, A. Baragetti<sup>1,3</sup>

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

<sup>3</sup>IRCCS 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:  $3.34\pm 0.12$ ; T2:  $3.46\pm 0.10$ ; T3:  $3.62\pm 0.10$ ;  $p=0.213$ ), di linfociti (T1:  $2.12\pm 0.09$ ; T2:  $1.99\pm 0.08$ ; T3:  $1.95\pm 0.07$ ;  $p=0.318$ ) e di hsCRP (T1:  $0.22\pm 0.03$ ; T2:  $0.18\pm 0.03$ ; T3:  $0.25\pm 0.03$ ;  $p=0.248$ ). 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. Xie<sup>1</sup>, F. Galimberti<sup>1,2</sup>, E. Olmastroni<sup>1</sup>, M. Casula<sup>1,2</sup>, A.L. Catapano<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Epidemiology and Preventive Pharmacology Service (SEFAP), Department of Pharmacological and Biomolecular Sciences, University of Milan; <sup>2</sup>IRCCS 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<sup>1,2</sup>, M.M. Coronelli<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Medicina Interna e Terapia Medica, Università degli Studi di Pavia; <sup>2</sup>Studio 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. Molari<sup>1</sup>, E. Olmastroni<sup>2</sup>, N. De Beni<sup>2</sup>, O. Colpani<sup>2</sup>, F. Galimberti<sup>2</sup>, M. Gazzotti<sup>2</sup>, A. Zamboni<sup>1,3</sup>, A.L. Catapano<sup>1,2</sup>, M. Casula<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>IRCCS Multimedica, Sesto San Giovanni, Milano; <sup>2</sup>Department of Pharmacological and Biomolecular Sciences, Epidemiology and Preventive Pharmacology Service (SEFAP), University of Milan; <sup>3</sup>Department 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<sup>1,2</sup>, M. Casula<sup>1,2</sup>, E. Olmastroni<sup>2</sup>, A.L. Catapano<sup>1,2</sup>, E. Tragni<sup>2</sup>

<sup>1</sup>IRCCS Multimedica, Sesto S. Giovanni, Milano; <sup>2</sup>Servizio 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 ( $\geq 40$  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. Bellini<sup>1</sup>, F. Bonacina<sup>1</sup>, A.L. Catapano<sup>1,2</sup>, M. Gomaschi<sup>3</sup>, G.D. Norata<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano; <sup>2</sup>IRCCS MultiMedica, Sesto S. Giovanni, Milano; <sup>3</sup>Centro Grossi Paoletti, Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano; <sup>4</sup>Centro 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. Passarelli<sup>1</sup>, A. Parfait Atchan Nwakiban<sup>2</sup>, L. Da Dalt<sup>1</sup>, T. Nur Demirci<sup>1</sup>, S. Piazza<sup>1</sup>, E. Sangiovanni<sup>1</sup>, G. Martinelli<sup>1</sup>, A. Deutou Tchamgoue<sup>3</sup>, G. Agbor Agbor<sup>3</sup>, J.-R. Kuitat<sup>2</sup>, G.D. Norata<sup>1</sup>, M. Dell'Agli<sup>1</sup>, M. Daglia<sup>4</sup>, P. Magni<sup>1,5</sup>

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

<sup>3</sup>Institute of Medical Research and Medicinal Plants Studies (IMPM), Yaoundé, Cameroon; <sup>4</sup>Department of Pharmacy, Nutraceutical Lab, University of Naples Federico II, Naples; <sup>5</sup>International Research Center for Food Nutrition and Safety, Jiangsu University, Zhenjiang, China; <sup>5</sup>IRCCS 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 Xylopiopsis parviflora, Monodora myristica, Zanthoxylum leprieurii, Xylopiopsis 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, Xylopiopsis parviflora, Echinops giganteus e Dichrostachys glomerata hanno notevolmente ridotto la produzione di ROS nelle cellule SW872 dopo trattamento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 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. Bordonaro<sup>1</sup>, S. Mazza<sup>1</sup>, A. Granata<sup>1</sup>, E. Frisa<sup>1</sup>, F. Di Vincenzo<sup>2</sup>, P. Sperandeo<sup>2</sup>, A. Polissi<sup>2</sup>, A. Corsini<sup>1,3</sup>, L. Arnaboldi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio di Farmacologia Cellulare dell'Aterosclerosi;

<sup>2</sup>Laboratorio di Microbiologia Molecolare, Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari DISFeB, Università degli Studi di Milano; <sup>3</sup>IRCCS 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 20-200µg/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 µg/ml) e riso rosso fermentato (0,1-1 µM 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. Ligorio<sup>1</sup>, M. Audano<sup>1</sup>, S. Pedretti<sup>1</sup>, F. Gualdrini<sup>2</sup>, S. Polletti<sup>2</sup>, M. Russo<sup>2</sup>, S. Ghisletti<sup>2</sup>, M. Crestani<sup>1</sup>, D. Caruso<sup>1</sup>, E. De Fabiani<sup>1</sup>, N. Mitro<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*DiSFeB, Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano;*

<sup>2</sup>*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 (nmolO<sub>2</sub>: 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. Bonacina<sup>1</sup>, M. Audano<sup>1</sup>, S. Pedretti<sup>1</sup>, S. Stucchi<sup>1</sup>, D. Caruso<sup>1</sup>, A.L. Catapano<sup>1,2</sup>, N. Mitro<sup>1</sup>, G.D. Norata<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>*Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano;*

<sup>2</sup>*IRCSS Multimedica, Milano;*

<sup>3</sup>*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. Olmastroni<sup>1</sup>, B.A. Ference<sup>2</sup>, Q. Guo<sup>2</sup>, D.L. Bhatt<sup>3</sup>, N.J. Samani<sup>4,5</sup>, K.K. Ray<sup>6</sup>, S.J. Nicholls<sup>7</sup>, T.B. Ference<sup>2</sup>, F. Galimberti<sup>1,8</sup>, G.D. Smith<sup>9</sup>, M.V. Holmes<sup>10</sup>, C. Baigent<sup>10</sup>, S.E. Nissen<sup>11</sup>, C.T. Ruff<sup>12</sup>, M.S. Sabatine<sup>12</sup>, A.L. Catapano<sup>1,8</sup>, N. Sattar<sup>13</sup>, J.E. Deanfield<sup>14</sup>

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