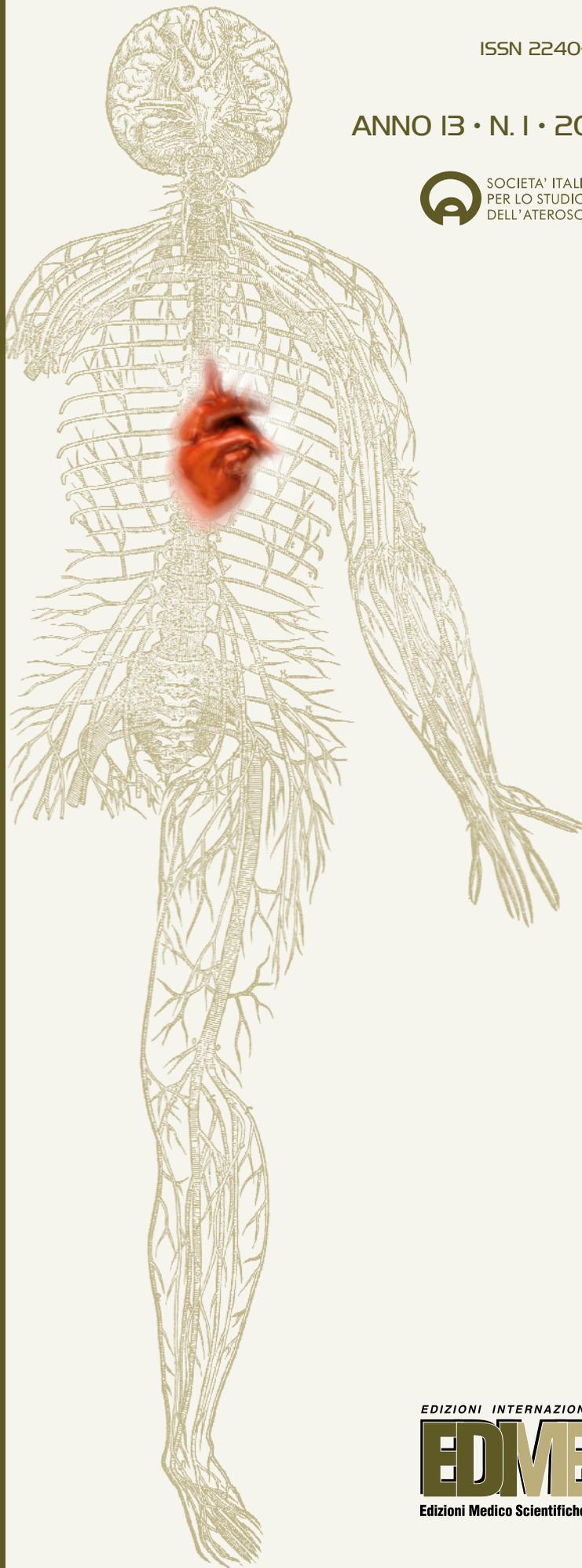


GIORNALE ITALIANO dell'ARTERIOSCLEROSI



ISSN 2240-4821

ANNO 13 • N. 1 • 2022

 SOCIETÀ ITALIANA
PER LO STUDIO
DELL'ARTERIOSCLEROSI

EDIZIONI INTERNAZIONALI s.r.l.

EDMES

Edizioni Medico Scientifiche - Pavia



Rivista ufficiale della Società Italiana
per lo Studio dell'Aterosclerosi (SISA)

Direttori emeriti

M. Averna
G. Crepaldi
R. Fellin
E. Mannarino
E. Manzato
A. Mezzetti
G.F. Salvioli
A. Ventura

Direttore scientifico

M. Arca (Roma)

Editore

L. Cattin (Trieste)

Vice Editore

F. Angelico (Roma)

Responsabili di area

Review e Linee Guida – D. Sommariva (Milano)
Ricerca e Farmacologia – G.D. Norata (Milano)
Studi Clinici – M. Pirro (Perugia)
Epidemiologia – S. Panico (Napoli)

Comitato di Redazione

A. Baragetti (Milano)
C.M. Barbagallo (Palermo)
A. Belfiore (Bari)
F. Bonacina (Milano)
M. Casula (Milano)
M. Del Ben (Roma)
O. Guardamagna (Torino)
M.R. Mannarino (Perugia)
T. Montalcini (Catanzaro)
L. Pisciotta (Genova)
A. Poli (Milano)
T. Sampietro (Pisa)
R. Sarzani (Ancona)
G.B. Vigna (Ferrara)
A. Zambon (Padova)

Segreteria editoriale

V. Flores d'Arcais
E. Loggia
R. Zecca

Via Balzaretti, 7 - 20133 Milano
E-mail: giornalearteriosclerosi@sisa.it

In copertina: De Humani Corporis Fabrica
di Andreas Vesalius (Basilea, 1543)

Anno 13 • N. 1 • 2022

SOMMARIO

■ COVID-19

SARS-CoV-2 ed endotelio: una interazione catastrofica 5

SARS-CoV-2 and endothelium: a catastrophic interaction

*Vanessa Bianconi, Elena Cosentini, Filippo Figorilli,
Massimo R. Mannarino*

■ FATTORI DI RISCHIO

**Effetti della sigaretta a tabacco riscaldato non bruciato
sulla disfunzione endoteliale e l'attivazione piastrinica 22**

**Effects of heated unburned tobacco cigarette on endothelial
dysfunction and platelet activation**

*Lorenzo Loffredo, Alessia Fallarino, Giulia Graziano,
Aurora Paraniñfi, Cristina Nocella, Vittoria Cammisotto,
Simona Bartimoccia, Roberto Carnevale*

■ FISIOPATOLOGIA DELL'ATEROSCLEROSI

**Ruolo dei recettori delle chemochine infiammatorie
nell'aterosclerosi 33**

**Role of inflammatory chemokine receptors
in atherosclerosis**

*Elisabetta Caiazza, Danila Gurgone, Armando Ialenti,
Pasquale Maffia*

■ TERAPIA

**Aderenza alla terapia ipolipemizzante: problemi
e possibili soluzioni 44**

**Adherence to hypolipidic therapy: problems and possible
solutions**

Maria Del Ben, Francesco Baratta, Francesco Angelico

■ MEDICINA SCIENZA E SOCIETÀ

LDL Elettronegative: intervista al Dott. Gabriele Bittolo Bon 53
LDL electronegatives: interview with dr. Gabriele Bittolo Bon

EDIZIONI INTERNAZIONALI srl

EDIMES

Edizioni Medico Scientifiche - Pavia

Edizioni Internazionali srl

Divisione EDIMES
EDIZIONI MEDICO SCIENTIFICHE - PAVIA
Via Riviera 39 - 27100 Pavia
Tel. 0382526253 r.a. - Fax 0382423120
E-mail: edint.edimes@tin.it



Consiglio Direttivo SISA

Marcello Arca - *Presidente*
Carlo M. Barbagallo
Anna Belfiore
Marco Bucci
Giulia Chiesa
Giuliana Fortunato
Luigi Gentile
Patrizia Tarugi
Maria Grazia Zenti
Enzo Manzato - *Past President*
Matteo Pirro - *Segretario*

Presidenti Sezioni Regionali SISA

Francesco Cipollone (Adriatica)
Piero Portincasa (Appulo-Lucana)
Arcangelo Iannuzzi (Campania)
Angelina Passaro (Emilia-Romagna)
Maria Del Ben (Lazio)
Alberico L. Catapano (Lombardia)
Livia Pisciotta (Piemonte-Liguria-Valle d'Aosta)
Mauro Mantega (Sardegna)
Angelo Baldassare Cefalù (siculo-calabra)
Tiziana Sampietro (Toscana)
Marcello Rattazzi (triveneto)
Massimo R. Mannarino (Umbria)



SOCIETÀ ITALIANA
PER LO STUDIO
DELL'ARTERIOSCLEROSI

Società Italiana per lo Studio dell'Aterosclerosi

Viale Maresciallo Pilsudski, 118
00197 Roma

Autorizzazione Trib. di Milano n. 242
del 21/09/2016

Direttore Responsabile: P. E. Zoncada

Norme editoriali

Pubblicità/Abbonamenti

Redazione GIA
Via Balzaretti, 7
20133 Milano
Tel. 0249636373
Fax 0249633384
E-mail: giornalearteriosclerosi@sisa.it

Condizioni di abbonamento

Canone per l'Italia € 65,00, per l'estero € 75,00.

Periodicità

Trimestrale

Scopi

Il "Giornale Italiano dell'Arteriosclerosi" (GIA), è un periodico di aggiornamento che nasce come servizio per i medici, operatori sanitari e studenti di medicina e delle professioni sanitarie, con l'intenzione di rendere più facilmente disponibili informazioni e revisioni critiche nel campo dell'arteriosclerosi e delle malattie ad essa correlate.

Lo scopo della rivista è quello di assistere il lettore fornendogli:

- revisioni critiche di argomenti di grande rilevanza nel campo dell'arteriosclerosi sia per quanto riguarda gli aspetti di base che gli aspetti clinico-applicativi;
- quesiti relativi agli argomenti trattati per una verifica di auto apprendimento;
- opinioni di esperti qualificati sui nuovi sviluppi delle conoscenze sull'arteriosclerosi;
- lavori originali relativi ad aspetti di ricerca sanitaria nell'ambito dell'arteriosclerosi e delle malattie ad essa correlate.

TIPOLOGIA E STRUTTURA DEGLI ARTICOLI

GIA accetta le seguenti categorie di contributi: lavori originali, rassegne, casi clinici e forum dei lettori. Titolo e, se previsti, parole chiave e sommario dovranno essere sia in italiano che in inglese.

Le tabelle dovranno pervenire in formato editabile (word, excel, txt, ecc...).

Le figure dovranno essere inviate oltre al formato originario anche in formato grafico (pdf, jpg, png, ecc...).

Lavori originali

I lavori originali saranno sottoposti a processo di "peer review". La lunghezza del testo non deve superare le 4.000 parole (esclusa la bibliografia)

ma incluso l'abstract, con un massimo di 4 figure o tabelle. Il frontespizio dovrà contenere:

- 1) Titolo
 - 2) Autori e loro affiliazione
 - 3) Nome e affiliazione dell'autore corrispondente.
- **Sommario:** dovrà essere strutturato (premesse, obiettivi, metodi, risultati, conclusioni) e non dovrà superare le 250 parole.
- **Parole chiave:** Si raccomanda di indicare 4-6 parole chiave.
- **Testo:** Il corpo del testo dovrà comprendere: a) Introduzione b) Materiali e metodi c) Risultati d) Discussione e) Tavole f) Figure g) Bibliografia.

Bibliografia

Citazione di articoli su riviste: Es. 1: Austin MA, Hutter CM, Zimmern RL, Humphries SE. Familial hypercholesterolemia and coronary heart disease. *Am J Epidemiol* 160: 421-429, 2004. Es. 2: Humphries SE, Whittall RA, Hubbart CS et al. Genetic causes of familial hypercholesterolemia in patients in the UK: a relation to plasma lipid levels and coronary heart disease risk. *J Med Genet* 43: 943-949, 2006

Citazioni di capitoli di libri Assmann G, von Eckardstein A, Brewer H. Familial anaphalipoproteinemia: Tangier disease. In "The metabolic and molecular bases of inherited disease", Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle I, eds, 8th ed. New York, McGraw-Hill, 2001; 2937-60.

Rassegne

Il frontespizio dovrà contenere:

- 1) Titolo;
- 2) Autori e loro affiliazione;
- 3) Nome e affiliazione dell'autore corrispondente.

La lunghezza del testo non deve superare di norma le 5.000 parole, incluso, sommario, glossario, e l'elenco puntato degli argomenti affrontati (bullet points). Il numero massimo di figure e tabelle è 5. Il numero massimo di voci bibliografiche è 50.

Le rassegne devono includere in appendice un questionario di auto-apprendimento relativo all'argomento affrontato nella rassegna.

- **Sommario:** non dovrà superare le 250 parole.
- **Parole chiave:** Si raccomanda di indicare 4-6 parole chiave.
- **Testo:** L'autore è invitato a suddividere la rassegna in capitoli e sotto-capitoli.

Al termine del testo è opportuno inserire un capitolo dedicato alle prospettive future con particolare riferimento agli aspetti clinico-applicativi.

Glossario: È uno strumento di comunicazione fortemente raccomandato.

Esso dovrebbe contenere una concisa ma esauriente spiegazione dei termini "nuovi o meno comuni" utilizzati nella rassegna. Qualora l'autore lo ritenga utile, al glossario può essere allegata una o più "finestre esplicative" dedicate ad argomenti a cui si fa riferimento nella rassegna e che non sono discussi in sufficiente dettaglio nel corpo del testo.

Elenco degli argomenti trattati: A conclusione della rassegna l'autore è invitato a fornire un conciso elenco puntato degli aspetti più rilevanti affrontati.

Bibliografia: Le citazioni bibliografiche dovranno essere numerate secondo l'ordine di comparsa nel testo. Le pubblicazioni citate dovranno contenere il nome di tutti gli autori (fino a un massimo di 4). Nel caso gli autori fossero più di quattro, si mette dopo il terzo autore la scritta et al.

Questionario di auto-apprendimento: Per ogni rassegna il questionario dovrà contenere 5-10 domande con risposta a scelta multipla.

Casi clinici

Si riferisce alla presentazione di un caso clinico, preparato su richiesta da medici esperti, che ha lo scopo di rafforzare standard di comportamento clinico, diagnostico e/o terapeutico, basati sulle evidenze.

Forum su Medicina, Scienza e Società

Si tratta di articoli brevi o lettere all'editore (1.500 parole) sollecitati ad esperti, riguardanti commenti e/o opinioni su temi di particolare attualità. Il testo non dovrà superare le 1.500 parole. Non è richiesto un sommario. Le voci bibliografiche non devono superare il numero di 10 e devono essere riportate come indicato per le rassegne.

NOTE PER GLI AUTORI

Il testo dell'articolo deve essere predisposto utilizzando il programma Microsoft Word per Windows o Macintosh. I dischetti devono riportare sull'apposita etichetta il nome del primo autore, il titolo abbreviato dell'articolo, il programma di scrittura e la versione, ed il nome del contenuto/file.

L'autore è tenuto ad ottenere l'autorizzazione di "Copyright" qualora riproduca nel testo tabelle, figure, microfotografie o altro materiale iconografico, già pubblicato altrove. Tale materiale illustrativo dovrà essere riprodotto con la dicitura "per concessione di..." seguito dalla citazione della fonte di provenienza.

PRESENTAZIONE DEL NUMERO

■ COVID-19

SARS-CoV-2 ed endotelio

Rassegna da leggere per comprendere il ruolo cruciale della disfunzione endoteliale nella progressione clinica dell'infezione da SARS-CoV-2.

SARS-CoV-2 and endothelium

Review to read to understand the crucial role of endothelial dysfunction in the clinical progression of SARS-CoV-2 infection.

■ Fattori di rischio

Effetti della sigaretta a tabacco riscaldato non bruciato sulla salute dei fumatori

Le sigarette a tabacco riscaldato non bruciato (HNBC) sono dispositivi di nuova generazione che riscaldano il tabacco a temperature che ne evitano la combustione e producono aerosol della nicotina e di altri composti chimici; sono ancora poco conosciuti gli effetti delle HNBC sulla salute dei fumatori.

Effects of heated unburned tobacco cigarette on the health of smokers

Unburned Heated Tobacco Cigarettes (HNBC) are new generation devices that heat tobacco to temperatures that prevent it from burning and aerosol nicotine and other chemical compounds; the effects of HNBC on the health of smokers are still poorly understood.

■ Fisiopatologia dell'aterosclerosi

Ruolo delle chemokine nell'aterosclerosi

La rete delle chemokine guida specificamente il *trafficking* delle cellule immunitarie durante l'infiammazione. Questo articolo riassume le sperimentazioni cliniche che riguardano le chemokine infiammatorie e propone alcune strategie sperimentali idonee a superare gli ostacoli al loro utilizzo terapeutico nelle malattie cardiovascolari.

Role of inflammatory chemokine receptors in atherosclerosis

The chemokine network specifically guides the trafficking of immune cells during inflammation. This article summarizes the clinical trials concerning inflammatory chemokines and proposes some suitable experimental strategies to overcome the obstacles to their therapeutic use in cardiovascular diseases.

■ Terapia

Aderenza alla terapia ipolipemizzante

La scarsa aderenza alle terapie croniche compromette gravemente l'efficacia del trattamento, caratterizzandosi come un elemento critico per la salute della popolazione sia dal punto di vista della qualità di vita che dell'economia sanitaria.

Adherence to hypolipemic therapy

Poor adherence to chronic therapies seriously compromises the effectiveness of the treatment, characterizing itself as a critical element for the health of the population both from the point of view of quality of life and health economics.

■ Medicina scienza e società

LDL elettronegative: intervista al dott. Gabriele Bittolo Bon

L'intervista vuole essere un doveroso riconoscimento all'attività di uno dei Centri italiani per lo Studio delle Dislipidemie più attivi a livello nazionale e al suo fondatore prof. Piero Avogaro, che ha rappresentato per decenni un punto di riferimento obbligatorio della ricerca lipidologica.

LDL electronegatives: interview with dr. Gabriele Bittolo Bon

The interview is a dutiful tribute to the activity of one of the most active Italian Centers for the Study of Dyslipidemias and to its founder prof. Piero Avogaro, who for decades has been a mandatory point of reference for lipidology research.

COVID-19

SARS-COV-2 ED ENDOTELIO: UNA INTERAZIONE CATASTROFICA

SARS-CoV-2 and endothelium: a catastrophic interaction

VANESSA BIANCONI, ELENA COSENTINI, FILIPPO FIGORILLI,
MASSIMO R. MANNARINO

*Struttura Complessa Medicina Interna, Dipartimento di Medicina e Chirurgia,
Università degli Studi di Perugia*

SUMMARY

Although it begins as a disease of the respiratory system, in some cases the SARS-CoV-2 infection can evolve as a multisystem disease with various manifestations of life-threatening organ damage. Endothelial dysfunction appears to play a crucial role in the clinical progression of SARS-CoV-2 infection. In particular, the current evidence regarding the interaction between SARS-CoV-2 infection and endothelium suggests, on the one hand, that endothelial dysfunction may be a consequence of the infection, secondary to the direct cytopathic effect of the virus and to the harmful effects of the immune-inflammatory response against infection, and, on the other hand, that the endothelial dysfunction itself, favoring the dysregulation of the immune-inflammatory response and coagulation homeostasis, may have an active role in promoting the evolution of the infection towards its most clinically severe forms. It therefore seems that endothelial dysfunction is at the center of a vicious circle capable of fueling pathophysiological processes that can ultimately lead to generalized microcirculatory incompetence, negatively affecting the prognosis of the infection. This review examines the mechanisms underlying the pathophysiological link between SARS-CoV-2 infection and endothelial dysfunction and discusses the role of endothelial dysfunction as a potential prognostic marker and therapeutic target in SARS-CoV-2 infection.

Keywords: SARS-CoV-2, COVID-19, infection, endothelium, endothelial dysfunction.

Introduzione

L'infezione da SARS-CoV-2 o *coronavirus disease 2019* (COVID-19), descritta per la prima volta nel dicembre 2019, rappresenta ancora oggi una causa rilevante di ospedalizzazione e mortalità su scala mondiale, nonostante l'ampia disponibilità di vaccini neutralizzanti e la diffusione di va-

Indirizzo per la corrispondenza

Vanessa Bianconi
Dipartimento di Medicina e Chirurgia
Università degli Studi di Perugia
Piazzale Menghini, 1 - 06132 Perugia
E-mail: vanessa.bianconi@unipg.it

Elenco degli argomenti trattati

- La disfunzione endoteliale svolge un ruolo fisiopatologico cruciale nell'infezione da SARS-CoV-2.
- Diversi marcatori di disfunzione endoteliale hanno un significativo potere prognostico nei confronti degli *outcome* clinici di disfunzione endoteliale.
- Alcune strategie terapeutiche con azione endotelio-protettiva sembrano avere un significativo ruolo coadiuvante nel trattamento dell'infezione da SARS-CoV-2.

rianti del virus con ridotta trasmissibilità e patogenicità (1, 2). Sebbene esordisca di fatto come un'infezione delle vie respiratorie, nelle sue forme clinicamente più gravi può presentarsi come una patologia multisistemica con variabile coinvolgimento extra-polmonare (3).

Secondo le evidenze emergenti, un possibile substrato fisiopatologico comune alle molteplici manifestazioni cliniche della malattia è rappresentato dalla disfunzione endoteliale. Da un lato, l'endotelio risulta infatti un possibile bersaglio dell'infezione da SARS-CoV-2. In particolare, quest'ultima sembra in grado di determinare la perdita dell'integrità anatomica e funzionale dell'endotelio attraverso una serie complessa di eventi, che comprendono l'effetto citopatico diretto del virus e gli effetti negativi indotti a livello dell'endotelio stesso dall'attivazione della risposta immuno-infiammatoria contro l'infezione (4, 5). Al tempo stesso però, l'endotelio danneggiato e disfunzionale, promuovendo l'attivazione della cascata coagulativa e favorendo a sua volta una risposta immuno-infiammatoria abnorme e disregolata, sembra anche svolgere un ruolo attivo nel promuovere l'evoluzione dell'infezione verso le sue forme clinicamente più gravi (4, 5). Risulta pertanto verosimile l'esistenza di una relazione bidirezionale tra disfunzione endoteliale e COVID-19, potenzialmente in grado di alimentare un circolo vizioso che alla fine può condurre ad incom-

petenza funzionale del microcircolo e danno d'organo multisistemico.

Alla luce di tali presupposti fisiopatologici, è emerso un crescente interesse verso il potenziale ruolo prognostico di diversi marcatori di disfunzione endoteliale nei confronti dell'evoluzione clinica dell'infezione (6). Al tempo stesso è stata rivolta grande attenzione all'identificazione di strategie endotelio-protettive potenzialmente utili nel trattamento dell'infezione (4, 5).

In questa rassegna vengono esaminati i meccanismi biologici sottostanti il nesso fisiopatologico tra disfunzione endoteliale e COVID-19, viene discussa la potenziale utilità prognostica di diversi marcatori di disfunzione endoteliale, e vengono illustrate le più attuali evidenze circa l'impatto clinico di alcune strategie terapeutiche potenzialmente in grado di mitigare la disfunzione endoteliale in corso di infezione da SARS-CoV-2.

Anatomia e fisiologia dell'endotelio

In condizioni fisiologiche, l'endotelio costituisce un'estesa interfaccia anatomica tra il circolo ematico e i diversi tessuti; si stima che lo strato di cellule endoteliali che riveste il lume di arterie, vene e capillari misuri in totale circa 7.000 m² di superficie in un soggetto adulto (7). Al tempo stesso l'endotelio rappresenta un importante regolatore di diversi meccanismi omeostatici dell'organismo (*e.g.*, equilibrio tra stimoli proinfiammatori e antinfiammatori, protrombotici ed antitrombotici, vasodilatatori e vasoconstrictori, ossidanti ed antiossidanti) (4, 5) (*Figura 1*).

L'integrità della barriera endoteliale è garantita dalla stretta adesione tra le cellule endoteliali principalmente attraverso le giunzioni intercellulari, il glicocalice e i recettori Tie2. Le due principali tipologie di giunzioni intercellulari che permettono la

connessione tra le cellule endoteliali sono:

- 1) le giunzioni aderenti endotelio-specifiche, costituite dalle caderine dell'endotelio vascolare (VE-caderine);
- 2) le giunzioni occludenti, costituite da specifiche proteine integrali di membrana (*i.e.*, claudine e occludine) (7).

Il glicocalice è un reticolo molecolare di circa 400 nm di spessore che riveste la superficie dell'endotelio, costituito da proteoglicani e glicosaminoglicani secreti dalle cellule endoteliali. Esso rappresenta un ostacolo per l'adesione di molecole circolanti alla superficie endoteliale oltre che

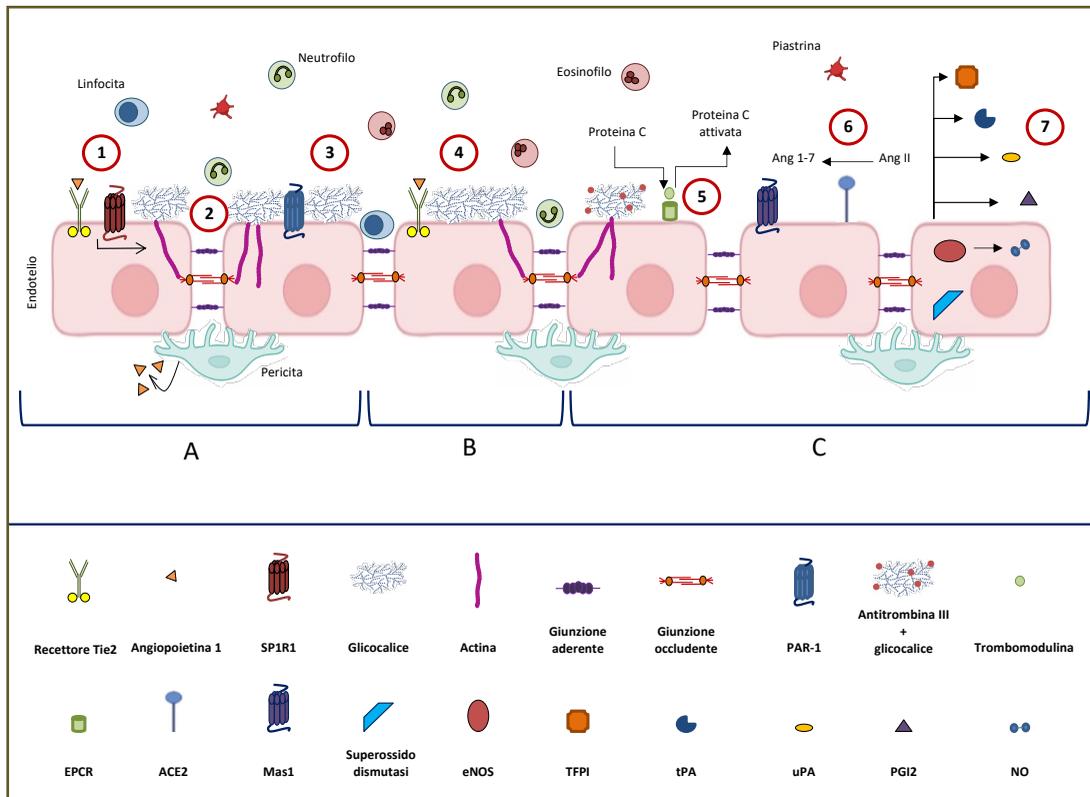


Figura I - Anatomia e fisiologia dell'endotelio.

Pannello A. La funzione di barriera dell'endotelio è mediata da diverse molecole. Le vie del segnale attivate da SP1R1, PAR-1 e recettori Tie2 promuovono stimoli endotelio-protettivi contribuendo all'integrità endoteliale (1). Le giunzioni aderenti e le giunzioni occludenti garantiscono la coesione intercellulare (2). Il glicocalice, composto da un intreccio di proteoglicani e glicosaminoglicani, limita il contatto tra molecole plasmatiche ed endotelio e al tempo stesso stabilizza il citoscheletro della cellula endoteliale (3). **Pannello B.** La funzione immunoregolatoria dell'endotelio è principalmente mediata dai recettori Tie2, che inibiscono il segnale a cascata di NF- κ B, STAT3, MyD88, e MAPK, contrastando la produzione di mediatori pro-infiammatori (4). **Pannello C.** L'endotelio promuove l'omeostasi coagulativa attraverso l'attivazione dell'antitrombina III da parte del glicocalice, l'attivazione della proteina C da parte della trombomodulina legata ad EPCR (5), e l'attivazione del segnale antitrombotico di Mas1 sotto lo stimolo di Ang 1-7, a sua volta risultante dalla conversione di Ang II da parte di ACE2 (6). L'endotelio produce inoltre numerosi fattori implicati nel processo di fibrinolisi (*i.e.*, TFPI, tPA, uPA, e PGI2), nella regolazione della vasodilatazione (*i.e.*, NO), e dell'equilibrio tra ossidazione e antiossidazione (*i.e.*, superossido dismutasi) (7).

Acronimi. ACE2, angiotensin-converting enzyme 2; Ang 1-7, angiotensin (1-7); Ang II, angiotensina II; eNOS, endothelial nitric oxide synthase; EPCR, endothelial protein C receptor; NF- κ B, nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells; NO, ossido nitrico; PAR-1, protease-activated receptor-1; PGI2, prostaglandina I2; SP1R1, sphingosine-1-phosphate receptor 1; TFPI, tissue factor pathway inhibitor; tPA, tissue plasminogen activator; uPA, urokinase plasminogen activator.

per la permeabilità transendoteliale di proteine plasmatiche e liquidi; inoltre, può fungere da meccanolettore in grado di promuovere, sotto lo stimolo del flusso ematico, la riorganizzazione citoscheletrica delle cellule endoteliali e la conseguente attivazione di vie di segnale intracellulari con azione citoprotettiva (8).

I recettori Tie2, sotto lo stimolo di angiopoietina-1, attivano vie del segnale che portano alla stabilizzazione delle giunzioni intercellulari e dei filamenti di actina in prossimità della superficie citoplasmatica della cellula endoteliale, svolgendo anch'essi un ruolo fondamentale nel mantenimento dell'integrità della barriera endoteliale (9). Analogamente, l'attivazione di altri recettori espressi sulla superficie delle cellule endoteliali [e.g., *protease activated receptor type 1* (PAR-1) e *sphingosine-1-phosphate receptor 1* (SP1R1)] concorre a garantire l'integrità delle cellule endoteliali attraverso l'induzione di diversi meccanismi molecolari endotelio-protettivi (10, 11).

La funzione immunomodulante e antinfiammatoria svolta dall'endotelio anatomicamente integro e funzionalmente sano è mediata da diverse molecole di superficie, tra cui i proteoglicani del glicocalice e i recettori Tie2 (12). In particolare, le molecole del glicocalice costituiscono una barriera che limita l'interazione tra i mediatori dell'infiammazione e i leucociti circolanti da un lato e la cellula endoteliale dall'altro. Invece, i recettori Tie2, sotto lo stimolo di angiopoietina-1, attivano vie del segnale che portano ad una ridotta espressione di mediatori dell'infiammazione.

Alla base dell'omeostasi coagulativa promossa dall'endotelio vi sono una serie di complesse interazioni tra molecole della superficie endoteliale e proteine plasmatiche. Nel dettaglio, il glicocalice, composto da diversi proteoglicani, tra cui l'eparan solfato, è in grado di legare e attivare l'an-

titrombina III, esercitando un'azione antitrombotica (12). L'attivazione dei recettori Tie2 da parte di angiopoietina-1 determina ridotta espressione e attività del fattore tissutale (TF), potente agente pro-trombotico (12). L'interazione tra trombomodulina ed *endothelial cell protein C receptor* (EPCR) facilita la conversione della proteina C nella sua forma attivata, promuovendo l'attivazione dell'asse antitrombotico proteina C-proteina S (12). Il recettore *angiotensin-converting enzyme 2* (ACE2) determina la conversione di angiotensina II (Ang II) in angiotensina (1-7) che a sua volta attiva il recettore Mas1, inducendo un'azione antitrombotica (13).

L'endotelio produce inoltre una serie di molecole coinvolte nella regolazione della fibrinolisi, tra cui *tissue factor pathway inhibitor* (TFPI) (14), *tissue plasminogen activator* (tPA) e *urokinase plasminogen activator* (uPA) (15).

Al tempo stesso, l'attività delle cellule endoteliali è cruciale nell'inibizione dell'attivazione piastrinica attraverso diversi meccanismi, tra cui l'espressione di CD39 e la secrezione di prostaglandina I₂ (PGI₂) (12).

Altre importanti funzioni fisiologiche dell'endotelio includono la regolazione dell'equilibrio tra vasocostrizione e vasodilatazione arteriosa e la regolazione dell'equilibrio tra stress ossidativo e anti-ossidazione. In particolare, in condizioni omeostatiche le cellule endoteliali promuovono la vasodilatazione tonica delle arterie attraverso la conversione di L-arginina in ossido nitrico (NO) mediata dall'enzima *endothelial nitric oxide synthase* (eNOS) (4, 5). Inoltre, producono e secernono PGI₂ che, oltre ad esercitare un'azione antiaggregante, agisce anche come un potente stimolo vasodilatatorio. Al tempo stesso, esprimono enzimi che hanno un ruolo chiave nella neutralizzazione delle specie reattive dell'ossigeno, come superossido dismutasi,

glutazione perossidasi ed eme ossigenasi (4, 5).

Relazione tra infezione da SARS-CoV-2 e disfunzione endoteliale

La relazione tra infezione da SARS-CoV-2 e disfunzione endoteliale sembra complessa e i meccanismi biologici che ne sono alla base risultano molteplici.

In primo luogo, l'endotelio sembra subire un danno diretto da parte di SARS-CoV-2. Come ormai noto, l'ingresso del virus nelle cellule bersaglio è mediato dal recettore ACE2 e dal corecettore *transmembrane serine protease 2* (TMPRSS2), entrambi espressi anche a livello delle cellule endoteliali (16). Sebbene alcuni studi suggeriscano che l'espressione di tali recettori sulla superficie delle cellule endoteliali sia insufficiente a mediare l'infezione delle cellule endoteliali da parte di SARS-CoV-2 (4), mettendo quindi in dubbio che l'endotelio possa rappresentare un bersaglio dell'infezione da SARS-CoV-2, altri studi dimostrano invece la capacità del virus di infettare attivamente le cellule endoteliali. In particolare, studi di microscopia elettronica condotti su campioni istologici di polmoni ottenuti da pazienti deceduti per COVID-19 hanno dimostrato la presenza di particelle di SARS-CoV-2 all'interno delle cellule endoteliali peri-alveolari (4). Inoltre, è stata dimostrata la presenza di RNA virale all'interno delle cellule endoteliali di capillari umani di organi esposti a SARS-CoV-2 (4). Non è da escludere quindi che l'infezione delle cellule endoteliali da parte di SARS-CoV-2 possa essere mediata anche da recettori diversi da ACE2 e TMPRSS2 [e.g., neuropilina 1 (NRP1), *scavenger receptor class B type 1* (SR-B1) e CD147] (4). Inoltre, è verosimile che la liberazione in circolo di *pathogen associated molecular patterns* (PAMPs), composti da frammenti

di RNA e proteine virali, possa portare all'attivazione di diversi *toll-like-receptors* (TLRs) e *NOD-like receptors* (NLRs) presenti sulla superficie delle cellule endoteliali, attivando la via del segnale di *nuclear factor kappa-B* (NF- κ B) che ha un ruolo cruciale nell'induzione della disfunzione endoteliale (4).

In secondo luogo, numerose evidenze suggeriscono che la disfunzione endoteliale che si osserva in corso di infezione da SARS-CoV-2 possa essere una conseguenza della risposta immuno-infiammatoria indotta dall'infezione stessa. In corso di infezione da SARS-CoV-2, l'attivazione della risposta immunitaria può infatti esporre l'endotelio all'azione di diverse citochine pro-infiammatorie le quali possono indurre attivazione endoteliale [aumentata espressione di molecole di adesione quali *intercellular adhesion molecule 1* (ICAM-1), *vascular cell adhesion protein 1* (VCAM-1), P-selectina ed E-selectina), che a sua volta può facilitare la chemiotassi e l'extravasazione leucocitaria (5). Inoltre, in presenza di stimoli infiammatori i recettori Tie2 inibiscono le vie del segnale che regolano negativamente l'espressione di fattori di trascrizione pro-infiammatori come NF- κ B (17). Complessivamente, ne deriva la perdita della capacità fisiologica dell'endotelio di contrastare l'infiammazione. Al tempo stesso l'infiammazione può indurre a livello delle cellule endoteliali una ridotta espressione e/o attività dell'enzima eNOS, una rapida inattivazione di NO ed una accentuata conversione di NO in perossinitrato, un potente pro-ossidante (4, 5); tutto ciò si può tradurre nella perdita delle diverse funzioni omeostatiche dell'endotelio mediate da NO. Inoltre, diversi stimoli infiammatori promuovono l'attivazione della via classica del complemento che a sua volta aumenta l'espressione del fattore di von Willebrand (vWF) a livello delle cellule en-

doteliali, favorendo la disregolazione dell'omeostasi coagulativa (4, 5). Per di più, l'attivazione dei recettori Tie2 da parte di angiopoietina 2, la cui espressione è aumentata in corso di infiammazione, contribuisce a determinare un fenotipo endoteliale pro-trombotico (4, 5). Infine, la reiterata esposizione delle cellule endoteliali a stimoli infiammatori ne può indurre danno e morte per piroptosi, compromettendo la funzione di barriera dell'endotelio (4).

Numerose evidenze suggeriscono però che la disfunzione endoteliale possa a sua volta favorire i meccanismi fisiopatologici che determinano l'evoluzione dell'infezione da SARS-CoV-2 verso le sue forme clinicamente più gravi (4, 5). Le cellule endoteliali attivate dagli stimoli infiammatori possono infatti a loro volta secernere citochine proinfiammatorie contribuendo a promuovere una risposta immunitaria abnorme e non controllata (4, 5). Per di più il rilascio in circolo di *damage-associated molecular patterns* (DAMPs), costituiti da frammenti di cellule endoteliali, promuove l'attivazione della via del segnale di NF-κB, che ha un ruolo cruciale nell'attivazione della risposta infiammatoria (4). Inoltre, l'accumularsi di neutrofilii nel sito di infiammazione, facilitato dalla disfunzione endoteliale, si può associare ad un abbondante rilascio di *neutrophil extracellular traps* (NETs) nell'ambiente extracellulare (4, 5); tali agglomerati di materiale nucleare e proteine citoplasmatiche sono in grado di esercitare una significativa azione pro-infiammatoria e pro-trombotica risultando determinanti nell'induzione della cosiddetta immunotrombosi, tappa fisiopatologica cruciale nell'evoluzione clinica dell'infezione da SARS-CoV-2 nelle sue forme clinicamente più gravi (18).

Alla luce di quanto detto risulta plausibile che la relazione tra infezione da SARS-CoV-2 e disfunzione endoteliale sia bidire-

zionale e che possa promuovere un circolo vizioso potenzialmente in grado di esitare in disfunzione microcircolatoria generalizzata e danno d'organo multisistemico.

Disfunzione endoteliale e manifestazioni cliniche dell'infezione da SARS-CoV-2

L'infezione da SARS-CoV-2 presenta un'ampia varietà di possibili manifestazioni cliniche polmonari ed extra-polmonari, con uno spettro di gravità estremamente eterogeneo che va dall'infezione asintomatica a forme potenzialmente fatali quali l'*acute distress respiratory syndrome* (ARDS) e l'insufficienza multiorgano. Secondo le linee guida per la gestione clinica del COVID-19 proposte dal *National Institute of Health* (NIH) si possono distinguere cinque fenotipi di gravità clinica della malattia (*i.e.*, forma asintomatica, forma lieve, forma moderata, forma grave, e forma critica) a seconda della presenza e dell'entità di segni clinici, laboratoristici e radiologici di polmonite e danno d'organo multisistemico (3).

Sebbene molti aspetti biologici dell'infezione da SARS-CoV-2 restino ancora dubbi, numerosi studi hanno permesso di raggiungere un'approfondita comprensione del ruolo della disfunzione endoteliale nel condizionare la presentazione clinica dell'infezione (19). In particolare, le evidenze disponibili suggeriscono che la compromissione dell'integrità anatomica e funzionale dell'endotelio possa rappresentare un momento cruciale nella transizione dell'infezione da SARS-CoV-2 verso forme cliniche gravi/critiche con manifestazioni multisistemiche (20).

A livello polmonare, la compromissione microcircolatoria promossa dall'interazione sfavorevole tra infezione e disfunzione endoteliale si può tradurre in microtrom-

bosi capillare e danno della barriera alveolo-capillare, con accumulo di essudato inizialmente a livello interstiziale e successivamente anche a livello alveolare. Il correlato clinico-radiologico di tali alterazioni è rappresentato inizialmente dalla comparsa di polmonite interstiziale e successivamente dalla comparsa di addensamenti bilaterali multifocali e ARDS (12) (Figura 2).

A livello dell'apparato cardiovascolare il danno anatomico e l'incompetenza funzionale dell'endotelio conseguenti all'infezione da SARS-CoV-2 possono concretizzarsi in danno miocardico acuto (Figura 2). La disfunzione microcircolatoria a livello miocardico e la destabilizzazione delle lesioni aterosclerotiche nel distretto coronarico sono due dei principali meccanismi endotelio-

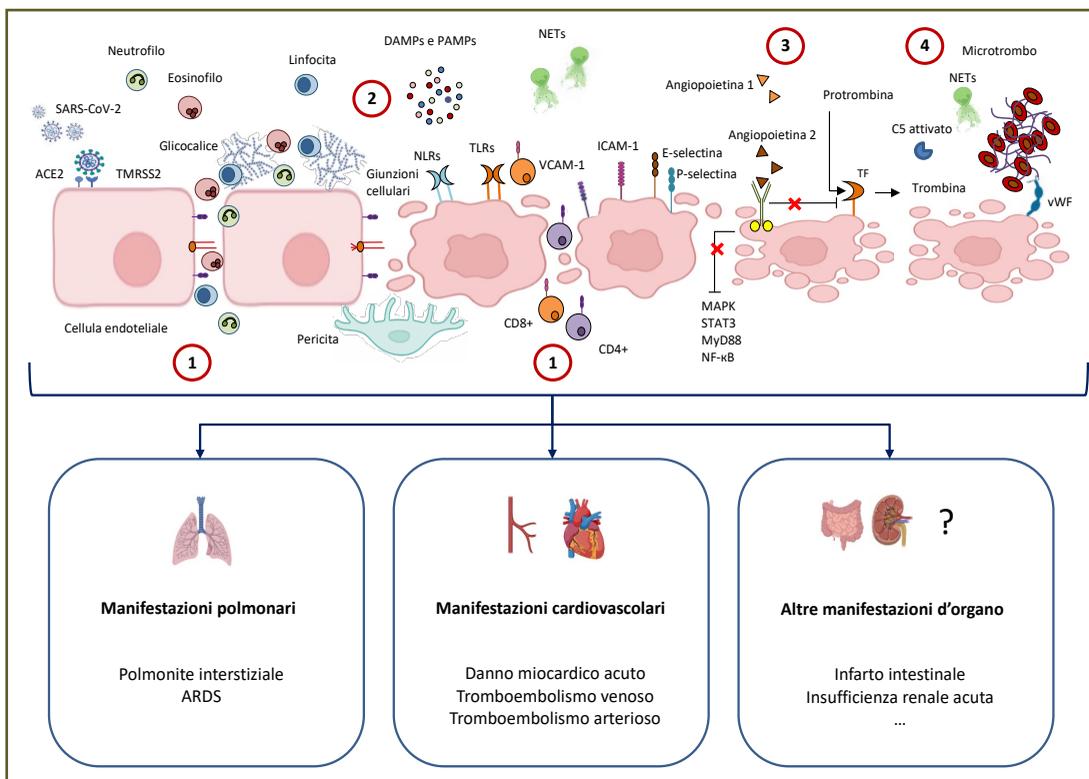


Figura 2 - Relazione tra infezione da SARS-CoV-2 e disfunzione endoteliale. Il danno citopatico prodotto dal virus e l'attivazione della risposta infiammatoria contro l'infezione facilitano l'attivazione delle cellule endoteliali oltre che la perdita dell'integrità endoteliale e l'aumento della permeabilità vascolare, promuovendo l'extravasazione leucocitaria (1). Il rilascio di PAMPs e DAMPs promuove l'attivazione di TLRs e NLRs, che a loro volta inducono la risposta immuno-infiammatoria (2). L'inattivazione dei recettori Tie2 mediata dal legame con angiopoietina 2 esita nell'inibizione di segnali antitrombotici ed antinfiammatori (3). L'endotelio disfunzionante si caratterizza per un'aumentata espressione vWf, il quale contribuisce insieme ad altri mediatori (*i.e.*, NETs e C5 attivato) alla formazione di microtrombi (4).

Acronimi. ACE2, angiotensin-converting enzyme 2; ARDS, acute respiratory distress syndrome; DAMPs, damage-associated molecular patterns; ICAM-1, intercellular adhesion molecule 1; MAPK, mitogen-activated protein kinase; MyD88, myeloid differentiation primary response 88; NF-kB, nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells; NETs, neutrophil extracellular traps; NLRs, NOD-like receptors; PAMPs, pathogen-associated molecular pattern molecules; STAT3, signal transducer and activator of transcription 3; TF, fattore tissutale; TLRs, Toll-like receptor; TMRSS, transmembrane serine protease 2; VCAM-1, vascular cell adhesion protein 1; vWf, fattore di von Willebrand.

dipendenti coinvolti in questa forma di danno d'organo. Alla stessa possono concorrere però anche altri meccanismi fisiopatologici, come la discrepanza tra rifornimento e fabbisogno di ossigeno a livello miocardico, la cardiomiopatia da stress e l'infezione diretta dei miocardiociti da parte di SARS-CoV-2 (12).

Le complesse alterazioni della funzione endoteliale che si verificano in corso di infezione da SARS-CoV-2 possono inoltre determinare un'aumentata suscettibilità a manifestazioni tromboemboliche arteriose e venose. Il tromboembolismo venoso, in particolare, si presenta come una condizione clinica estremamente prevalente nei pazienti ospedalizzati per infezione da SARS-CoV-2 (10-15% dei casi), e ancor più in coloro che accedono in unità di terapia intensiva (20-30% dei casi) (12).

In generale, in corso di infezione da SARS-CoV-2 l'incompetenza funzionale del microcircolo e gli eventi microtrombotici che ne conseguono, possono interessare pressoché tutti i distretti corporei, determinando un danno d'organo di entità proporzionale all'estensione del territorio vascolare coinvolto (*Figura 2*). Tra i distretti spesso interessati vi sono anche il rene e l'intestino, a livello dei quali l'incompetenza funzionale del microcircolo può manifestarsi rispettivamente con insufficienza renale acuta ed infarto intestinale (12).

Significato clinico dei marcatori di disfunzione endoteliale nell'infezione da SARS-CoV-2

Le evidenze circa il cruciale ruolo fisiopatologico dell'endotelio nell'infezione da SARS-CoV-2 hanno alimentato un significativo interesse verso l'identificazione di marcatori clinici di disfunzione endoteliale (parametri laboratoristici e strumentali) in grado di stratificare la gravità e pre-

dire la prognosi intra-ospedaliera dell'infezione stessa, orientandone potenzialmente anche la gestione terapeutica.

Tra i biomarcatori sierici di disfunzione endoteliale più studiati nel contesto clinico dell'infezione da SARS-CoV-2 vi sono l'antigene di vWF, le cellule endoteliali circolanti, le microparticelle endoteliali circolanti, ICAM-1, VCAM-1, tPA, e trombomodulina (6, 21, 22). Numerosi studi osservazionali e alcune metanalisi di studi osservazionali hanno mostrato un significativo valore predittivo di questi parametri laboratoristici nei confronti delle forme a peggiore evoluzione clinica dell'infezione da SARS-CoV-2, aprendo potenzialmente la strada al loro impiego nella pratica clinica (6, 21, 22). Analogamente, vari studi osservazionali hanno dimostrato la significativa capacità discriminatoria di alcuni biomarcatori emergenti di disfunzione endoteliale (*e.g.*, proadrenomedullina, proendotelina), nei confronti della gravità e della prognosi dell'infezione da SARS-CoV-2, suggerendone una potenziale utilità clinica (23). Vi sono però alcuni limiti rilevanti connessi all'uso routinario di tali biomarcatori in ambito assistenziale. In primo luogo, le tecniche di determinazione richieste non sono diffuse su larga scala nei diversi contesti clinici. In secondo luogo, i tempi necessari per la determinazione potrebbero essere troppo lunghi per garantire che l'esito della misurazione possa orientare eventuali decisioni terapeutiche in situazioni d'emergenza.

Maggiore interesse si è quindi focalizzato su altri parametri clinici di disfunzione endoteliale, di più facile e rapida valutazione, anche al letto del paziente, ed informativi in tempo reale. In quest'ottica, sono stati estesamente valutati come predittori di gravità e prognosi nell'infezione da SARS-CoV-2 alcuni parametri strumentali di disfunzione endoteliale che si ottengono da misurazioni non invasive della funzione

macro e microcircolatoria [e.g., *brachial artery flow-mediated dilation* (bFMD) valutabile attraverso la misurazione della vasoattività flusso-mediata dell'arteria brachiale, l'indice di iperemia reattiva, valutabile attraverso la pletismografia digitale, e l'indice di flusso microvascolare valutabile attraverso la capillaroscopia sublinguale] (24-29). Tra questi, la bFMD è risultata ampiamente studiata (24-27). La misurazione della bFMD, come è noto, valuta indirettamente la funzione endoteliale quantificando la dilatazione dell'arteria brachiale a seguito dell'iperemia reattiva generata da uno stimolo ischemico transitorio (i.e., insufflazione del manicotto di uno sfigmomanometro a valori sovrastolici per 3-5 minuti); la tensione di parete generata dal flusso iperemico reattivo al ripristino della pervietà dell'arteria (i.e., desufflazione del manicotto) stimola infatti il rilascio di NO da parte delle cellule endoteliali e la conseguente vasodilatazione dell'arteria brachiale in maniera direttamente proporzionale all'integrità anatomica e funzionale dell'endotelio (30). La maggior parte degli studi ad oggi disponibili suggeriscono l'utilità clinica della bFMD nella stratificazione della gravità clinica e della prognosi dell'infezione da SARS-CoV-2 in fase acuta (24-27). Il più ampio di questi studi è stato condotto su 408 pazienti ospedalizzati per infezione da SARS-CoV-2 sintomatica; in tale studio è stata dimostrata la capacità di bassi valori di bFMD riscontrati al momento del ricovero (<4,4%, ossia inferiori al valore mediano nella popolazione esaminata) di predire un rischio aumentato di 1.5-1.6 volte dell'*endpoint* composito accesso in terapia intensiva/morte intra-ospedaliera, indipendentemente da molteplici fattori confondenti (24). Pertanto, si potrebbe ipotizzare l'impiego routinario della bFMD al momento del ricovero per orientare preventivamente l'intensità delle misure tera-

peutiche da adottare nel singolo paziente con infezione da SARS-CoV-2.

Alcuni parametri strumentali di disfunzione endoteliale sembrano inoltre avere una potenziale utilità clinica per la loro capacità di discriminare la persistenza di sintomi e la prognosi a lungo termine nei pazienti con pregressa infezione da SARS-CoV-2, suggerendo che la disfunzione endoteliale innescata dall'infezione in fase acuta possa in alcuni casi non regredire e condizionare l'andamento clinico nel periodo post-infezione. In uno studio osservazionale condotto su 798 pazienti dopo risoluzione dell'infezione da SARS-CoV-2, l'indice di qualità endoteliale valutato attraverso il monitoraggio termico digitale dopo un follow-up medio di 69 giorni dalla diagnosi di infezione, ha mostrato un'associazione inversa con la persistenza di alcuni sintomi come astenia e dolore toracico (31). Inoltre, in uno studio trasversale condotto su una coorte di 86 pazienti con pregressa infezione da SARS-CoV-2, dopo una mediana di 327 giorni dalla diagnosi i valori di bFMD sono risultati significativamente ridotti rispetto a quelli di una popolazione sana di riferimento ed inversamente associati con i livelli sierici di *tumor necrosis factor- α* (TNF- α); in considerazione del fatto che la bFMD è un noto marcatore surrogato di rischio cardiovascolare, tali risultati suggeriscono che la persistenza a lungo termine di infiammazione sistemica, seppure di basso grado, possa condizionare negativamente la prognosi cardiovascolare dei pazienti con pregressa infezione da SARS-CoV-2 (32). Futuri studi prospettici finalizzati alla valutazione longitudinale integrata della disfunzione endoteliale e di altre misure di danno vascolare rispetto all'incidenza di malattia cardiovascolare su ampie coorti di pazienti con pregressa infezione da SARS-CoV-2 dovranno far luce su questo aspetto. In questo senso sono

attesi i risultati dello studio “COVID-19 Effects on Arterial Stiffness and Vascular Aging” [NCT04558450], attualmente in fase di arruolamento.

Strategie endotelio-protettive nel trattamento dell'infezione da SARS-CoV-2

Alla luce della centralità che la disfunzione endoteliale riveste nella fisiopatologia dell'infezione da SARS-CoV-2, numerosi studi hanno valutato il possibile ruolo terapeutico contro l'infezione stessa di diverse strategie, farmacologiche e non, in grado di agire selettivamente sul ripristino dell'integrità strutturale e funzionale dell'endotelio (*Tabella 1*) (4, 5). Come già discusso, le evidenze attuali suggeriscono che la disfunzione endoteliale correlata all'infezione da SARS-CoV-2 possa essere attribuita, da un lato, all'infezione delle cellule endoteliali e, dall'altro, agli effetti nocivi prodotti sull'endotelio dalla risposta immuno-infiammatoria contro l'infezione. Pertanto, tra le opzioni di trattamento proposte nell'ottica di mitigare la disfunzione endoteliale in corso di infezione da SARS-CoV-2 vi sono sia strategie mirate ad inibire l'infezione delle cellule endoteliali da parte di SARS-CoV-2 [*e.g.*, *human recombinant ACE2* (hrACE2)], sia strategie volte ad attenuare gli effetti nocivi dell'infiammazione sull'omeostasi endoteliale (*e.g.*, tocilizumab, desametasone). Alcune evidenze preliminari, per lo più precliniche, supportano il potenziale ruolo terapeutico di hrACE2 nell'infezione da SARS-CoV-2, attribuendolo alla neutralizzazione di SARS-CoV-2 mediata dal legame hrACE2-proteina S virale e alla conseguente riduzione del danno endoteliale diretto virus-mediato (4, 5). Tuttavia, tale strategia terapeutica necessita ancora di essere estesamente esplorata in ambito clinico. Per di

più, richiedono ancora una approfondita valutazione anche i potenziali limiti ad essa connessi, legati principalmente agli effetti biologici sfavorevoli che potrebbero derivare dall'inibizione dell'azione regolatoria di ACE2 a livello del sistema renina-angiotensina-aldosterone (RAAS). Tocilizumab, un anticorpo monoclonale che inibisce il legame dell'interleuchina-6 (IL-6) al suo recettore, ad oggi risulta un farmaco antinfiammatorio utile nel trattamento dell'infezione da SARS-CoV-2 nelle sue forme clinicamente più gravi. A supportare il suo impiego clinico in questo contesto clinico vi è principalmente un ampio studio clinico condotto 4.485 pazienti con infezione da SARS-CoV-2 critica ricoverati in terapia intensiva, in cui è stata dimostrata la capacità del trattamento precoce con il farmaco di attenuare l'infiammazione e ridurre la mortalità intra-ospedaliera (33). L'impiego del desametasone ha mostrato un'efficacia significativa nel contrastare l'infiammazione e nel ridurre la mortalità intra-ospedaliera in un ampio studio clinico che ha coinvolto 6.425 pazienti con infezione da SARS-CoV-2 e insufficienza respiratoria (studio RECOVERY) (34). Ad oggi, la terapia antinfiammatoria con desametasone costituisce pertanto uno dei cardini della gestione medica dell'infezione da SARS-CoV-2.

Un'ulteriore strategia terapeutica ampiamente studiata per la sua potenziale efficacia nel contrastare la disfunzione endoteliale in corso di infezione da SARS-CoV-2 è rappresentata dalla terapia cellulare con *mesenchymal stem cells* (MSCs). Tale strategia sembrerebbe in grado di esercitare un'azione endotelio-protettiva sia favorendo la *clearance* virale e inibendo l'infezione delle cellule endoteliali da parte di SARS-CoV-2, sia contrastando l'infiammazione e attenuando di conseguenza i suoi effetti nocivi sull'omeostasi endoteliale. Ad oggi alcuni studi clinici preliminari hanno valu-

tato l'efficacia terapeutica delle MSCs nel trattamento dell'infezione da SARS-CoV-2. In alcuni di essi, diversi schemi di infusione di MSCs sono risultati in grado di mitigare la risposta linfocitaria *T helper* (35), di

ridurre i marcatori di infiammazione sistemica (36) e di migliorare la *performance* respiratoria (37) dei pazienti con infezione da SARS-COV-2 trattati. Sono pertanto attesi i risultati di più ampi studi clinici per

Tabella I - Risultati di studi clinici interventistici con strategie endotelio-protettive nel trattamento dell'infezione da SARS-CoV-2.

Principio attivo	Tipo di studio	Gravità di COVID-19	Mortalità da COVID-19	Codice identificativo su ClinicalTrial.gov
Inibitori RAAS	Studio clinico randomizzato controllato in aperto	↔	↔	NCT04338009
	Studio clinico randomizzato controllato in aperto	↔	↔	NCT04353596
Statine	Studio clinico randomizzato controllato in aperto	↓	↓	NCT04359095
	Studio clinico randomizzato controllato con placebo in doppio cieco	↔	↔	NCT04486508
Acidi grassi w-3	-	-	-	-
Tocilizumab	Studio clinico randomizzato controllato con placebo in doppio cieco	↔	↔	NCT04320615
	Studio clinico randomizzato controllato con placebo in doppio cieco	↔	↔	NCT04356937
	Studio clinico non randomizzato in aperto	↓	-	NCT04331795
Eculizumab	-	-	-	-
Doronase alfa	Studio clinico non randomizzato in aperto	-	-	NCT04402970
hUC-MSCs	Studio clinico randomizzato controllato con placebo in doppio cieco	↓	-	NCT04288102
Desametasone	Studio clinico randomizzato-controllato in aperto	↓	↓	NCT04381936
	Studio clinico randomizzato-controllato in aperto	↓	↓	NCT04327401
Enoxaparina	Studio clinico randomizzato-controllato in aperto	↓	↓	NCT04372589
	Studio clinico randomizzato-controllato in aperto	↓	↓	NCT04372589
	Studio clinico randomizzato-controllato in aperto	↓	↓	NCT04359277
Acido acetilsalicilico	Studio clinico randomizzato-controllato in aperto	↔	↔	NCT04381936
hr-ACE2	-	-	-	-

COVID-19, coronavirus disease 2019; hr-ACE2; recombinant human ACE2; hUC-MSCs, human umbilical cord mesenchymal stem cells, RAAS, sistema renina-angiotensina-aldosterone.

stabilire la potenziale utilità di tale strategia terapeutica nella pratica clinica.

In considerazione del ruolo attivo della disfunzione endoteliale nel promuovere l'evoluzione dell'infezione verso le sue forme clinicamente più gravi attraverso la disregolazione della risposta immuno-infiammatoria e dell'omeostasi coagulativa, tra le strategie terapeutiche proposte al fine di mitigare gli effetti nocivi della disfunzione endoteliale in corso di infezione

da SARS-CoV-2 vi sono anche farmaci in grado di inibire diversi mediatori dell'immunotrombosi [e.g., enoxaparina, acido acetilsalicilico, DNasi I ricombinante (dornase alfa), eculizumab]. Vari studi clinici hanno dimostrato l'efficacia dell'anticoagulazione con enoxaparina nella riduzione dell'incidenza di complicanze trombotiche e della mortalità intra-ospedaliera in pazienti con infezione da SARS-CoV-2 (38, 39); l'enoxaparina è pertanto una delle terapie raccomandate in questo contesto clinico. Numerose evidenze suggeriscono peraltro che l'efficacia terapeutica dell'enoxaparina nel trattamento dell'infezione da SARS-CoV-2 non sia dovuta soltanto alla sua azione anticoagulante ma anche alla sua azione antinfiammatoria ed endotelio-protettiva (40). Un altro agente antitrombotico ed antinfiammatorio proposto nel trattamento dell'immunotrombosi in corso di infezione da SARS-CoV-2 è l'acido acetilsalicilico (41); tuttavia, il suo impiego clinico non è attualmente supportato dagli studi di intervento. La terapia con DNasi I ricombinante (dornase alfa) agisce attraverso l'attenuazione dell'effetto patogeno di frammenti di DNA extracellulare, inclusi i NETs, potenti mediatori della disregolazione immuno-infiammatoria e dell'attivazione della cascata coagulativa in corso di infezione da SARS-CoV-2. Pertanto, è plausibile che il farmaco possa esercitare indirettamente effetti endotelio-protettivi. Ad oggi, la terapia con DNasi I ricombinante (dornase alfa) è risultata in grado di migliorare in maniera significativa la *performance* ventilatoria di pazienti con infezione da SARS-CoV-2 in diversi studi clinici (42, 43). Non è invece noto il suo impatto su altri *outcomes* clinici, inclusa la mortalità intra-ospedaliera. L'azione terapeutica di eculizumab, anticorpo monoclonale che blocca la cascata del complemento inibendo l'attivazione di C5, è associata alla inibi-

Glossario

ACE2: angiotensin-converting enzyme 2
Ang II: angiotensina II
ARDS: acute respiratory distress syndrome
bFMD: brachial artery flow-mediated dilation
COVID-19: coronavirus disease 2019
DAMPs: damage-associated molecular patterns
eNOS: endothelial nitric oxide synthase
EPCR: endothelial cell protein C receptor
hrACE2: human recombinant ACE2
ICAM-1: intercellular adhesion molecule 1
IL-6: interleuchina-6
MSCs: mesenchymal stem cells
NETs: neutrophil extracellular traps
NF- κ B: nuclear factor kappa-B
NIH: National Institute of Health
NO: ossido nitrico
NLRs: NOD-like receptors
NRP1: neuropilina 1
PAMPs: pathogen associated molecular patterns
PAR-1: protease activated receptor type 1
PGI2: prostaglandina I2
RAAS: sistema renina-angiotensina-aldosterone
SP1R1: sphingosine-1-phosphate receptor 1
SR-B1: scavenger receptor class B type 1
TF: fattore tissutale
TFPI: tissue factor pathway inhibitor
TLRs: toll-like-receptors
TMPS: transmembrane serine protease 2
TNF- α : tumor necrosis factor- α
tPA: tissue plasminogen activator
uPA: urokinase plasminogen activator
VCAM-1: vascular cell adhesion protein 1
VE: caderine: caderine dell'endotelio vascolare
vWF: Von Willebrand factor

zione dell'immunotrombosi e dei suoi effetti nocivi sull'endotelio. I risultati di alcuni studi clinici preliminari hanno mostrato l'efficacia di tale farmaco nel migliorare il tasso di sopravvivenza globale in pazienti con infezione da SARS-CoV-2 ricoverati in unità di terapia intensiva (44, 45). I risultati di più ampi studi clinici dovranno pertanto orientare sull'impiego di tale strategia farmacologica nella pratica clinica.

Infine, a prescindere dai meccanismi fisiopatologici sottostanti l'interazione tra

endotelio ed infezione da SARS-CoV-2, alcuni farmaci già in uso nella pratica clinica e con documentata azione endotelio-protettiva, potrebbero avere un ruolo coadiuvante nel trattamento dell'infezione stessa. A tale proposito vari studi hanno valutato l'impatto clinico sull'infezione da SARS-CoV-2 della terapia concomitante con alcuni farmaci ampiamente utilizzati in ambito cardiovascolare come inibitori del RAAS, statine, acidi grassi omega-3 e fibrati. Come è noto, gli inibitori del RAAS grazie

Questionario di auto-apprendimento

- 1) **Quali tra questi mediatori non promuove la vasodilatazione arteriosa:**
 - a) NO
 - b) TFPI
 - c) PGI₂
- 2) **La disfunzione endoteliale in corso di infezione da SARS-CoV-2:**
 - a) non è mediata dalla risposta immuno-infiammatoria
 - b) è mediata dall'effetto citopatico del virus a livello delle cellule endoteliali
 - c) non è attenuata da farmaci antinfiammatori
- 3) **I NETs sono implicati nel processo della:**
 - a) immunotrombosi
 - b) rigenerazione endoteliale
 - c) vasocostrizione
- 4) **Quale tra questi non è un limite legato alla determinazione dei comuni biomarcatori di disfunzione endoteliale:**
 - a) disponibilità delle tecniche di determinazione
 - b) tempi necessari per la determinazione
 - c) incapacità di discriminare la gravità clinica e la prognosi dell'infezione da SARS-CoV-2
- 5) **Con quale di queste tecniche è stata ampiamente studiata la disfunzione endoteliale in corso di infezione da SARS-CoV-2?**
 - a) capillaroscopia
 - b) vasoattività flusso-mediata dell'arteria brachiale
 - c) monitoraggio termico digitale
- 6) **La terapia cellulare con cellule staminali mesenchimali non esercita un'attività:**
 - a) endotelio-protettiva
 - b) anti-trombotica
 - c) antinfiammatoria

Risposte corrette: 1b, 2b, 3a, 4c, 5b, 6b

alla loro capacità di contrastare la produzione di Ang II sono in grado di migliorare diverse funzioni omeostatiche dell'endotelio (46). In linea con tale presupposto farmacodinamico, i risultati di numerosi studi osservazionali hanno mostrato l'impatto favorevole della terapia concomitante con tale classe di farmaci su diversi *outcome* clinici dell'infezione da SARS-CoV-2. Al tempo stesso, le statine potrebbero esercitare un ruolo protettivo contro l'infezione da SARS-CoV-2 attraverso diversi meccanismi, tra cui anche l'attenuazione della disfunzione endoteliale (47). Coerentemente con tale ipotesi, i risultati di diversi studi osservazionali e metanalisi di studi osservazionali hanno mostrato l'impatto favorevole della terapia con statine sulla prognosi dell'infezione da SARS-CoV-2 (48, 49). Oltre alle statine anche altri farmaci ipolipemizzanti con documentato effetto endotelio-protettivo, tra cui gli acidi grassi ω -3 ed i fibrati potrebbero avere un ruolo terapeutico nell'attenuazione della disfunzione endoteliale in corso di infezione da SARS-CoV-2 (50). Tuttavia, il loro impatto clinico nel trattamento di questa condizione resta ancora incerto (50).

Conclusioni

Fin dai primi casi descritti l'infezione da SARS-CoV-2 è risultata di fatto una malattia dell'endotelio, con uno spettro di gravità clinica estremamente variabile, anche in funzione dell'entità della disfunzione endoteliale indotta a livello multisistemico. Ciò ha portato a considerare la potenziale utilità clinica di diversi indicatori di disfunzione endoteliale nella stratificazione della gravità e della prognosi dell'infezione da SARS-CoV-2. Inoltre, ha lasciato ipotizzare che l'evoluzione dell'infezione stessa verso le sue manifestazioni cliniche più gravi potesse essere contrastata adottando la di-

sfunzione endoteliale come bersaglio terapeutico. Ad oggi, alcune evidenze suggeriscono la possibilità di mitigare la disfunzione endoteliale e migliorare gli *outcome* clinici dell'infezione attraverso l'inibizione dell'ingresso di SARS-CoV-2 nella cellula endoteliale, l'attenuazione degli effetti nocivi sull'endotelio promossi dalla risposta immuno-infiammatoria incontrollata contro l'infezione, e l'inibizione dell'immuntrombosi. Alcune delle strategie terapeutiche che offrono questa possibilità trovano già spazio nelle raccomandazioni sulla gestione clinica dell'infezione da SARS-CoV-2. Altre rappresentano invece terapie in fase sperimentale il cui impiego nel trattamento dell'infezione da SARS-CoV-2 richiede ancora evidenze di efficacia e sicurezza provenienti da studi clinici randomizzati controllati. Inoltre, alla luce di alcuni studi clinici, vari farmaci di largo impiego e con diverse indicazioni terapeutiche (*e.g.*, inibitori del RAAS e statine), in virtù della loro documentata azione endotelio-protettiva, sembrano avere un potenziale ruolo coadiuvante nel trattamento dell'infezione da SARS-CoV-2 nei pazienti che li assumono come terapie concomitanti.

Resta da considerare, tuttavia, che il continuo emergere di diverse varianti di SARS-CoV-2 così come l'elevato tasso di copertura vaccinale raggiunto in Italia e altri paesi, condizionando l'emergere di forme cliniche di infezione da SARS-CoV-2 molto diverse rispetto a quelle descritte nei primi mesi di pandemia, potrebbero richiedere una rivalutazione complessiva delle misure terapeutiche contro l'infezione adottate/proposte fino ad oggi. Pertanto, anche eventuali terapie mirate a mitigare la disfunzione endoteliale in corso di infezione da SARS-CoV-2 dovrebbero essere riesaminate alla luce dell'andamento epidemiologico in continua evoluzione dell'infezione.

RIASSUNTO

Sebbene esordisca come una malattia dell'apparato respiratorio, in alcuni casi l'infezione da SARS-CoV-2 può evolvere come una patologia multisistemica con diverse manifestazioni di danno d'organo potenzialmente letali. La disfunzione endoteliale sembra avere un ruolo cruciale nella progressione clinica dell'infezione da SARS-CoV-2. In particolare, le attuali evidenze circa l'interazione tra infezione da SARS-CoV-2 ed endotelio suggeriscono, da un lato, che la disfunzione endoteliale possa essere una conseguenza dell'infezione, secondaria all'effetto citopatico diretto del virus e agli effetti dannosi della risposta immuno-infiammatoria contro l'infezione, e, dall'altro, che la stessa disfunzione endoteliale, favorendo la disregolazione della risposta immuno-infiammatoria e dell'omeostasi coagulativa, possa avere un ruolo attivo nel promuovere l'evoluzione dell'infezione verso le sue forme clinicamente più gravi. Sembra quindi che la disfunzione endoteliale stia al centro di un circolo vizioso in grado di alimentare processi fisiopatologici che alla fine possono portare ad incompetenza microcircolatoria generalizzata, condizionando negativamente la prognosi dell'infezione. In questa rassegna vengono esaminati i meccanismi sottostanti il nesso fisiopatologico tra infezione da SARS-CoV-2 e disfunzione endoteliale e viene discusso il ruolo della disfunzione endoteliale come potenziale marcatore prognostico e bersaglio terapeutico nell'infezione da SARS-CoV-2.

Parole chiave: SARS-CoV-2, COVID-19, infezione, endotelio, disfunzione endoteliale.

Bibliografia

1. WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard. World Health Organization. <https://covid19.who.int/>
2. Nyberg T, Ferguson NM, Nash SG, et al. Comparative analysis of the risks of hospitalisation and death associated with SARS-CoV-2 omicron (B.1.1.529) and delta (B.1.617.2) variants in England: a cohort study. *Lancet*. 2022; 399 (10332): 1303-1312.
3. Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Treatment Guidelines. National Institutes of Health. <https://www.covid19treatmentguidelines.nih.gov/>
4. Ma Z, Yang KY, Huang Y, et al. Endothelial contribution to COVID-19: an update on mechanisms and therapeutic implications. *J Mol Cell Cardiol*. 2022; 164: 69-82.
5. Jin Y, Ji W, Yang H, et al. Endothelial activation and dysfunction in COVID-19: from basic mechanisms to potential therapeutic approaches. *Signal Transduct Target Ther*. 2020; 5: 293.
6. Evans PC, Rainger GE, Mason JC, et al. Endothelial dysfunction in COVID-19: a position paper of the ESC Working Group for Atherosclerosis and Vascular Biology, and the ESC Council of Basic Cardiovascular Science. *Cardiovasc Res*. 2020; 116: 2177-2184.
7. Wallez Y, Huber P. Endothelial adherends and tight junctions in vascular homeostasis, inflammation and angiogenesis. *Biochim Biophys Acta*. 2008; 1778: 794-809.
8. Curry FE, Adamson RH. Endothelial glycocalyx: permeability barrier and mechanosensor. *Ann Biomed Eng*. 2012; 40: 828-839.
9. David S, Kümpers P, van Slyke P, et al. Mending leaky blood vessels: the angiotensin-Tie2 pathway in sepsis. *J Pharmacol Exp Ther*. 2013; 345: 2-6.
10. Flaumenhaft R, De Ceunynck K. Targeting PARI: Now What? *Trends Pharmacol Sci*. 2017; 38: 701-716.
11. Jung B, Obinata H, Galvani S, et al. Flow-regulated endothelial S1P receptor-1 signaling sustains vascular development. *Dev Cell*. 2012; 23: 600-610.
12. Flaumenhaft R, Enjoji K, Schmaier AA. Vasculopathy in COVID-19. *Blood*. 2022: blood.2021012250.
13. Fraga-Silva RA, Da Silva DG, Montecucco F, et al. The angiotensin-converting enzyme 2/angiotensin-(1-7)/Mas receptor axis: a potential target for treating thrombotic diseases. *Thromb Haemost*. 2012; 108: 1089-1096.
14. Maroney SA, Mast AE. New insights into the biology of tissue factor pathway inhibitor. *J Thromb Haemost*. 2015; 13 (Suppl. 1): S200-S207.
15. Longstaff C, Kolev K. Basic mechanisms and regulation of fibrinolysis. *J Thromb Haemost*. 2015; 13 (Suppl. 1): S98-S105.
16. Hamming I, Timens W, Bulthuis ML, et al. Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis. *J Pathol*. 2004; 203: 631-637.
17. Tadros A, Hughes DP, Dunmore BJ, et al. ABIN-2 protects endothelial cells from death and has a

- role in the antiapoptotic effect of angiopoietin-1. *Blood*. 2003; 102: 4407-4409.
18. Barnes BJ, Adrover JM, Baxter-Stoltzfus A, et al. Targeting potential drivers of COVID-19: Neutrophil extracellular traps. *J Exp Med*. 2020; 217: e20200652.
 19. Ruhl L, Pink I, Kühne JF, et al. Endothelial dysfunction contributes to severe COVID-19 in combination with dysregulated lymphocyte responses and cytokine networks. *Signal Transduct Target Ther*. 2021; 6: 418.
 20. Ackermann M, Verleden SE, Kuehnel M, et al. Pulmonary Vascular Endothelialitis, Thrombosis, and Angiogenesis in COVID-19. *N Engl J Med*. 2020; 383: 120-128.
 21. Falcinelli E, Petito E, Becattini C, et al. Role of endothelial dysfunction in the thrombotic complications of COVID-19 patients. *J Infect*. 2021; 82: 186-230.
 22. Andrianto, Al-Farabi MJ, Nugraha RA, et al. Biomarkers of endothelial dysfunction and outcomes in coronavirus disease 2019 (COVID-19) patients: A systematic review and meta-analysis. *Microvasc Res*. 2021; 138: 104224.
 23. Méndez R, González-Jiménez P, Latorre A, et al. Acute and sustained increase in endothelial biomarkers in COVID-19. *Thorax*. 2022; 77: 400-403.
 24. Bianconi V, Mannarino MR, Figorilli F, et al. Low Brachial Artery Flow-Mediated Dilation Predicts Worse Prognosis in Hospitalized Patients with COVID-19. *J Clin Med*. 2021; 10: 5456.
 25. Walia R, Arunachalam VS, Chauhan U, et al. Endothelial dysfunction assessed by brachial artery flow-mediated dilatation predicts severe COVID-19-related disease. *J Family Med Prim Care*. 2022; 11: 319-324.
 26. Oliveira MR, Back GD, da Luz Goulart C, et al. Endothelial function provides early prognostic information in patients with COVID-19: A cohort study. *Respir Med*. 2021; 185: 106469.
 27. Cristina-Oliveira M, Meireles K, Gil S, et al. Carotid intima-media thickness and flow-mediated dilation do not predict acute in-hospital outcomes in hospitalized patients with COVID-19. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2022; 10.1152/ajpheart.00026.2022.
 28. Mejia-Renteria H, Travieso A, Sagir A, et al. In-vivo evidence of systemic endothelial vascular dysfunction in COVID-19. *Int J Cardiol*. 2021; 345: 153-155.
 29. Di Dedda U, Ascari A, Fantinato A, et al. Microcirculatory Alterations in Critically Ill Patients with COVID-19-Associated Acute Respiratory Distress Syndrome. *J Clin Med*. 2022; 11: 1032.
 30. Thijssen DHJ, Bruno RM, van Mil ACCM, et al. Expert consensus and evidence-based recommendations for the assessment of flow-mediated dilation in humans. *Eur Heart J*. 2019; 40: 2534-2547.
 31. Charfeddine S, Ibn Hadj Amor H, et al. Long COVID-19 Syndrome: Is It Related to Microcirculation and Endothelial Dysfunction? Insights From TUN-EndCOV Study. *Front Cardiovasc Med*. 2021; 8: 745-758.
 32. Gao YP, Zhou W, Huang PN, et al. Persistent Endothelial Dysfunction in Coronavirus Disease-2019 Survivors Late After Recovery. *Front Med (Lausanne)*. 2022; 9: 809033.
 33. Leaf DE, Gupta S, Wang W. Tocilizumab in Covid-19. *N Engl J Med*. 2021; 384: 86-87.
 34. RECOVERY Collaborative Group, Horby P, Lim WS, et al. Dexamethasone in Hospitalized Patients with Covid-19. *N Engl J Med*. 2021; 384: 693-704.
 35. Montanucci P, Pescara T, Greco A, et al. Microencapsulated Wharton Jelly-derived adult mesenchymal stem cells as a potential new therapeutic tool for patients with COVID-19 disease: an in vitro study. *Am J Stem Cells*. 2021; 10: 36-52.
 36. Liang B, Chen J, Li T, et al. Clinical remission of a critically ill COVID-19 patient treated by human umbilical cord mesenchymal stem cells: A case report. *Medicine (Baltimore)*. 2020; 99: e21429.
 37. Leng Z, Zhu R, Hou W, et al. Transplantation of ACE2 Mesenchymal Stem Cells Improves the Outcome of Patients with COVID-19 Pneumonia. *Aging Dis*. 2020; 11: 216-228.
 38. Nadkarni GN, Lala A, Bagiella E, et al. Anticoagulation, Bleeding, Mortality, and Pathology in Hospitalized Patients With COVID-19. *J Am Coll Cardiol*. 2020; 76: 1815-1826.
 39. Tang N, Bai H, Chen X, et al. Anticoagulant treatment is associated with decreased mortality in severe coronavirus disease 2019 patients with coagulopathy. *J Thromb Haemost*. 2020; 18: 1094-1099.
 40. Witowski J, Pawlaczyk K, Breborowicz A, et al. IL-17 stimulates intraperitoneal neutrophil infiltration through the release of GRO alpha chemokine from mesothelial cells. *J Immunol*. 2000; 165: 5814-5821.
 41. Bianconi V, Violi F, Fallarino F, et al. Is Acetylsalicylic Acid a Safe and Potentially Useful Choice for Adult Patients with COVID-19? *Drugs*. 2020; 80: 1383-1396.
 42. Okur HK, Yalcin K, Tastan C, et al. Preliminary report of in vitro and in vivo effectiveness of dornase alfa on SARS-CoV-2 infection. *New Microbes New Infect*. 2020; 37: 100756.
 43. Weber AG, Chau AS, Egeblad M, et al. Nebulized in-line endotracheal dornase alfa and albuterol administered to mechanically ventilated

- COVID-19 patients: a case series. *Mol Med*. 2020; 26: 91.
44. Diurno F, Numis FG, Porta G, et al. Eculizumab treatment in patients with COVID-19: preliminary results from real life ASL Napoli 2 Nord experience. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2020; 24: 4040-4047.
 45. Annane D, Heming N, Grimaldi-Bensouda L, et al.; Garches COVID 19 Collaborative Group. Eculizumab as an emergency treatment for adult patients with severe COVID-19 in the intensive care unit: A proof-of-concept study. *EClinicalMedicine*. 2020; 28: 100590.
 46. Dzau VJ. Theodore Cooper Lecture: Tissue angiotensin and pathobiology of vascular disease: a unifying hypothesis. *Hypertension*. 2001; 37: 1047-1052.
 47. Ganjali S, Bianconi V, Penson PE, et al. Commentary: Statins, COVID-19, and coronary artery disease: killing two birds with one stone. *Metabolism*. 2020; 113: 154375.
 48. Vahedian-Azimi A, Mohammadi SM, Banach M, et al. Improved COVID-19 Outcomes following Statin Therapy: An Updated Systematic Review and Meta-analysis. *Biomed Res Int*. 2021; 2021: 1901772.
 49. Kow CS, Hasan SS. Meta-analysis of Effect of Statins in Patients with COVID-19. *Am J Cardiol*. 2020; 134: 153-155.
 50. Talasaz AH, Sadeghipour P, Aghakouchakzadeh M, et al. Investigating Lipid-Modulating Agents for Prevention or Treatment of COVID-19: JACC State-of-the-Art Review. *J Am Coll Cardiol*. 2021; 78: 1635-1654.

FATTORI DI RISCHIO

EFFETTI DELLA SIGARETTA A TABACCO RISCALDATO NON BRUCIATO SULLA DISFUNZIONE ENDOTELIALE E L'ATTIVAZIONE PIASTRINICA

Effects of heated unburned tobacco cigarette on endothelial dysfunction and platelet activation

LORENZO LOFFREDO¹, ALESSIA FALLARINO¹, GIULIA GRAZIANO¹, AURORA PARANINFI¹, CRISTINA NOCELLA¹, VITTORIA CAMMISOTTO¹, SIMONA BARTIMOCCIA¹, ROBERTO CARNEVALE^{2,3}

¹Department of Clinical, Internistic, Anaesthetic and Cardiovascular Sciences, Sapienza University of Rome;

²Department of Medical-Surgical Sciences and Biotechnologies, Sapienza University of Rome, Latina;

³Sapienza University, Rome and Cardiocentro Mediterranea, Napoli

SUMMARY

Tobacco smoke has a significant impact on all stages of the atherothrombotic process, contributing to endothelial dysfunction, oxidative stress, platelet activation and the development of atherothrombotic plaque. In recent years, heat-not-burn cigarette (HNBC) have become popular as an alternative to traditional cigarettes. However, the effects of HNBC on the cardiovascular system and the underlying pathophysiological mechanisms are still unclear. The aim of this review is to analyze the effects of HNBCs on endothelial dysfunction and platelet activation and to evaluate the effects on the health of smokers.

Key words: *Tobacco smoke, atherosclerosis, oxidative stress, inflammation.*

Introduzione

Il fumo di sigaretta è responsabile di oltre 6 milioni di decessi l'anno nel mondo e rappresenta un importante fattore di rischio modificabile per lo sviluppo di malattie cardiovascolari (1). I fumatori presen-

Indirizzo per la corrispondenza

Lorenzo Loffredo
Divisione I Clinica Medica
Viale del Policlinico, 155 - 00161 Rome
E-mail: lorenzo.loffredo@uniroma1.it

tano, rispetto alla popolazione generale, un'aumentata incidenza di complicanze cardiovascolari quali l'angina stabile, le sindromi coronariche acute, la morte improvvisa, l'ictus e l'arteriopatia obliterante degli arti inferiori (2). Numerosi studi hanno cercato di definire i meccanismi fisiopatologici alla base del danno cardiovascolare mediato dal fumo di tabacco, identificando nella patogenesi del processo aterosclerotico alcune fasi di primaria importanza: l'innescò della risposta infiammatoria e dello stress ossidativo, la disfunzione endoteliale e l'attivazione piastrinica (2-4). Un ruolo centrale come *trigger* di questi eventi è stato attribuito allo stress ossidativo: l'incremento di radicali liberi dell'ossigeno derivante dall'esposizione al fumo di sigaretta riduce la biodisponibilità di ossido nitrico e prosta-

ciclina e determina l'espressione di geni proinfiammatori, la sintesi di citochine e molecole d'adesione che favoriscono il reclutamento delle cellule dell'immunità innata e l'instaurarsi del danno immuno-mediato a carico dell'endotelio vascolare (5, 6) (Figura 1). La disfunzione endoteliale, con la ridotta produzione di sostanze ad azione antitrombotica, e l'attivazione della risposta infiammatoria a carico della parete dei vasi conducono ad un'alterata regolazione dell'attivazione piastrinica, della cascata coagulativa e dei meccanismi fibrinolitici, divenendo responsabili delle modificazioni della placca aterosclerotica e quindi degli eventi cardiovascolari (4, 7, 8). Inoltre, lo stress ossidativo generato dal fumo di sigaretta è in grado di attivare le piastrine, favorendone meccanismi atero-trombotici (9).

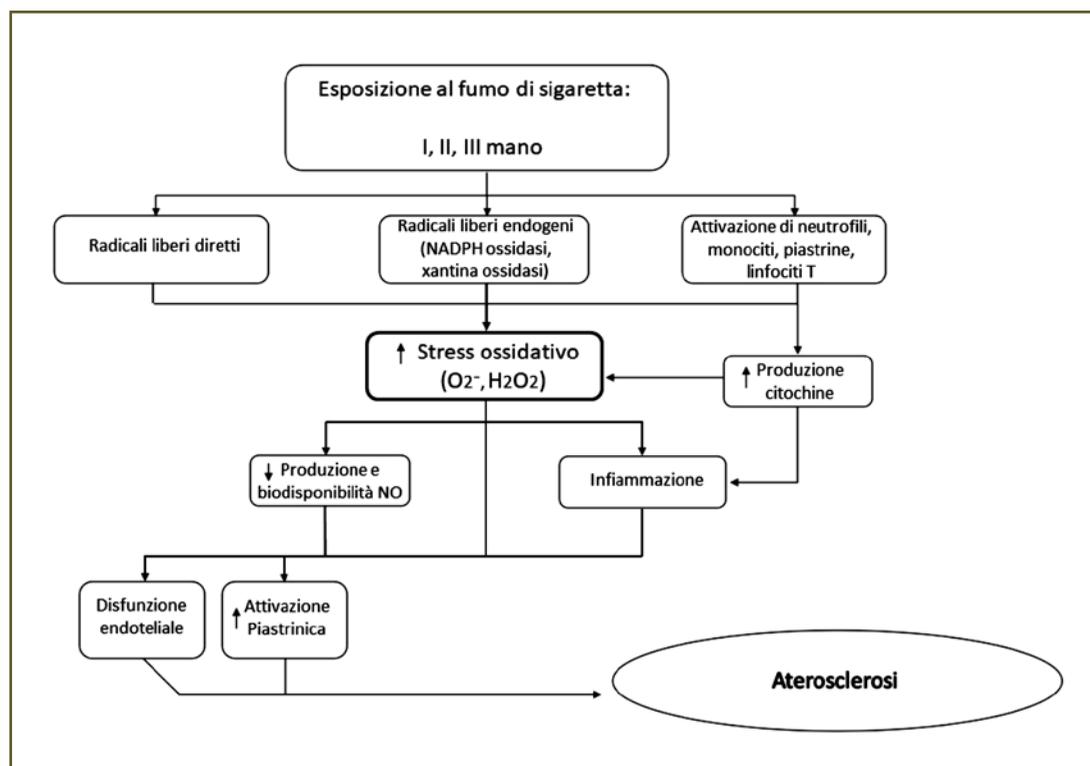


Figura 1 - Gli effetti del fumo di sigaretta.

Negli ultimi anni sono stati commercializzati diversi nuovi prodotti alternativi alla sigaretta tradizionale come le *heat-not-burn-cigarettes* (HNBC). Le HNBC sono dei dispositivi di nuova generazione che riscaldano il tabacco a temperature evitandone la combustione e provocando l'aerosol della nicotina e di altri composti chimici (10, 11). Sono ancora poco chiari gli effetti delle HNBC sull'apparato cardiovascolare (12).

Scopo di questa review è di analizzare gli effetti della sigaretta a riscaldamento del tabacco sulla disfunzione endoteliale e l'attivazione piastrinica e di valutare gli effetti sulla salute dei fumatori.

Sigarette a tabacco riscaldato non bruciato (*Heat Not Burn Cigarettes*)

Le Sigarette a tabacco riscaldato non bruciato (come l'iQOS[®], prodotte da Philip Morris International, PMI) (11), hanno avuto un successo notevolmente maggiore rispetto ai prodotti simili introdotti negli ultimi tre decenni, tanto che in Italia, una delle nazioni pilota per la loro introduzione in commercio, già nel 2017 quasi un milione di persone avevano provato iQOS e, di queste, 1/3 era rappresentato da non fumatori (13). Sono composte da 3 parti principali: *heatstick*, supporto e caricatore tascabile. Gli *heatstick*, che contengono delle lunghe strisce di tabacco, vengono inseriti all'interno del supporto per l'uso. Questo contiene al suo interno una lama elettronica che riscalda la miscela di tabacco ad una temperatura sotto i 350°C, notevolmente inferiore rispetto ai 600°C necessari perché si attivi la reazione di combustione (11). Il tabacco viene quindi riscaldato e non bruciato, evitando la produzione delle sostanze che si generano nel processo di combustione della sigaretta tradizionale (11).

Nel 2017, dopo aver condotto tre studi quantitativi tra i consumatori adulti statuni-

tensi per testare gli effetti dell'iQOS sulla salute (14), la PMI ha presentato il prodotto alla Food and Drug Administration (FDA), chiedendone l'autorizzazione al commercio sulla base di tre affermazioni:

- il sistema iQOS riscalda il tabacco ma non lo brucia;
- viene significativamente ridotta la produzione di sostanze chimiche dannose e potenzialmente dannose;
- passare completamente dalle sigarette convenzionali al sistema iQOS può ridurre i rischi di malattie legate al tabacco.

Gli effetti dell'iQOS sulla salute, tuttavia, sono ancora ampiamente da valutare (11).

Funzione endoteliale ed HNBC

Diversi studi indipendenti sono stati condotti negli ultimi anni per valutare le conseguenze dell'utilizzo di HNBC sulla salute cardiovascolare. In relazione a quanto già noto sulla patogenesi del danno cardiovascolare provocato dal fumo di tabacco (*Figura 1*) le ricerche si sono concentrate prevalentemente sugli effetti delle HNBC su quei fattori universalmente riconosciuti come promotori e indicatori di disfunzione endoteliale. La disfunzione endoteliale può essere rilevata in modo non invasivo da una ridotta dilatazione mediata da flusso (flow-mediated dilation, FMD) in risposta ad uno stimolo ischemico transitorio, come l'inflazione di una cuffia sfigmomanometrica a livelli sopra sistolici sull'avambraccio (15). Dopo aver sgonfiato il bracciale, il flusso sanguigno dell'arteria brachiale aumenta in risposta a questa ischemia acuta (15). Le cellule endoteliali sane rilasciano fattori, tra cui l'ossido nitrico (NO), che mediano il rilassamento della muscolatura liscia e la vasodilatazione acuta (16). La ridotta biodisponibilità di NO, che può essere associata ad un aumento dello stress ossidativo, contribuisce ad una

ridotta FMD (17). È importante sottolineare che la compromissione della FMD è associata ad un aumentato rischio di eventi cardiovascolari (18).

In un recente lavoro pubblicato da Giebe et al. su *Redox Biology* sono descritti gli effetti provocati da estratti acquosi di HNBC, sigaretta tradizionale e sigaretta elettronica, a diverse concentrazioni, su colture di cellule endoteliali estratte da vena ombelicale umana (19). In questo studio *in vitro* la vitalità cellulare e la capacità di riparazione del danno endoteliale vengono compromessi in maniera significativa solo dalla sigaretta tradizionale, attraverso un meccanismo solo in parte riconducibile alla concentrazione di nicotina e che sembra invece coinvolgere la via di segnalazione PI3K/AKT/eNOS risultando in una ridotta produzione di NO (19). Parimenti, anche lo stress ossidativo, valutato in maniera indiretta attraverso la misurazione di NRF2, molecola antiossidante prodotta dalle cellule in risposta all'aumento dei radicali liberi dell'ossigeno, sembra essere maggiore in presenza di estratto di sigaretta tradizionale, in misura dipendente dalla concentrazione utilizzata. Ciò che si osserva, invece, anche in colture esposte ad estratti di iQOS e sigaretta elettronica, seppur in minor misura rispetto alla sigaretta tradizionale, è un aumento della capacità di adesione dei monociti alle cellule endoteliali e un aumento dell'espressione e della sintesi di geni e proteine pro-infiammatori, valutati rispettivamente mediante PCR e Western blot (19).

Questi risultati sembrano essere solo in parte in linea con quanto emerso da ricerche effettuate *in vivo*. In un trial randomizzato controllato condotto all'Università La Sapienza di Roma (20), è stato comparato su 20 soggetti l'effetto in acuto delle HNBC, delle sigarette elettroniche e del fumo di tabacco su diversi parametri clinico-labora-

toristici utilizzati come *marker* di stress ossidativo, attivazione piastrinica e disfunzione endoteliale. In particolare, come indicatori di stress ossidativo, sono stati dosati nel siero dei tre gruppi di fumatori i livelli di sNOX-dp, H₂O₂ e isoprostani, che in tutti i casi sono risultati aumentati dopo che i soggetti avevano fumato, per poi tornare a livelli normali dopo il *wash out*. Anche i livelli sierici di CD40L e P-Selectina, presi in esame come *marker* di attivazione piastrinica, sono risultati aumentati in tutti e tre i gruppi per poi normalizzarsi dopo il *wash out*. In riferimento alla disfunzione endoteliale, in tutti i soggetti la FMD è risultata ridotta dopo aver fumato. Sorprendentemente, tuttavia, nel gruppo esposto al consumo di iQOS non si è osservata una riduzione dei livelli sierici di NO, suggerendo, in linea con quanto evidenziato da studi precedenti, che gli effetti delle HNBC sulla funzione endoteliale possano essere mediati, almeno in parte, dalla nicotina (12, 21). È interessante in tal senso quanto emerso da uno studio di Nabavizadeh et al. (22) che, tramite l'utilizzo di ultrasuoni ad alta risoluzione e tecniche microchirurgiche, ha effettuato misurazioni della FMD su topi esposti al fumo di HNBC *vs* sigaretta tradizionale: a parità di concentrazione di nicotina nell'aria inalata, i livelli sierici della sostanza sono risultati 4 volte più elevati nel gruppo di topi esposti al fumo di HNBC. Questo potrebbe dipendere in parte dal fatto che, nel fumo di HNBC, rispetto a quello di sigaretta, la nicotina è presente per lo più in forma di particolato e in quota minore come aerosol, risultando pertanto più facilmente assorbibile a livello della membrana alveolo-capillare; i valori di FMD erano comparabili fra i due gruppi.

Dallo studio degli effetti cardiovascolari acuti delle HNBC è emerso, dunque, che seppur in misura minore rispetto alla sigaretta tradizionale, hanno un impatto non

trascurabile sugli indicatori di salute cardiovascolare (20). Questi dati sembrano essere confermati anche per quanto riguarda l'utilizzo delle HNBC in cronico. Loffredo et al. (23) hanno studiato campioni di sangue provenienti da 60 soggetti divisi in tre gruppi: 20 fumatori cronici di sigaretta tradizionale, 20 fumatori cronici di HNBC e 20 controlli sani. Il siero dei fumatori di HNBC e quello dei fumatori di sigaretta tradizionale presentavano livelli sovrapponibili di cotinina, un derivato della nicotina utilizzato per valutare il livello di compliance al fumo nei due gruppi in studio (23). Lo studio ha evidenziato nei fumatori (HNBC o sigaretta a tabacco tradizionale) una riduzione significativa di NO e FMD rispetto al gruppo dei non fumatori. Nessuna differenza significativa è stata osservata tra il gruppo fumatori di HNBC e quello di tabacco (23). La riduzione della FMD è risultata essere direttamente correlata ai livelli di cotinina sierica, a suggerire l'esistenza di una relazione tra entità del consumo di sigarette (o heatstick) e grado di disfunzione endoteliale. Quest'ultimo dato è in linea con quanto dimostrato in un precedente studio che prendeva in oggetto la disfunzione endoteliale in relazione ai livelli sierici di cotinina in soggetti fumatori di sigaretta tradizionale (3, 24).

Meccanismi di attivazione piastrinica nelle malattie cardiovascolari

Le piastrine sono piccole cellule anucleate del sangue, originate dai megacariociti nel midollo osseo con una vita media di circa 8-10 giorni. Le piastrine hanno diverse funzioni fisiologiche e hanno un ruolo importante nella patogenesi della trombosi. Grazie al loro coinvolgimento nell'attivazione della cascata coagulativa, sono fondamentali nel mantenere un adeguato volu-

me di sangue nei soggetti con lesioni vascolari. L'inizio di questa attività inizia con il danno tissutale e determina il rilascio e il legame di diverse glicoproteine, fattori di crescita e fattori della coagulazione. Le piastrine contengono una membrana plasmatica, membrane interne (sistemi canalicolari aperti e tubolari densi), un citoscheletro (microtubuli e microfilamenti), mitocondri, granuli di glicogeno, granuli di accumulo (a-granuli e granuli densi), lisosomi e perossisomi (25). La membrana esterna delle piastrine è fondamentale per la loro funzione nell'emostasi e per la loro attivazione. Infatti, diversi recettori che sono espressi in modo costitutivo sulla superficie o in seguito all'attivazione, consentono l'adesione delle piastrine alle superfici endoteliali e l'aggregazione con altre piastrine. All'interno della piastrina invece, sono presenti granuli alfa e granuli densi, che contengono composti specifici i quali sono fondamentali per una varietà di funzioni. Nello specifico, i granuli alfa sono più numerosi e contengono composti come P-selectina, GPIIb/IIIa, GPIb, fattore di von Willebrand (vWF), fattori V, IX e XIII ed altri. I granuli densi oltre a contenere alcuni dei fattori appena citati, sono principalmente responsabili delle riserve di calcio, potassio, serotonina e importanti nucleotidi come adenosina trifosfato (ATP) e adenosina difosfato (ADP) (25). Dopo l'attivazione, le piastrine perdono la loro forma discoidale, assumono una forma sferica ed estendono pseudopodi lunghi e appuntiti. Gli organelli sono contratti verso il centro piastrinico e sono racchiusi da un anello aderente di microtubuli e microfilamenti. Infine, il contenuto degli organelli secretori viene espulso. Durante la secrezione, le membrane dei granuli si fondono con quelle del sistema canalicolare connesso alla superficie, con la diffusione delle proteine della membrana granulare interna,

come la P-selectina, nella membrana plasmatica. Mentre i contenuti di granuli densi sono facilmente secreti, il rilascio di granuli alfa richiede concentrazioni di agonisti più elevate. Oltre al contenuto dei tre granuli secretori, le piastrine producono e secernevano sostanze farmacologicamente attive, come il trombossano (Tx) A₂ e il fattore attivante piastrinico (PAF), durante la loro attivazione e aggregazione, stabilendo un sistema di *feedback* positivo per la risposta emostatica (26).

Le piastrine svolgono un ruolo importante nelle malattie cardiovascolari. Ad esempio, la normale risposta delle piastrine può essere alterata, sia da aumentati stimoli proaggreganti sia da una diminuzione di sostanze antiaggreganti per produrre condizioni di aumentata attivazione e aggregazione piastrinica e manifestarsi in stati di malattia cardiovascolare attiva sia su base cronica (es. angina pectoris stabile) che acuta (ad es. infarto miocardico acuto). Tra i meccanismi coinvolti nell'attivazione piastrinica anche lo stress ossidativo gioca un ruolo importante. Lo stress ossidativo è una condizione fisiopatologica causata dallo squilibrio tra la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e il funzionamento dei sistemi antiossidanti. Durante l'attivazione piastrinica, la produzione di ROS compreso l'anione superossido (O₂⁻), i radicali idrossilici (OH) e il perossido di idrogeno (H₂O₂) avviene mediante mobilitazione del calcio, inattivazione dell'ossido nitrico (NO) e interazione con acido arachidonico per la formazione di isoprostani (27). I ROS nelle piastrine possono essere generati da diversi sistemi enzimatici, tra cui la NADPH ossidasi, la cicloossigenasi (COX), l'ossido nitrico sintasi endoteliale disaccoppiato (eNOS), la xantina ossidasi (XO) e la respirazione mitocondriale (28).

In condizioni fisiologiche normali, quando un vaso sanguigno è danneggiato, il

compito delle piastrine all'interno della circolazione è arrestare la perdita di sangue. Questo processo comporta la rapida adesione delle piastrine al subendotelio esposto, seguita dall'adesione piastrina-piastrina, che culmina infine nella formazione di un tappo piastrinico, il quale sigilla temporaneamente la parete del vaso danneggiato. Al contrario, in condizioni patologiche, come l'aterosclerosi, la formazione di trombi arteriosi può limitare l'afflusso di sangue ai tessuti vicini, provocando ischemia locale e/o la progressione della lesione aterosclerotica. Infatti, nell'emostasi, le piastrine circolano a stretto contatto con il rivestimento delle cellule endoteliali della parete del vaso senza aderire ad esso. In condizioni patologiche, tuttavia, le piastrine rispondono rapidamente alle alterazioni delle cellule endoteliali (ad es. formazione di striature grasse o rottura della placca) e all'esposizione delle strutture subendoteliali attaccandosi saldamente al sito della lesione (25, 29, 30). Questo conduce alla formazione di aggregati piastrinici (trombi) con eventi ischemici cardiovascolari associati. Inoltre, vi sono evidenze che dimostrano uno stato di aumentata attivazione piastrinica in soggetti che presentano diversi fattori di rischio cardiovascolari come diabete mellito, ipercolesterolemia, ipertensione e fumo (25). Infine, lo studio e l'uso di una gamma crescente di terapie antiplastriniche nella gestione degli stati patologici, sopra elencati, sottolinea ulteriormente il ruolo fondamentale delle piastrine nella patogenesi delle malattie cardiovascolari.

HNBC e attivazione piastrinica: studi sperimentali e clinici

Il fumo costituisce un importante fattore di rischio modificabile per le malattie cardiovascolari (31). I meccanismi fisiopatologici alla base dei suoi effetti deleteri

comprendono l'elasticità arteriosa (32) e la deformazione miocardica (33), la disfunzione endoteliale (34), l'accentuazione dello stress ossidativo (35) e l'aumento dell'attivazione piastrinica (36). Dunque, il fumo può promuovere il processo di aterotrombosi inducendo un aumento dell'attivazione piastrinica, infatti, è stato dimostrato che nei soggetti fumatori cronici i livelli dei marcatori sia di stress ossidativo che di attivazione piastrinica rispetto ai soggetti non fumatori risultano alterati (35, 37). A questo proposito, negli ultimi anni, si sta cercando di sviluppare nuovi prodotti alternativi per ridurre gli effetti negativi associati all'uso dei prodotti del tabacco (38). I dispositivi a tabacco riscaldato non bruciato (heat-not-burn cigarette, HNBC) sono una tecnologia che riscalda il tabacco anziché bruciarlo per generare un aerosol con livelli sostanzialmente inferiori di sostanze tossiche rispetto al fumo di sigaretta (39). Tuttavia, questo effetto non è stato costantemente associato ai benefici della funzione cardiovascolare. Da un lato, sono emerse prove che HNBC altera in modo acuto l'equilibrio dello stress ossidativo, l'attivazione piastrinica, la funzione endoteliale e la pressione sanguigna periferica in misura minore rispetto al fumo tradizionale (40). D'altro canto, in modelli di ratto, l'esposizione all'aerosol di HNBC risultava dannosa per la funzione endoteliale, misurata tramite FMD, come il fumo di sigaretta tradizionale (22). Tuttavia, gli effetti dell'uso di HNBC sulla funzione cardiovascolare non sono stati ancora completamente definiti e poche sono le evidenze sull'attivazione piastrinica.

Uno studio *cross-sectional*, randomizzato in 20 fumatori sani (20), ha valutato gli effetti acuti dell'uso di sigarette HNBC di nuova generazione rispetto alle sigarette elettroniche da "svapo" (EVC) e alle tradizionali sigarette a combustione di tabacco

(TC). È emerso che l'uso singolo di qualsiasi prodotto, era associato a effetti avversi acuti su una serie di marcatori biologici e fisiologici (23). L'uso di HNBC però, ha mostrato un minor impatto, rispetto sia a EVC che TC, sull'attivazione della Nox2 e sulla produzione di 8-iso-prostaglandina F2a-III. Inoltre, le concentrazioni dei marcatori piastrinici, CD40 ligando e la P-selectina solubili, risultavano meno alterati dopo l'uso di HNBC rispetto a TC (20).

Il passaggio dalle TC ai prodotti HNBC ha comportato una significativa riduzione dell'esposizione ai costituenti nocivi e potenzialmente dannosi presenti nel fumo di sigaretta ed è stato associato ai miglioramenti osservati rispetto ad alcuni biomarcatori che svolgono un ruolo importante nei meccanismi patofisiologici delle malattie legate al fumo (41), come quelle cardiovascolari. Questo aspetto è stato approfondito in uno studio recente a 2 bracci paralleli, di fumatori adulti sani, non disposti a smettere di fumare TC, i quali sono stati randomizzati a passare a HNBC (n=80) o a continuare a usare TC (n=40) per 5 giorni in ambiente controllato. I risultati mostrati hanno evidenziato cambiamenti favorevoli di alcuni biomarcatori nel gruppo HNBC, in particolare, una riduzione della conta dei globuli bianchi, delle molecole di adesione intracellulare solubili e dei livelli di 11-deidrotrombossano B2, indicativi di ridotta infiammazione, disfunzione endoteliale e attivazione piastrinica (41). Ikonomidis e collaboratori hanno confrontato gli effetti della sigaretta HNBC con quelli della TC, sulla funzione miocardica, coronarica e arteriosa, nonché sullo stress ossidativo e sull'attivazione piastrinica in 75 fumatori. Lo studio, articolato in una fase acuta e una cronica ha rilevato una riduzione significativa dei livelli plasmatici di trombossano (Tx) B2, valido marcatore di attivazione piastrinica, dopo 60 minuti dal

“puffing” di HNBC rispetto alla basale. Al contrario, il fumo di TC ne induceva un aumento. Anche dopo 1 mese di utilizzo di HNBC, i livelli plasmatici di TxB2 risultavano significativamente ridotti, lo stesso non si osservava nel gruppo parallelo di fumatori di TC (42).

Infine, i risultati di un recente studio suggeriscono che le risposte individuali ai nuovi dispositivi come gli HNBC differiscono in modo sostanziale. Infatti, mettendo insieme i dati ottenuti dall'analisi di una popolazione di 60 individui, sono stati identificati gruppi di soggetti che mostrano risposte diverse per parametri di stress ossidativo, aggregazione piastrinica e disfunzione endoteliale dovute alle EVC e HNBC (21). Quindi, l'identificazione di gruppi di soggetti che presentano risposte favorevoli o sfavorevoli per marcatori della funzione cardiovascolare come l'attivazione piastrinica, potrebbe facilitare i fumatori a scegliere di utilizzare HNBC come strategia di riduzione del rischio.

Le evidenze scientifiche inerenti al ruolo dell'HNBC sull'attivazione piastrinica restano ancora poche, dunque, sono necessarie ulteriori indagini a lungo termine che chiariscano gli effetti cardiovascolari cronici di questi nuovi dispositivi per una valutazione corretta del rischio cardiovascolare.

Discussione

Le sigarette *heat-not-burn* (HNBC) sono, ad oggi, considerate una alternativa preferibile alle sigarette convenzionali per la mancanza di prodotti di combustione. Di conseguenza, le sigarette HNBC hanno rapidamente guadagnato popolarità tra i fumatori, i non fumatori e soprattutto tra gli adolescenti (43). In realtà, l'assenza di combustione non significa assenza di danno aterosclerotico e di assorbimento di

sostanze potenzialmente dannose. Infatti, la maggior parte delle sostanze dannose del fumo di sigaretta derivano dall'incompleta combustione del tabacco (pirolisi) e dalla degradazione termogenica (44). I livelli di queste emissioni, pur essendo inferiori a quelli delle sigarette tradizionali, sono potenzialmente dannose (nicotina, particolato, benzene, acroleina e nitrosamine) per la salute cardiovascolare (12). Anche se un recente studio su una popolazione asiatica ha evidenziato una riduzione del rischio cardiovascolare per i fumatori che da sigaretta tradizionale sono passati ad HNBC, occorre sottolineare che la riduzione del rischio cardiovascolare maggiore è stata osservata nei soggetti che hanno cessato di fumare (45). Come evidenziato da questa *review*, le HNBC provocano disfunzione endoteliale ed aumento dell'attivazione piastrinica, attraverso meccanismi legati all'aumento dell'infiammazione e dello stress ossidativo, sia in acuto che in cronico. Pertanto, i fumatori di HNBC potrebbero essere maggiormente esposti ad aterosclerosi e complicanze tromboemboliche. L'abolizione del fumo, sia da sigaretta tradizionale che HBNC, è l'obiettivo da perseguire per evitare danni alla salute.

In conclusione, i nuovi prodotti *heat-not-burn* non sono esenti da rischi per la salute e, seppur in misura minore rispetto alla sigaretta tradizionale, sembrano avere un impatto significativo sulla salute cardiovascolare con meccanismi in gran parte sovrapponibili a quelli osservati nel fumo di tabacco caratterizzati da attivazione piastrinica e disfunzione endoteliale. Tuttavia, non sono ancora disponibili dati comparativi indipendenti sia sull'impatto dopo una lunga esposizione alle HNBC su funzione vascolare, stress ossidativo, attivazione piastrinica negli adulti fumatori sia sull'esposizione al fumo passivo delle HNBC sui

bambini. Quindi, la recente storia di questi prodotti e gli evidenti limiti di carattere etico imposti alle ricerche sul campo rendono

necessari maggiori sforzi volti alla creazione di evidenze scientifiche sempre più solide sull'argomento.

RIASSUNTO

Il fumo di tabacco ha un impatto significativo su tutte le fasi del processo aterotrombotico, contribuendo alla disfunzione endoteliale, allo stress ossidativo, all'attivazione delle piastrine e allo sviluppo della placca aterotrombotica. Negli ultimi anni in alternativa alla sigaretta tradizionale si sono diffuse le sigarette a tabacco riscaldato non bruciate (heat-not-burn cigarette) (HNBC). Sono ancora però poco chiari gli effetti delle HNBC sull'apparato cardiovascolare ed i meccanismi fisiopatologici che ne sono alla base. Scopo di questa *review* è di analizzare gli effetti delle HNBC sulla disfunzione endoteliale e l'attivazione piastrinica e di valutare gli effetti sulla salute dei fumatori.

Parole chiave: *Fumo di tabacco, aterosclerosi, stress ossidativo, infiammazione.*

Bibliografia

1. Collaborators GBDT. Smoking prevalence and attributable disease burden in 195 countries and territories, 1990-2015: a systematic analysis from the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet*. 2017; 389: 1885-906.
2. Ambrose JA, Barua RS. The pathophysiology of cigarette smoking and cardiovascular disease: an update. *J Am Coll Cardiol*. 2004; 43: 1731-7.
3. Loffredo L, Zicari AM, Occasi F, Perri L, Carnevale R, Angelico F, et al. Role of NADPH oxidase-2 and oxidative stress in children exposed to passive smoking. *Thorax*. 2018; 73: 986-8.
4. Messner B, Bernhard D. Smoking and cardiovascular disease: mechanisms of endothelial dysfunction and early atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014; 34: 509-15.
5. Mazzone A, Cusa C, Mazzucchelli I, Vezzoli M, Ottini E, Ghio S, et al. Cigarette smoking and hypertension influence nitric oxide release and plasma levels of adhesion molecules. *Clin Chem Lab Med*. 2001; 39: 822-6.
6. Tappia PS, Troughton KL, Langley-Evans SC, Grimble RF. Cigarette smoking influences cytokine production and antioxidant defences. *Clin Sci (Lond)*. 1995; 88: 485-9.
7. Violi F, Sanguigni V, Carnevale R, Plebani A, Rossi P, Finocchi A, et al. Hereditary deficiency of gp91 (phox) is associated with enhanced arterial dilatation: results of a multicenter study. *Circulation*. 2009; 120: 1616-22.
8. Violi F, Carnevale R, Loffredo L, Pignatelli P, Galin JI. NADPH Oxidase-2 and Atherothrombosis: Insight From Chronic Granulomatous Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2017; 37: 218-25.
9. Nocella C, Biondi-Zoccai G, Sciarretta S, Peruzzi M, Pagano F, Loffredo L, et al. Impact of Tobacco Versus Electronic Cigarette Smoking on Platelet Function. *Am J Cardiol*. 2018; 122: 1477-81.
10. Basaran R, Guven NM, Eke BC. An Overview of iQOS® as a New Heat-Not-Burn Tobacco Product and Its Potential Effects on Human Health and the Environment. *Turk J Pharm Sci*. 2019; 16: 371-4.
11. Glantz SA. Heated tobacco products: the example of iQOS. *Tob Control*. 2018; 27: s1-s6.
12. Fried ND, Gardner JD. Heat-not-burn tobacco products: an emerging threat to cardiovascular health. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2020; 319: H1234-H9.
13. Liu X, Lugo A, Spizzichino L, Tabuchi T, Pacifici R, Gallus S. Heat-not-burn tobacco products: concerns from the Italian experience. *Tob Control*. 2019; 28: 113-4.
14. Lempert LK, Glantz S. Analysis of FDA's iQOS marketing authorisation and its policy impacts. *Tob Control*. 2020.
15. Corretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ, Celermajer D, Charbonneau F, Creager MA, et al. Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: a report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force. *J Am Coll Cardiol*. 2002; 39: 257-65.
16. Gurovich AN, Avery JC, Holtgrieve NB, Braith RW. Flow-mediated dilation is associated with endothelial oxidative stress in human venous endothelial cells. *Vasc Med*. 2014; 19: 251-6.
17. Violi F, Loffredo L, Carnevale R, Pignatelli P, Pastori D. Atherothrombosis and Oxidative Stress: Mechanisms and Management in Elderly. *Antioxid Redox Signal*. 2017; 27: 1083-124.

18. Ras RT, Streppel MT, Draijer R, Zock PL. Flow-mediated dilation and cardiovascular risk prediction: a systematic review with meta-analysis. *Int J Cardiol.* 2013; 168: 344-51.
19. Giebe S, Hofmann A, Brux M, Lowe F, Breheny D, Morawietz H, et al. Comparative study of the effects of cigarette smoke versus next generation tobacco and nicotine product extracts on endothelial function. *Redox Biol.* 2021; 47: 102150.
20. Biondi-Zoccai G, Sciarretta S, Bullen C, Nocella C, Violi F, Loffredo L, et al. Acute Effects of Heat-Not-Burn, Electronic Vaping, and Traditional Tobacco Combustion Cigarettes: The Sapienza University of Rome - Vascular Assessment of Proatherosclerotic Effects of Smoking (SUR-VAPES) 2 Randomized Trial. *J Am Heart Assoc.* 2019; 8: e010455.
21. Frati G, Carnevale R, Nocella C, Peruzzi M, Marullo AGM, De Falco E, et al. Profiling the Acute Effects of Modified Risk Products: Evidence from the SUR-VAPES (Sapienza University of Rome-Vascular Assessment of Proatherosclerotic Effects of Smoking) Cluster Study. *Curr Atheroscler Rep.* 2020; 22: 8.
22. Nabavizadeh P, Liu J, Havel CM, Ibrahim S, Derakhshandeh R, Jacob Iii P, et al. Vascular endothelial function is impaired by aerosol from a single iQOS Heat Stick to the same extent as by cigarette smoke. *Tob Control.* 2018; 27: s13-s9.
23. Loffredo L, Carnevale R, Battaglia S, Marti R, Pizzolo S, Bartimoccia S, et al. Impact of chronic use of heat-not-burn cigarettes on oxidative stress, endothelial dysfunction and platelet activation: the SUR-VAPES Chronic Study. *Thorax.* 2021; 76: 618-20.
24. Loffredo L, Zicari AM, Occasi F, Perri L, Carnevale R, Battaglia S, et al. Passive Smoking Exacerbates Nicotinamide-Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidase Isoform 2-Induced Oxidative Stress and Arterial Dysfunction in Children with Persistent Allergic Rhinitis. *J Pediatr.* 2018; 202: 252-7.
25. Willoughby S, Holmes A, Loscalzo J. Platelets and cardiovascular disease. *Eur J Cardiovasc Nurs.* 2002; 1: 273-88.
26. Eikelboom JW, Hankey GJ, Thom J, Bhatt DL, Steg PG, Montalescot G, et al. Incomplete inhibition of thromboxane biosynthesis by acetylsalicylic acid: determinants and effect on cardiovascular risk. *Circulation.* 2008; 118: 1705-12.
27. Pastori D, Pignatelli P, Carnevale R, Violi F. NOX2 up-regulation and platelet activation: Novel insights. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2015; 120: 50-5.
28. Dayal S, Wilson KM, Motto DG, Miller FJ, Jr., Chauhan AK, Lentz SR. Hydrogen peroxide promotes aging-related platelet hyperactivation and thrombosis. *Circulation.* 2013; 127: 1308-16.
29. Frishman WH, Burns B, Atac B, Alturk N, Altajar B, Lerrick K. Novel antiplatelet therapies for treatment of patients with ischemic heart disease: inhibitors of the platelet glycoprotein IIb/IIIa integrin receptor. *American heart journal.* 1995; 130: 877-92.
30. Body SC. Platelet activation and interactions with the microvasculature. *Journal of cardiovascular pharmacology.* 1996; 27 (Suppl. 1): S13-25.
31. Piepoli MF, Hoes AW, Agewall S, Albus C, Brotons C, Catapano AL, et al. European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: The Sixth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of 10 societies and by invited experts). Developed with the special contribution of the European Association for Cardiovascular Prevention & Rehabilitation (EACPR). *European heart journal.* 2016; 37: 2315-81.
32. Ikonomidis I, Vlastos D, Kourea K, Kostelli G, Varoudi M, Pavlidis G, et al. Electronic Cigarette Smoking Increases Arterial Stiffness and Oxidative Stress to a Lesser Extent Than a Single Conventional Cigarette: An Acute and Chronic Study. *Circulation.* 2018; 137: 303-6.
33. Farsalinos K, Tsiapras D, Kyrzopoulos S, Voudris V. Acute and chronic effects of smoking on myocardial function in healthy heavy smokers: a study of Doppler flow, Doppler tissue velocity, and two-dimensional speckle tracking echocardiography. *Echocardiography.* 2013; 30: 285-92.
34. Celermajer DS, Sorensen KE, Georgakopoulos D, Bull C, Thomas O, Robinson J, et al. Cigarette smoking is associated with dose-related and potentially reversible impairment of endothelium-dependent dilation in healthy young adults. *Circulation.* 1993; 88: 2149-55.
35. Loffredo L, Carnevale R, Perri L, Catasca E, Augelletti T, Cangemi R, et al. NOX2-mediated arterial dysfunction in smokers: acute effect of dark chocolate. *Heart.* 2011; 97: 1776-81.
36. Lupia E, Bosco O, Goffi A, Poletto C, Locatelli S, Spatola T, et al. Thrombopoietin contributes to enhanced platelet activation in cigarette smokers. *Atherosclerosis.* 2010; 210: 314-9.
37. Carnevale R, Loffredo L, Pignatelli P, Nocella C, Bartimoccia S, Di Santo S, et al. Dark chocolate inhibits platelet isoprostanes via NOX2 down-regulation in smokers. *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH.* 2012; 10: 125-32.
38. Ikonomidis I, Tzortzis S, Paraskevaidis I, Triantafyllidi H, Papadopoulos C, Papadakis I, et al.

- Association of abnormal coronary microcirculatory function with impaired response of longitudinal left ventricular function during adenosine stress echocardiography in untreated hypertensive patients. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging*. 2012; 13: 1030-40.
39. Schaller JP, Keller D, Poget L, Pratte P, Kaelin E, McHugh D, et al. Evaluation of the Tobacco Heating System 2.2. Part 2: Chemical composition, genotoxicity, cytotoxicity, and physical properties of the aerosol. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2016; 81 (Suppl. 2): S27-S47.
 40. Biondi Zoccai G, Carnevale R, Vitali M, Tritapepe L, Martinelli O, Macrina F, et al. A randomized trial comparing the acute coronary, systemic, and environmental effects of electronic vaping cigarettes versus heat-not-burn cigarettes in smokers of combustible cigarettes undergoing invasive coronary assessment: rationale and design of the SUR-VAPES 3 trial. *Minerva Cardioangiol*. 2020; 68: 548-55.
 41. Bosilkovska M, Tran CT, de La Bourdonnaye G, Taranu B, Benzimra M, Haziza C. Exposure to harmful and potentially harmful constituents decreased in smokers switching to Carbon-Heated Tobacco Product. *Toxicol Lett*. 2020; 330: 30-40.
 42. Ikonomidis I, Vlastos D, Kostelli G, Kourea K, Katogiannis K, Tsoumani M, et al. Differential effects of heat-not-burn and conventional cigarettes on coronary flow, myocardial and vascular function. *Sci Rep*. 2021; 11: 11808.
 43. Ratajczak A, Jankowski P, Strus P, Feleszko W. Heat Not Burn Tobacco Product-A New Global Trend: Impact of Heat-Not-Burn Tobacco Products on Public Health, a Systematic Review. *Int J Environ Res Public Health*. 2020; 17.
 44. Auer R, Concha-Lozano N, Jacot-Sadowski I, Cornuz J, Berthet A. Heat-Not-Burn Tobacco Cigarettes: Smoke by Any Other Name. *JAMA Intern Med*. 2017; 177: 1050-2.
 45. Choi S, Lee K, Park SM. Combined Associations of Changes in Noncombustible Nicotine or Tobacco Product and Combustible Cigarette Use Habits With Subsequent Short-Term Cardiovascular Disease Risk Among South Korean Men: A Nationwide Cohort Study. *Circulation*. 2021; 144: 1528-38.

FISIOPATOLOGIA DELL'ATEROSCLEROSI

RUOLO DEI RECETTORI DELLE CHEMOCHINE INFIAMMATORIE NELL'ATEROSCLEROSI

Role of inflammatory chemokine receptors in atherosclerosis

EUSABETTA CAIAZZO^{1,2}, DANILA GURGONE², ARMANDO IALENTI¹, PASQUALE MAFFIA^{2,1}

¹Dipartimento di Farmacia, Scuola di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi di Napoli Federico II, Napoli;

²Institute of Infection, Immunity and Inflammation, College of Medical, Veterinary and Life Sciences, University of Glasgow, Glasgow, Regno Unito

SUMMARY

The chemokine network specifically orchestrates the trafficking of immune cells in both homeostasis and during inflammation. Although several studies support an important pathogenic role of inflammatory chemokines and their receptors in atherosclerosis, potentially representing attractive therapeutic targets in the pathology, there is no clinical application of drugs targeting chemokine receptors for the treatment of cardiovascular diseases. Inflammatory chemokines are generated by any cell type in the atherosclerotic vessel wall and can interact with multiple inflammatory chemokine receptors. However, redundancy, ligand sharing and overlapping expression patterns typify the inflammatory chemokine/receptor system. Accordingly, we have an insufficient understanding of the complex roles played by individual, and combination of, chemokine receptors in regulating vascular inflammation, which has precluded the development of targeted therapies. Most of the clinical trials are in phase II and do not show any statistically significant results, some of them are ongoing or completed but results are still not available. This article summarizes the major clinical trials targeting inflammatory chemokines and their receptors and proposes a novel experimental strategy that could overcome the main barrier to their use as anti-inflammatory therapies in cardiovascular diseases.

Keywords: *Atherosclerosis, chemokines, clinical trials, inflammatory chemokine receptors, vascular inflammation.*

Introduzione

L'aterosclerosi e le sue manifestazioni cliniche sono le principali cause di mortalità nel mondo. Considerata l'origine multifattoriale della malattia è importante disporre di diverse opzioni terapeutiche che prendano di mira i meccanismi causali di

Indirizzo per la corrispondenza

Pasquale Maffia
University of Glasgow, Università degli Studi di Napoli Federico II, Napoli
E-mail: Pasquale.Maffia@glasgow.ac.uk

questa patologia. Negli ultimi 30 anni, la ricerca di base ha dimostrato in modo inequivocabile il ruolo causale delle risposte immuno-infiammatorie nell'aterosclerosi e, quindi, il potenziale teorico di manipolare la risposta infiammatoria per prevenire eventi cardiovascolari. Ipotesi confermata nel 2017 con la pubblicazione dello studio CANTOS (*Canakinumab Antiinflammatory Thrombosis Outcome Study*) (1, 2), prima dimostrazione clinica che la riduzione dell'infiammazione vascolare è utile nella prevenzione secondaria degli eventi cardiaci avversi maggiori (*major adverse cardiac events*, MACE).

È noto che l'aterosclerosi accelera il reclutamento delle cellule immunitarie nei vasi arteriosi, sia nelle fasi iniziali che in quelle avanzate della patologia (3, 4). Il nostro gruppo di ricerca ha dimostrato in modelli murini che il *trafficking* ed il *priming* locale dei linfociti T naïve a livello aortico contribuisce al processo aterosclerotico (5-8). Nelle fasi avanzate della patologia, le cellule immunitarie migrano nel tessuto connettivo avventiziale che avvolge le arterie per formare organi linfoidi terziari indicati come ATLOs (*artery tertiary lymphoid organs*). Questi aggregati linfoidi sono in grado di controllare *in situ* la risposta vascolare delle cellule T, bypassando gli organi linfoidi secondari (9, 10). Più recentemente, tecniche innovative come la citometria di massa (*cytometry by time-of-flight*, CyTOF) ed il sequenziamento dell'RNA a singola cellula (*single-cell RNA sequencing*) hanno permesso una mappatura completa dei diversi sottotipi di cellule immuni presenti all'interno dei vasi aterosclerotici (11).

Ruolo delle chemochine infiammatorie e dei loro recettori nell'aterosclerosi

La migrazione dei leucociti nei vasi aterosclerotici è regolata in gran parte dalle

chemochine, proteine a basso peso molecolare (8-12 kD) tutte strutturalmente omologhe e provviste di uno o due ponti disolfuro. Possono essere monomeri, dimeri o oligomeri. La famiglia delle chemochine è suddivisa, in base al numero ed alla posizione dei residui di cisteina collocati nella regione N-terminale, nelle seguenti sottoclassi: CC, CXC, XC e CX₃C (12). Le chemochine si legano a recettori appartenenti alla famiglia dei recettori accoppiati a proteine G (*G-Protein Coupled Receptors*, GPCR) con sette domini transmembrana comprendenti due famiglie: 19 recettori convenzionali (*conventional chemokine receptors*, cCKRs) e 4 recettori "atipici" (*atypical chemokine receptors* ACKRs) (13). Le chemochine possono essere ulteriormente classificate in chemochine infiammatorie e chemochine omeostatiche. Mentre le chemochine infiammatorie sono indotte in risposta a stimoli pro-infiammatori e promuovono il rapido reclutamento di cellule immunitarie nei siti di infezione, flogosi e danno tissutale, le chemochine omeostatiche ed i loro recettori sono costitutivamente espresse e regolano il traffico basale dei leucociti all'interno e all'esterno dei tessuti periferici e degli organi linfoidi secondari. L'espressione dei recettori omeostatici delle chemochine risulta ridotta sui leucociti, contrariamente, i recettori delle chemochine infiammatorie (*inflammatory chemokine receptors*, iCCRs) sono ampiamente espressi sulle cellule infiammatorie (Tabella 1). Inoltre, mentre i recettori omeostatici delle chemochine legano al massimo due chemochine, i recettori delle chemochine infiammatorie legano numerose chemochine (Tabella 2) (14, 15).

Diversi studi genetici nell'uomo hanno collegato i polimorfismi a singolo nucleotide nei geni dei recettori C-C per le chemochine alla malattia cardiometabolica (16-19). Questi recettori ed i loro molteplici

ci ligandi sono espressi durante l'infiammazione vascolare e sebbene siano stati ampiamente studiati nell'aterosclerosi, c'è ancora un vivace dibattito relativo al ruolo dei singoli recettori nella formazione e nello sviluppo di tale patologia (20-22). Dibattito evidente se si guarda agli articoli pubblicati nell'ultimo decennio sul reclutamento dei monociti nelle placche aterosclerotiche. Nel 2007, Tacke et al. hanno mostrato che CCR2, CCR5 e CX3CR1 sono necessari per il reclutamento dei monociti nella placca (23). Più recentemente, tuttavia, è stato dimostrato che CCR1 e CCR5 ma non CCR2 o CX3CR1 sono necessari per il reclutamento dei monociti (24). Sembra dunque che il ruolo generale di CCR1, CCR2 e CCR5 nella formazione dell'ateroma sia contraddittorio. I topi deficienti di CCR2 e CCR5 sviluppano meno aterosclerosi; al contrario, i topi deficienti di CCR1 mostrano una maggiore formazione di placca (25-28) con una risposta Th1 pro-aterogena (29). Più recentemente, è stato dimostrato che la neutralizzazione farmacologica di CCR2 riduce il processo aterosclerotico ma non influenza il reclutamento microvascolare dei leucociti (30). Sebbene CCR3 sia espresso in placche aterosclerotiche umane (31), non è stato ad oggi studiato in modelli animali. I risultati contraddittori suggeriscono che il ruolo di alcune chemochine varia a seconda delle fasi dello sviluppo dell'aterosclerosi, rendendo lo studio dell'attività biologica delle chemochine infiammatorie e dei loro recettori nella patologia estremamente complesso.

In questo articolo abbiamo esaminato il potenziale clinico delle strategie terapeutiche basate sul sistema chemochine infiammatorie/recettori nonché la relativa complessità del *targeting* farmacologico di questa famiglia di molecole. Abbiamo anche discusso nuove strategie sperimen-

Tabella 1 - Espressione dei recettori infiammatori delle chemochine (iCCRs) sulle cellule immuni.

Cellule	Recettori
Neutrofilii	CCR1, CCR2, CXCR2
Monociti	CCR1, CCR2, CCR5, CX3CR1
Macrofagi	CCR1, CCR2, CCR5, CX3CR1
Mastociti	CCR1, CCR2, CCR5, CXCR2
Basofili	CCR1, CCR2, CCR3, CCR5
Eosinofili	CCR1, CCR3
Cellule Natural Killer	CCR1, CCR2, CCR5, CX3CR1

Tabella 2 - Promiscuità dei recettori delle chemochine infiammatorie.

Recettore omeostatico	Chemochine
CCR7	CCL19, 21
CCR9	CCL25
CCR10	CCL27, 28
Recettore infiammatorio	Chemochine
CCR1	CCL3, 5, 6, 7, 8, 9, 13, 14, 15, 16, 23
CCR2	CCL2, 7, 8, 12, 13, 16
CCR3	CCL2, 3, 5, 7, 8, 11, 13, 15, 24, 26, 28
CCR5	CCL3, 4, 5, 7, 8, 11, 14, 16
CXCR2	CXCL1, 2, 3, 5, 6, 7, 8

tali per superare gli ostacoli riguardanti lo sviluppo di terapie mirate a chemochine infiammatorie ed ai loro recettori per il trattamento delle patologie cardiovascolari.

Studi clinici

I principali studi clinici su patologie cardiovascolari che prendono in considerazione le chemochine infiammatorie e/o i loro recettori come possibili bersagli terapeutici sono riportati in *Tabella 3*.

MLN1202 è un anticorpo monoclonale che interagisce con CCR2 ed inibisce il

Tabella 3 - Principali studi clinici su patologie cardiovascolari che prendono in considerazione le chemochine infiammatorie o i loro recettori come possibili bersagli terapeutici registrati su <http://www.clinicaltrials.gov> o EudraCTR.

Farmaco	Target	Condizione	Fase trial	Scopo dello studio	Risultati principali	Identificativo
MLN1202 (Anticorpo monoclonale umanizzato)	CCR2	Aterosclerosi	Fase II	Effetto sui livelli sierici di proteina C-reattiva	Riduzione significativa dei livelli sierici di proteina C-reattiva	NCT00715169
Maraviroc (antagonista recettoriale)	CCR5	Infezione da HIV con aterosclerosi	Fase IV	Efficacia in pazienti affetti da HIV con aterosclerosi	Significativo miglioramento di FMD, cfPWV, IMT rispettivamente del 66%, 11% e 13%. Effetto benefico sul rapporto EMP/ EPCs (P<.001) e piastrine/aggregati di leucociti (P=.013)	NCT03402815
Bindarit (inibitore di NF-κB)	CCL2, CCL7, CCL8	Restenosi in pazienti sottoposti a PCI	Fase II	Efficacia e sicurezza dopo PCI	Riduzione non statisticamente significativa della perdita tardiva di lume all'interno senza effetti sugli eventi avversi cardiovascolari maggiori	NCT01269242
JVS-100 (plasmide a DNA non virale)	CXCL12	Insufficienza cardiaca	Fase II	Efficacia e sicurezza; valutazione del 6MWT e MLHFQ a 4 mesi di follow-up	Sicurezza di un singolo dosaggio endocardico, nessun miglioramento di 6MWT e MLHFQ a 4 mesi dal trattamento	NCT01643590
ACRX-100 (plasmide a DNA non virale)	CXCL12	Insufficienza cardiaca	Fase I	Sicurezza, tollerabilità ed efficacia sulla funzione cardiaca	Completato, risultati non ancora disponibili	NCT01082094
POL6326 (antagonista recettoriale)	CXCR4	Infarto acuto del miocardico	Fase II	Effetto su mobilitazione di cellule staminali, funzione cardiaca, dimensione dell'infarto e su sicurezza e tollerabilità	Completato, risultati non ancora disponibili	NCT01905475; EudraCT 2012-003229-91
AZD5069 (antagonista recettoriale)	CXCR2	PCI nella malattia coronarica	Fase II	Effetto sulla funzione cardiaca (riserva frazionale di flusso; funzione diastolica) e sull'infiammazione vascolare	In corso, risultati non ancora disponibili	EudraCT 2016-000775-24

FMD = dilatazione flusso-mediata dell'arteria brachiale; cfPWV = velocità dell'onda di polso carotideo-femorale; IMT = spessore intima-media carotideo; EMP = microparticelle endoteliali circolanti; EPCs = cellule progenitrici endoteliali; PCI = intervento coronarico percutaneo; 6MWT = *Six minute walking test*; MLHFQ = *Minnesota living heart failure questionnaire*; NF-κB = Nuclear factor kappa-B.

legame con il suo ligando *chemokine (C-C motif) ligand 2* (CCL2) anche conosciuto come *monocyte chemoattractant protein 1* (MCP1). MLN1202 è stato utilizzato in uno studio di fase II randomizzato (112 pazienti), in doppio cieco, controllato verso placebo, per analizzare l'effetto dell'inibizione di CCR2 sui livelli sierici di proteina C-reattiva. L'antagonismo CCR2 da parte di MLN1202 ha mostrato una riduzione dei livelli sierici di proteina C-reattiva nei soggetti a più alto rischio di aterosclerosi (32). Tuttavia, sarà necessario uno studio di fase III per valutare l'effettiva efficacia di MLN1202 nel ridurre eventi cardiaci avversi maggiori. Un altro studio clinico di fase II randomizzato è stato disegnato al fine di valutare l'effetto di MLN1202 sull'infiammazione vascolare in pazienti con malattia vascolare aterosclerotica (malattia coronarica, arteriopatia periferica, aterosclerosi aortica o aneurisma dell'aorta addominale <5 cm, malattia carotidea o malattia cerebrovascolare) clinicamente stabile per almeno 3 mesi prima dell'inizio del trial. Il trial, tuttavia, non è stato portato a conclusione (Identificativo ClinicalTrials.gov: NCT02388971).

L'aterosclerosi è una complicanza comune nei pazienti affetti da HIV, in particolare durante il trattamento con inibitori della proteasi virali (PI). Maraviroc (Celsentri/Selzentry; Pfizer) è un farmaco antivirale che agisce inibendo il recettore delle chemochine infiammatorie CCR5, una delle proteine chiave per la penetrazione dell'HIV nelle cellule bersaglio. Dati preliminari derivanti da uno studio in cui sono stati confrontati 6 pazienti positivi per HIV trattati con PI e maraviroc per 6 mesi con 9 pazienti arruolati retrospettivamente e trattati con PI suggeriscono un effetto protettivo del farmaco sui parametri infiammatori, metabolici ed endoteliali associati al processo di aterogenesi. Nel-

lo specifico, l'utilizzo di maraviroc è stato associato a miglioramenti significativi del profilo dei trigliceridi, dello spessore medio-intimale carotideo e della rigidità arteriosa, valutata misurando la velocità di propagazione dell'onda sfingica PWV (*pulse wave velocity*, PWV), oltre ad essere stato associato ad una significativa riduzione di citochine pro-infiammatorie (IL-6 e CCL-2) e molecole di adesione solubili (sVCAM e sICAM) (33). Questi risultati supportano i dati ottenuti dal trial MERIT (34) che ha dimostrato un effetto protettivo del maraviroc sui danni dismetabolici indotti dai PI e i risultati di uno studio che ha evidenziato elevati livelli di lipoproteine ad alta densità (HDL) e la diminuzione dei trigliceridi plasmatici in pazienti con una variante naturale del gene CCR5 CCR532 che si traduce in un recettore CCR5 non funzionale (18). Recentemente è stato completato uno studio clinico randomizzato che ha incluso 22 pazienti affetti da HIV ad alto rischio cardiovascolare trattati con maraviroc (35). Il trattamento con maraviroc ha portato a miglioramenti significativi in diversi marcatori di rischio cardiovascolare come disfunzione endoteliale, rigidità arteriosa e aterosclerosi carotidea precoce, accompagnati da un aumento della capacità vascolare, senza alcun effetto rilevante sull'infiammazione sistemica (35). Dati che supportano la necessità di studi più ampi per testare eventuali effetti di maraviroc sulla prevenzione delle patologie aterosclerotiche.

Le chemochine infiammatorie sono coinvolte nella regolazione del processo di restenosi (36). Gli autori di un trial randomizzato di fase II (148 pazienti), in doppio cieco, hanno valutato il potenziale terapeutico di bindarit, che inibisce selettivamente le chemochine CCL2, CCL7 e CCL8, nel prevenire la restenosi nei pazienti sottoposti ad intervento coronarico percutaneo

(37). L'*endpoint* primario era la perdita tardiva intra-segmento (*in-segment late loss*), mentre i principali *endpoint* secondari erano perdita tardiva di lume interno (*in-stent late loss*) e gli eventi cardiovascolari avversi maggiori. Questo è stato uno studio negativo con l'*endpoint* primario non raggiunto. Tuttavia, una significativa riduzione *in-stent late loss* suggerisce che bindarit probabilmente esercita un'azione favorevole sulla parete vascolare dopo l'angioplastica. Bindarit è stato ben tollerato con un tasso di compliance superiore al 90%.

Lo studio di fase II *Stromal Cell-Derived Factor-1 Plasmid Treatment for Patients with Heart Failure* (STOP-HF), in doppio cieco, randomizzato, controllato verso placebo (93 pazienti), ha valutato invece la sicurezza e l'efficacia di un singolo dosaggio endocardico di JVS-100 [un plasmide di DNA non virale, codificante *Stromal Cell Derived Factor 1* (SDF-1), anche conosciuto come *C-X-C motif chemokine 12* (CXCL12)] al fine di migliorare le prestazioni cardiache in pazienti con frazione di eiezione del ventricolo sinistro $\leq 40\%$ (38). Questo studio non è riuscito a dimostrare la significatività statistica sul suo *endpoint* primario, rappresentato da un composito del test del cammino in 6 minuti (6MWT) e della valutazione della qualità della vita (MLHFQ) da basale a 4 mesi di *follow-up*. Tuttavia, attraverso un'analisi predefinita, lo studio STOP-HF ha dimostrato il potenziale di attenuare il rimodellamento ventricolare sinistro e migliorare la frazione di eiezione nella cardiomiopatia ischemica ad alto rischio. Non sono, invece, ancora disponibili i risultati di un altro studio di fase I, non randomizzato, disegnato al fine di valutare la sicurezza e l'efficacia di una singola dose crescente, somministrata tramite iniezione endocardica, di ACRX-100, un plasmide di DNA non virale

progettato per esprimere transitoriamente SDF-1 in 16 pazienti con cardiopatia ischemica (Identificativo ClinicalTrials.gov: NCT01082094). Inoltre, è stato completato uno studio clinico di fase II randomizzato che esamina l'effetto di POL6326, un antagonista di CXCR4, sulla mobilitazione cellulare, sulla funzione cardiaca e sulla dimensione dell'infarto in 120 pazienti con infarto miocardico acuto, ma i risultati non sono ancora disponibili (Identificativo ClinicalTrials.gov: NCT01905475). Un'altra applicazione clinica oggetto di studio è l'uso dell'*imaging* molecolare di CXCR4 (il recettore specifico per SDF-1/CXCL12) come strumento diagnostico nell'aterosclerosi (39). Recentemente, un farmaco con proprietà teranostiche, il pentixather marcato con ^{177}Lu o ^{90}Y , è stato introdotto per l'endoradioterapia a base di radionuclidi (ERT) di neoplasie ematologiche che sovraesprimono CXCR4. L'endoradioterapia diretta da CXCR4 con pentixather marcato in 5 pazienti con mieloma multiplo, ha mostrato di ridurre le lesioni aterosclerotiche (40). Sebbene questo studio preliminare sia caratterizzato da un numero molto limitato di pazienti e un disegno retrospettivo, il *targeting* di CXCR4 dovrebbe essere considerato per applicazioni future e potrebbe aprire una nuova opzione terapeutica per pazienti ad alto rischio di aterosclerosi.

Un trial randomizzato controllato di fase II in corso (Identificativo EudraCT: 2016-000775-24), si propone di valutare se AZD5069, un antagonista di *cysteine-X-cysteine chemokine receptor 2* (CXCR2), sia in grado di variare la riserva di flusso coronarico in 90 pazienti con malattia coronarica sottoposti a intervento coronarico percutaneo (41). L'*endpoint* secondario di questo studio è di correlare l'inibizione di CXCR2 all'alterazione della placca verso placche più stabili e ridotta restenosi.

Discussione

Sebbene un gran numero di molecole che prendono di mira le chemochine infiammatorie ed i loro recettori siano attualmente in fase di sperimentazione clinica, solo poche molecole sono state approvate clinicamente: l'antagonista allosterico CCR5 maraviroc (Celsentri/Selzentry; Pfizer) è approvato per il trattamento dell'HIV; l'antagonista CXCR4 plerixafor (Genzyme Corporation) è stato approvato per mobilitare le cellule staminali emopoietiche per il trapianto autologo in pazienti con linfoma non Hodgkin e mieloma multiplo; il mogamulizumab, un anticorpo monoclonale umanizzato anti-CXCR4, è stato approvato per il trattamento del linfoma cutaneo a cellule T (CTCL) e del linfoma leucemia dell'adulto a cellule T. Non vi è dunque, ad oggi, alcuna applicazione clinica di farmaci che abbiano come *target* le chemochine infiammatorie ed i loro recettori per il trattamento delle malattie cardiovascolari. Il fallimento della maggior parte degli studi di fase II nel raggiungere la significatività statistica e la loro interruzione potrebbe essere dovuta a molteplici fattori. L'espressione e la funzione delle chemochine infiammatorie e dei loro recettori sono alterate nei pazienti con disturbi cardiovascolari e quindi capire con esattezza l'espressione dei diversi iCCR nelle diverse fasi della patologia e nei diversi letti vascolari aiuterebbe a capire come essi possano influenzare il *trafficking* delle cellule immunitarie nell'infiammazione vascolare, nonché il loro contributo in processi come la proliferazione cellulare, la migrazione e l'espressione di citochine. Il quadro è ulteriormente complicato dall'età, dal sesso, dall'etnia e dalle variazioni genetiche, nonché dalle comorbidità con patologie infiammatorie croniche come l'artrite reumatoide che provocano una accelerazione dei processi aterosclerotici. Ostacoli

importanti includono la comprensione limitata del *signalling* delle chemochine, l'elevata ridondanza del sistema, le differenze tra i tipi cellulari e il legame non specifico di antagonisti dei recettori delle chemochine. Comprendere dunque la complessa rete delle chemochine infiammatorie e dei loro recettori, le funzioni effettrici e la regolazione della risposta immunitaria nella patologia cardiovascolare è essenziale per sviluppare future strategie terapeutiche di successo.

Prospettive future e conclusioni

Prospettive future

Gli studi sperimentali condotti soprattutto su modelli murini si sono rivelati indispensabili per chiarire molti dei meccanismi che guidano la biologia del sistema chemochine infiammatorie/recettori nella fisiopatologia dell'aterosclerosi; tuttavia, la mancata capacità di traslare questi risultati nella pratica clinica richiede ulteriori studi sperimentali con approcci diversi che consentano di definire il ruolo individuale ed integrato dei singoli recettori delle chemochine infiammatorie nell'aterosclerosi.

Ridondanza, promiscuità nella condivisione del ligando e modelli di espressione sovrapposti che caratterizzano il *network* delle chemochine infiammatorie non hanno finora consentito una comprensione sufficiente dei complessi ruoli svolti dai singoli recettori delle chemochine infiammatorie e dalla loro combinazione nella regolazione dell'infiammazione vascolare precludendo lo sviluppo di terapie mirate. Ad esempio, i monociti possono esprimere CCR1, 2 e 5 e CX3CR131, e quindi la delezione di un singolo recettore comprometterà, ma non bloccherà completamente, il reclutamento dei monociti. Questo è il motivo per cui i topi deficienti di CCR2 spesso mostrano solo un blocco parziale o ritardato nell'in-

gresso dei monociti nei siti infiammati. Inoltre, gli iCCR possono anche regolare la mobilitazione dei progenitori dal midollo osseo, il reclutamento dal sangue periferico al tessuto infiammato, il movimento e la cinetica cellulare all'interno dei tessuti ed esercitare funzioni non chemiotattiche (21, 30, 42, 43). Pertanto, i modelli esistenti di animali *knockout* per un singolo recettore non possono aiutarci a chiarire la complessità della risposta infiammatoria guidata da iCCR. Anche gli approcci farmacologici sono inadeguati per tali analisi.

Per superare questi problemi, Gerard Graham all'Università di Glasgow ha generato topi con i classici recettori delle chemochine infiammatorie CC (CCR1, 2, 3 e 5) silenziati. Il silenziamento è reversibile e consente di attivare selettivamente ciascun recettore a turno, nonché in combinazioni selezionate. In questo modo è possibile valutare lo specifico ruolo svolto dai singoli recettori in modelli sperimentali di aterosclerosi. Sono stati anche generati topi transgenici in cui i recettori delle chemochine infiammatorie sono resi fluorescenti (topi reporter) e che consentono di studiare *in vivo* come varia la loro espressione nell'infiammazione vascolare in modelli sperimentali di aterosclerosi.

Topi reporter iCCR (GGiREP)

Questi "topi reporter" transgenici forniranno le prime informazioni approfondite sulle dinamiche spazio-temporali dell'espressione di iCCR durante la formazione e lo sviluppo dell'aterosclerosi sperimentale. Questi topi reporter possiedono un BAC (*bacterial artificial chromosome*) inserito casualmente nei loro genomi che codifica per il locus iCCR, ma i geni per gli stessi iCCR sono stati sostituiti con geni che codificano per proteine fluorescenti (CCR3-mTagBFP2, CCR1-Clover, CCR2-mRuby2, CCR5-IRFP682). Questi topi esprimono con-

temporaneamente sia i recettori delle chemochine infiammatorie che le specifiche proteine fluorescenti, consentendo una valutazione diretta dell'espressione temporale e spaziale del recettore delle chemochine nell'aterosclerosi. Questo modello consentirà di tracciare in tempo reale l'espressione dei recettori delle chemochine infiammatorie nell'aterosclerosi sperimentale in diversi stadi e letti vascolari.

Topi null iCCR (TAKO)

In questo ceppo, l'intero cluster iCCR sul cromosoma 9 è stato eliminato, risultando in un topo iCCR KO (CCR1, CCR2, CCR3, CCR5 KO). I topi TAKO sono vitali e sani e non mostrano anomalie dello sviluppo. In condizioni basali questi topi mostrano una marcata diminuzione dei monociti infiammatori circolanti (44). Ciò è prevedibile, poiché CCR2 è necessario per il rilascio dei monociti dal midollo osseo. Utilizzando questi topi, si è recentemente dimostrato che la ridondanza e la specificità del recettore delle chemochine dipende dal contesto. Gli iCCR regolano in modo ridondante popolazioni di cellule mielomonocitiche residenti nei tessuti mentre solo CCR2 controlla il reclutamento di monociti nell'infiammazione acuta (44). Questi topi permetteranno di analizzare e definire l'entità del reclutamento di cellule infiammatorie nel vaso e la formazione di atheroma in assenza di iCCR.

Topi che esprimono singoli iCCR

Il silenziamento di iCCR è reversibile e consente di attivare selettivamente ciascun recettore a turno, nonché in combinazioni selezionate. In questo modo è possibile valutare lo specifico ruolo svolto dai singoli recettori in modelli sperimentali di aterosclerosi. A tal proposito, è stato "ricombinato" l'iCCR BAC murino per

introdurre cassette di arresto 5' affiancate da ricombinasi a ciascun recettore. Questi topi possono essere utilizzati per generare topi che esprimono singoli iCCR o combinazioni di iCCR (a livelli fisiologici) come desiderato. Ciò può essere ottenuto, per ogni iCCR, incrociando con appropriati ceppi di delezione della linea germinale.

Conclusioni

Il ruolo delle chemochine infiammatorie e dei loro recettori nello sviluppo e nella progressione dell'aterosclerosi risulta complesso e non completamente chiarito. La maggior parte delle sperimentazioni cliniche ha rivelato che il *targeting* di tale sistema è un approccio terapeutico promettente in linea di principio, ma sono ancora necessarie ulteriori indagini che ne consentano l'approvazione clinica. Ulteriori studi sui ruoli pato-fisiologici dei recettori delle chemochine infiammatorie nelle patologie cardiovascolari consentirebbe la progettazione di agenti farmacologici migliori e più mirati. Attraverso l'utilizzo dei modelli murini sopra descritti si potranno

ottenere nuove informazioni sul contributo individuale e integrato di iCCR all'infiammazione vascolare e chiarire se il *targeting* individuale oppure in combinazione di questi recettori potrebbe rappresentare un approccio praticabile per limitare la formazione e lo sviluppo dell'aterosclerosi.

Finanziamenti

Pasquale Maffia è finanziato dalla British Heart Foundation (BHF) [grant PG/19/84/34771, FS/19/56/34893A, PG/21/10541, PG/21/10557, PG/21/10634], University of Glasgow Scottish Funding Council and the Global Challenges Research Fund, Wellcome Trust [grant 204820/Z/16/Z], Erasmus+ International Credit Mobility (ICM) [2020-1-UK01-KA107-078782] e FRA 2020 - Linea A University of Naples Federico II/Compagnia di San Paolo; Armando Ialenti dal Ministero dell'Università e della Ricerca (MUR) [PRIN 2017 project grant 2017NKB2N4_003, PRIN 2020 project grant 20203YAY9B_003]; Elisabetta Caiazzo da un grant della European Society of Cardiology (ESC).

RIASSUNTO

La rete delle chemochine guida specificamente il *trafficking* delle cellule immunitarie sia nell'omeostasi che durante l'infiammazione. Sebbene diversi studi indicano un importante ruolo delle chemochine infiammatorie e dei loro recettori nella patogenesi dell'aterosclerosi, rappresentando potenzialmente interessanti bersagli terapeutici per i disturbi aterosclerotici, non esiste un'applicazione clinica di farmaci mirati ai recettori delle chemochine per il trattamento delle malattie cardiovascolari. Le chemochine infiammatorie sono generate da qualsiasi tipo di cellula nella parete del vaso aterosclerotico e possono interagire con più recettori delle chemochine infiammatorie. Tuttavia, la ridondanza, la condivisione del ligando e modelli di espressione sovrapposti caratterizzano il sistema delle chemochine infiammatorie e dei loro recettori. Di conseguenza, abbiamo una comprensione insufficiente dei complessi ruoli svolti dai singoli recettori delle chemochine infiammatorie e dalla loro combinazione nella regolazione dell'infiammazione vascolare, che ha precluso lo sviluppo di terapie mirate. La maggior parte degli studi clinici sono in fase II e non mostrano alcun risultato statisticamente significativo, alcuni di essi sono in corso o completati ma i risultati non sono ancora disponibili. Questo articolo riassume le sperimentazioni cliniche che prendono di mira le chemochine infiammatorie e i loro recettori e propone alcune strategie sperimentali che potrebbero superare la principale barriera al loro utilizzo come terapie anti-infiammatorie nelle malattie cardiovascolari.

Parole chiave: Aterosclerosi, chemochine, test clinici, recettori delle chemochine infiammatorie, infiammazione vascolare.

Bibliografia

1. Maffia P, Guzik TJ. When, where, and how to target vascular inflammation in the post-CANTOS era? *Eur Heart J*. 2019; 40 (30): 2492-4.
2. Liberale L, Montecucco F, Schwarz L, Luscher TF, Camici GG. Inflammation and cardiovascular diseases: lessons from seminal clinical trials. *Cardiovasc Res*. 2021; 117 (2): 411-22.
3. Maffia P, Zinselmeyer BH, Ialenti A, Kennedy S, Baker AH, McInnes IB, et al. Images in cardiovascular medicine. Multiphoton microscopy for 3-dimensional imaging of lymphocyte recruitment into apolipoprotein-E-deficient mouse carotid artery. *Circulation*. 2007; 115 (11): e326-8.
4. Swirski FK, Nahrendorf M, Libby P. Mechanisms of Myeloid Cell Modulation of Atherosclerosis. *Microbiol Spectr*. 2016; 4 (4).
5. Koltsova EK, Garcia Z, Chodaczek G, Landau M, McArdle S, Scott SR, et al. Dynamic T cell-APC interactions sustain chronic inflammation in atherosclerosis. *J Clin Invest*. 2012; 122 (9): 3114-26.
6. MacRitchie N, Grassia G, Sabir SR, Maddaluno M, Welsh P, Sattar N, et al. Plasmacytoid dendritic cells play a key role in promoting atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012; 32 (11): 2569-79.
7. Sage AP, Murphy D, Maffia P, Masters LM, Sabir SR, Baker LL, et al. MHC Class II-restricted antigen presentation by plasmacytoid dendritic cells drives proatherogenic T cell immunity. *Circulation*. 2014; 130 (16): 1363-73.
8. MacRitchie N, Grassia G, Noonan J, Cole JE, Hughes CE, Schroeder J, et al. The aorta can act as a site of naive CD4+ T-cell priming. *Cardiovasc Res*. 2020; 116 (2): 306-16.
9. Hu D, Mohanta SK, Yin C, Peng L, Ma Z, Srikakulapu P, et al. Artery Tertiary Lymphoid Organs Control Aorta Immunity and Protect against Atherosclerosis via Vascular Smooth Muscle Cell Lymphotoxin β Receptors. *Immunity*. 2015; 42 (6): 1100-15.
10. Srikakulapu P, Hu D, Yin C, Mohanta SK, Bontha SV, Peng L, et al. Artery Tertiary Lymphoid Organs Control Multilayered Territorialized Atherosclerosis B-Cell Responses in Aged ApoE^{-/-} Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2016; 36 (6): 1174-85.
11. Cole JE, Park I, Ahern DJ, Kassiteridi C, Danso Abeam D, Goddard ME, et al. Immune cell census in murine atherosclerosis: cytometry by time of flight illuminates vascular myeloid cell diversity. *Cardiovasc Res*. 2018; 114 (10): 1360-71.
12. Rot A, von Andrian UH. Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokine grammar for immune cells. *Annu Rev Immunol*. 2004; 22: 891-928.
13. Murphy PM, Baggiolini M, Charo IF, Hébert CA, Horuk R, Matsushima K, et al. International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol Rev*. 2000; 52 (1): 145-76.
14. Schall TJ, Proudfoot AE. Overcoming hurdles in developing successful drugs targeting chemokine receptors. *Nat Rev Immunol*. 2011; 11 (5): 355-63.
15. Allen SJ, Crown SE, Handel TM. Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism. *Annu Rev Immunol*. 2007; 25: 787-820.
16. Pai JK, Kraft P, Cannuscio CC, Manson JE, Rexrode KM, Albert CM, et al. Polymorphisms in the CC-chemokine receptor-2 (CCR2) and -5 (CCR5) genes and risk of coronary heart disease among US women. *Atherosclerosis*. 2006; 186 (1): 132-9.
17. Nyquist PA, Winkler CA, McKenzie LM, Yanek LR, Becker LC, Becker DM. Single nucleotide polymorphisms in monocyte chemoattractant protein-1 and its receptor act synergistically to increase the risk of carotid atherosclerosis. *Cerebrovasc Dis*. 2009; 28 (2): 124-30.
18. Hyde CL, Macinnes A, Sanders FA, Thompson JF, Mazzarella RA, Faergeman O, et al. Genetic association of the CCR5 region with lipid levels in at-risk cardiovascular patients. *Circ Cardiovasc Genet*. 2010; 3 (2): 162-8.
19. Golbus JR, Stitzel NO, Zhao W, Xue C, Farrall M, McPherson R, et al. Common and Rare Genetic Variation in CCR2, CCR5, or CX3CR1 and Risk of Atherosclerotic Coronary Heart Disease and Glucometabolic Traits. *Circ Cardiovasc Genet*. 2016; 9 (3): 250-8.
20. White GE, Iqbal AJ, Greaves DR. CC chemokine receptors and chronic inflammation-therapeutic opportunities and pharmacological challenges. *Pharmacol Rev*. 2013; 65 (1): 47-89.
21. Zernecke A, Weber C. Chemokines in atherosclerosis: proceedings resumed. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014; 34 (4): 742-50.
22. Noels H, Weber C, Koenen RR. Chemokines as Therapeutic Targets in Cardiovascular Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2019; 39 (4): 583-92.
23. Tacke F, Alvarez D, Kaplan TJ, Jakubzick C, Spanbroek R, Llodra J, et al. Monocyte subsets differentially employ CCR2, CCR5, and CX3CR1 to accumulate within atherosclerotic plaques. *J Clin Invest*. 2007; 117 (1): 185-94.
24. Soehnlein O, Drechsler M, Döring Y, Lievens D,

- Hartwig H, Kemmerich K, et al. Distinct functions of chemokine receptor axes in the atherogenic mobilization and recruitment of classical monocytes. *EMBO Mol Med.* 2013; 5 (3): 471-81.
25. Boring L, Gosling J, Cleary M, Charo IF. Decreased lesion formation in CCR2^{-/-} mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature.* 1998; 394 (6696): 894-7.
26. Potteaux S, Combadière C, Esposito B, Casanova S, Merval R, Ardouin P, et al. Chemokine receptor CCR1 disruption in bone marrow cells enhances atherosclerotic lesion development and inflammation in mice. *Mol Med.* 2005; 11 (1-12): 16-20.
27. Potteaux S, Combadière C, Esposito B, Lecureuil C, Ait-Oufella H, Merval R, et al. Role of bone marrow-derived CC-chemokine receptor 5 in the development of atherosclerosis of low-density lipoprotein receptor knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006; 26 (8): 1858-63.
28. Brauersreuther V, Zerneck A, Arnaud C, Liehn EA, Steffens S, Shagdarsuren E, et al. Ccr5 but not Ccr1 deficiency reduces development of diet-induced atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007; 27 (2): 373-9.
29. Zerneck A, Liehn EA, Gao JL, Kuziel WA, Murphy PM, Weber C. Deficiency in CCR5 but not CCR1 protects against neointima formation in atherosclerosis-prone mice: involvement of IL-10. *Blood.* 2006; 107 (11): 4240-3.
30. Winter C, Silvestre-Roig C, Ortega-Gomez A, Lemnitzer P, Poelman H, Schumski A, et al. Chrono-pharmacological Targeting of the CCL2-CCR2 Axis Ameliorates Atherosclerosis. *Cell Metab.* 2018; 28 (1): 175-82.e5.
31. Haley KJ, Lilly CM, Yang JH, Feng Y, Kennedy SP, Turi TG, et al. Overexpression of eotaxin and the CCR3 receptor in human atherosclerosis: using genomic technology to identify a potential novel pathway of vascular inflammation. *Circulation.* 2000; 102 (18): 2185-9.
32. Gilbert J, Lekstrom-Himes J, Donaldson D, Lee Y, Hu M, Xu J, et al. Effect of CC chemokine receptor 2 CCR2 blockade on serum C-reactive protein in individuals at atherosclerotic risk and with a single nucleotide polymorphism of the monocyte chemoattractant protein-1 promoter region. *Am J Cardiol.* 2011; 107 (6): 906-11.
33. Piconi S, Pocaterra D, Rainone V, Cossu M, Masetti M, Rizzardini G, et al. Maraviroc Reduces Arterial Stiffness in PI-Treated HIV-infected Patients. *Sci Rep.* 2016; 6: 28853.
34. MacInnes A, Lazzarin A, Di Perri G, Sierra-Madero JG, Aberg J, Heera J, et al. Maraviroc can improve lipid profiles in dyslipidemic patients with HIV: results from the MERIT trial. *HIV Clin Trials.* 2011; 12 (1): 24-36.
35. Francisci D, Pirro M, Schiaroli E, Mannarino MR, Cipriani S, Bianconi V, et al. Maraviroc Intensification Modulates Atherosclerotic Progression in HIV-Suppressed Patients at High Cardiovascular Risk. A Randomized, Crossover Pilot Study. *Open Forum Infect Dis.* 2019; 6 (4): ofz112.
36. Hojo Y, Ikeda U, Katsuki T, Mizuno O, Fukazawa H, Fujikawa H, et al. Chemokine expression in coronary circulation after coronary angioplasty as a prognostic factor for restenosis. *Atherosclerosis.* 2001; 156 (1): 165-70.
37. Colombo A, Basavarajiah S, Limbruno U, Picchi A, Lettieri C, Valgimigli M, et al. A double-blind randomised study to evaluate the efficacy and safety of bindarit in preventing coronary stent restenosis. *EuroIntervention.* 2016; 12 (11): e1385-e94.
38. Chung ES, Miller L, Patel AN, Anderson RD, Mendelsohn FO, Traverse J, et al. Changes in ventricular remodelling and clinical status during the year following a single administration of stromal cell-derived factor-1 non-viral gene therapy in chronic ischaemic heart failure patients: the STOP-HF randomized Phase II trial. *Eur Heart J.* 2015; 36 (33): 2228-38.
39. Weiberg D, Thackeray JT, Daum G, Sohns JM, Kropf S, Wester HJ, et al. Clinical Molecular Imaging of Chemokine Receptor CXCR4 Expression in Atherosclerotic Plaque Using (68) Ga-Pentixafor PET: Correlation with Cardiovascular Risk Factors and Calcified Plaque Burden. *J Nucl Med.* 2018; 59 (2): 266-72.
40. Li X, Kemmer L, Zhang X, Kircher M, Buck AK, Wester HJ, et al. Anti-Inflammatory Effects on Atherosclerotic Lesions Induced by CXCR4-Directed Endoradiotherapy. *J Am Coll Cardiol.* 2018; 72 (1): 122-3.
41. Joseph JP, Reyes E, Guzman J, O'Doherty J, McConkey H, Arri S, et al. CXCR2 Inhibition - a novel approach to treating CoronAry heart DiseAse (CICADA): study protocol for a randomised controlled trial. *Trials.* 2017; 18 (1): 473.
42. Sadik CD, Kim ND, Luster AD. Neutrophils cascading their way to inflammation. *Trends Immunol.* 2011; 32 (10): 452-60.
43. Nahrendorf M, Swirski FK. Cholesterol, CCR2, and monocyte phenotypes in atherosclerosis. *Eur Heart J.* 2017; 38 (20): 1594-6.
44. Dyer DP, Medina-Ruiz L, Bartolini R, Schuette F, Hughes CE, Pallas K, et al. Chemokine Receptor Redundancy and Specificity Are Context Dependent. *Immunity.* 2019; 50 (2): 378-89.e5.

TERAPIA

ADERENZA ALLA TERAPIA IPOLIPEMIZZANTE: PROBLEMI E POSSIBILI SOLUZIONI

Adherence to hypolipidic therapy: problems and possible solutions

MARIA DEL BEN, FRANCESCO BARATTA, FRANCESCO ANGELICO

*Dipartimento di Scienze Cliniche, Internistiche, Anestesiologiche e Cardiovascolari –
Sapienza Università, Roma*

SUMMARY

Poor adherence to the treatment of chronic diseases may seriously compromise the effectiveness of therapy, characterizing itself as a critical element for the health of the population both from the point of view of quality of life and health economics. The causes of low adherence are many and can affect the patient, the doctor, and the healthcare system. Low adherence to lipid-lowering therapy is a widespread phenomenon that may strongly limit the great advantages of lipid reduction in primary and secondary cardiovascular prevention. There are numerous strategies to increase adherence to therapy. They concern the doctor and the patient. Some must be implemented at the time of prescription, others later during follow-up. Increasing therapeutic adherence can have a much greater impact on the health of the population than any other therapeutic advance.

Key words: *Statins, Lipid lowering therapy, Adherence to treatment.*

Introduzione

La moderna terapia ipolipemizzante rappresenta uno dei maggiori progressi della medicina moderna. Essa svolge un ruolo centrale nella riduzione della morbilità e della mortalità dovute alle malattie cardiovascolari, cerebrovascolari e vascolari peri-

feriche. Le statine (inibitori della HMG-CoA reduttasi) rappresentano i farmaci di prima linea nella terapia ipolipemizzante, come chiaramente indicato nelle Linee guida (1.) L'efficacia della riduzione dei lipidi plasmatici è stata dimostrata nell'ambito di numerosi grandi *trial* clinici con statine condotti nel corso degli ultimi 30 anni che hanno confermato, in particolare, i benefici della riduzione del colesterolo LDL sia in prevenzione primaria che in prevenzione secondaria (1,2). Analoga efficacia, più recentemente, è stata osservata nei *trial* clinici con la terapia ipolipemizzante di associazione con

Indirizzo per la corrispondenza

Maria Del Ben
Policlinico Umberto I – I Clinica Medica,
Viale del Policlinico 155, 00161 Roma
E-mail: mariadelben@uniroma1.it

Ezetimibe e con inibitori del PCSK9 (1). Risultati particolarmente significativi sono stati ottenuti in prevenzione primaria nei pazienti con ipercolesterolemia familiare ed altre forme di dislipidemia su base genetica e, in prevenzione secondaria, in quelli con pregressa sindrome coronarica acuta. In entrambe le condizioni, l'impiego della terapia ipolipemizzante ha causato una riduzione significativa della morbilità e mortalità cardiovascolare. Tuttavia, l'efficacia della terapia osservata nell'ambito dei grandi trial clinici randomizzati può riflettersi in benefici "real-life" solo se è presente una buona aderenza alla terapia prescritta (3). E nel caso della terapia ipolipemizzante, l'aderenza alla terapia osservata nel mondo reale è molto più bassa rispetto a quella descritta nei trial clinici con statine sia in monoterapia che in associazione e tende a diminuire con il tempo. Sappiamo inoltre che una minore aderenza alla terapia ipolipemizzante si riflette su una minore efficacia della prevenzione cardiovascolare (4,5).

La bassa aderenza alla terapia farmacologica viene oggi riconosciuta come una delle più preoccupanti condizioni di sanità pubblica, che può riflettersi sulla morbilità, mortalità e costi per l'assistenza (3). La scarsa aderenza alle prescrizioni del medico è la principale causa della poca efficacia delle terapie farmacologiche e rappresenta un aspetto critico da valutare attentamente. Si stima che dal 30 al 50% dei farmaci prescritti per le terapie a lungo termine non venga assunto in modo corretto. In particolare, nel caso delle malattie croniche, la scarsa aderenza alla terapia compromette gravemente l'efficacia del loro trattamento caratterizzandosi come un elemento critico per la salute della popolazione sia dal punto di vista della qualità della vita che dell'economia sanitaria. È pertanto importante conoscerne le cause e identificare gli interventi comportamentali ed organizzativi per

ottenere una migliore aderenza alle prescrizioni. Aumentare l'aderenza terapeutica può avere un impatto sulla salute della popolazione molto maggiore dell'introduzione di nuove terapie. È quindi fondamentale rafforzare la cultura dei pazienti e dei medici sull'importanza della buona aderenza alla terapia per il conseguimento di migliori risultati terapeutici.

Cause della bassa aderenza alla terapia

Generalmente, l'aderenza alla terapia si valuta per mezzo della *compliance*, dell'*aderenza* e della *persistenza*. Altri termini usati occasionalmente sono l'adesione e la concordanza. Nella maggior parte degli studi sono stati definiti buoni aderenti i pazienti che assumevano almeno l'80% della dose del farmaco prescritta o che assumevano la terapia per almeno l'80% dei giorni previsti.

La *compliance* è il grado con cui un paziente, quando assume un farmaco che gli è stato prescritto, rispetta le indicazioni posologiche ed i tempi di assunzione indicati dal medico prescrittore. Il termine suggerisce che il paziente stia seguendo accuratamente, ma in modo passivo, quanto prescritto dal medico. L'*aderenza* è il grado con cui il paziente che assume un farmaco rispetta, dopo averle condivise, le indicazioni di un operatore sanitario. Il termine sottolinea la partecipazione del paziente alla decisione medico-terapeutica. È il prodotto finale di una relazione tra paziente e operatore sanitario che si basa sul rispetto, sulla partecipazione attiva e sulla collaborazione, non sulla coercizione o manipolazione. La non aderenza può essere suddivisa in non aderenza primaria (ovvero il mancato inizio della terapia) e la non aderenza secondaria (cioè la sospensione della terapia). La non aderenza

secondaria può ulteriormente essere classificata come mancata assunzione del farmaco secondo la prescrizione (dose e frequenza della terapia) o come interruzione anticipata del farmaco. La *persistenza* è il tempo che intercorre fra l'inizio e la fine di un trattamento farmacologico prescritto. Numerose sono le cause di bassa aderenza o di sospensione della terapia; alcune sono ovvie e facilmente identificabili, altre sono più sottili e sfuggenti ed eventualmente specifiche per un dato farmaco. Le principali cause possono essere classificate in tre categorie principali: cause legate al paziente, cause legate al medico prescrittore e fattori legati all'organizzazione del sistema sanitario. Molto spesso vi sono interazioni tra le diverse categorie di cause di cattiva aderenza (6-9).

Le principali *cause legate al paziente* comprendono caratteristiche di base quali il basso livello socio-culturale, l'instabilità dell'ambiente familiare, la presenza di comorbidità e le difficoltà pratiche nell'esecuzione della terapia. Talvolta il paziente decide di non curarsi e arriva a negare la presenza della propria malattia, o a considerarla non curabile. Tuttavia, molto spesso prevalgono atteggiamenti volontari quali la mancata comprensione della propria patologia e della sua gravità, la presenza di esperienze negative con precedenti terapie e, soprattutto, la mancanza di fiducia sull'efficacia della terapia e sulla competenza del medico. Inoltre possono anche manifestarsi atteggiamenti di sfida nei confronti del medico o della malattia. Altro motivo di bassa aderenza è dovuto alla delusione per non aver ottenuto i benefici attesi o, esattamente all'opposto, in presenza di effetti positivi, quando il ciclo di cure viene abbandonato in anticipo. Inoltre, ulteriore causa di bassa aderenza può derivare, specialmente negli ultimi tempi, da informazioni derivanti dai canali

social, non filtrate dal medico di riferimento e lasciate alla sola auto interpretazione del paziente. Ultimo aspetto da tenere in considerazione sono i regimi terapeutici complessi basati su politerapie con assunzioni plurime giornaliere che posso indurre, per la loro complessità di gestione, a una scarsa aderenza al piano terapeutico. Infine, per alcuni farmaci, in particolare per le statine, possono essere rilevanti i possibili effetti avversi.

Le principali *cause legate al medico* comprendono la prescrizione di multi-terapie e di regimi complessi, la mancata applicazione delle raccomandazioni delle Linee-guida e il poco interesse a valutare l'aderenza del paziente. Altra importante causa può essere l'insufficiente spiegazione al paziente della sua condizione clinica, dei possibili benefici della terapia prescritta e degli eventuali effetti avversi. Infine, le difficoltà di accesso al medico, la sua specializzazione, le informazioni contrastanti date da più medici e le prescrizioni con sostituzioni fra farmaci equivalenti possono essere altre cause di ridotta aderenza.

Le principali *cause legate al sistema sanitario* riflettono la necessità di ridurre i costi di gestione e la complessità delle procedure amministrative per accedere alle strutture ambulatoriali. Ciò si riflette in una riduzione dei tempi di interazione medico-paziente con una conseguente impossibilità di valutazione dell'aderenza e di attivazione di iniziative al fine di aumentarla. Infine, ultima causa possono essere i costi eccessivi di alcune terapie.

La valutazione complessiva delle numerose cause di bassa aderenza legate al paziente, al medico e al sistema sanitario può aiutare a predire l'andamento della terapia. I fattori maggiormente predittivi sono gli eventuali effetti collaterali della terapia, l'assenza di sintomi della malattia, la complessità del regime terapeutico, la

presenza di depressione e di decadimento cognitivo del paziente e le cattive relazioni medico-paziente. Tutto ciò si rifletterà in un *follow-up* inadeguato e nella perdita di fiducia nella terapia da parte del paziente.

Aderenza alla terapia ipolipemizzante

Nel mondo reale, l'aderenza alla terapia ipolipemizzante è molto più bassa rispetto a quella descritta nei *trial* clinici con statine e numerosi pazienti sospendono la terapia o non raggiungono i *target* terapeutici indicati dalle Linee guida. Ciò è anche facilitato dal fatto che i benefici della terapia non sono immediatamente visibili dal paziente mentre la comparsa di eventuali effetti collaterali può manifestarsi precocemente. Revisioni sistematiche e metanalisi hanno dimostrato che una bassa aderenza alle statine si associa ad un maggiore rischio di eventi cardiovascolari fatali e non fatali e di mortalità per tutte le cause.

Recentemente, una bassa percentuale di soggetti a *target* per il colesterolo LDL è stata dimostrata dallo studio DA VINCI, che ha arruolato 5888 pazienti che avevano ricevuto una terapia ipolipemizzante in 18 paesi europei tra giugno 2017 e novembre 2018 (10). Sia in prevenzione primaria, che in prevenzione secondaria, le statine di moderata intensità in monoterapia erano la terapia più frequente in tutte le categorie di rischio. Rispetto ai *target* di colesterolo LDL indicati nelle Linee guida del 2016 per le differenti categorie di rischio, solo il 54% dei soggetti aveva raggiunto il *target*. Tale proporzione risultava rispettivamente del 63%, 75%, 63% e 39% nei soggetti a basso, moderato, alto e molto alto rischio. Come prevedibile, il *target* di colesterolo LDL veniva raggiunto più facilmente con statine ad alta intensità in monoterapia o in associazione con Ezetimibe o inibitori del

Tabella I - Principali cause di bassa aderenza alla terapia ipolipemizzante.

Cause legate al paziente
Basso livello socio-culturale, instabilità dell'ambiente familiare, età avanzata
Presenza di comorbidità e di poli-terapie
Negazione della malattia e/o della sua possibilità di essere curata
Mancata conoscenza dei possibili benefici della terapia
Assenza di obiettivi chiari della terapia (target di colesterolo LDL)
Esperienze negative con precedenti terapie
Mancanza di fiducia sull'efficacia della terapia o sulla competenza del medico
Informazioni errate derivanti dai social media
Cause legate al medico
Poco tempo dedicato all'informazione del paziente sui possibili benefici della terapia
Poco impegno posto nella valutazione dell'aderenza alla terapia
Prescrizione di multi-terapie e di regimi terapeutici complessi
Prescrizioni con sostituzioni fra farmaci equivalenti
Informazioni in contrasto da parte di medici con specializzazioni differenti
Mancata applicazione delle raccomandazioni delle Linee guida
Cause legate al sistema sanitario
Tempi lunghi per prenotare visite ambulatoriali specialistiche
Poco tempo da dedicare al paziente durante la visita
Rotazione dei medici nello stesso ambulatorio
Complessità degli aspetti burocratico/amministrativi

PCSK9. Prendendo poi in considerazione i soli soggetti in prevenzione secondaria, la proporzione di quelli a *target* si riduceva al 39% e, nei soggetti a rischio molto elevato, al 19% alla luce dei *target* del colesterolo LDL proposti nelle Linee guida del 2019, che, come noto, sono stati ulteriormente ridotti.

Dati simili erano stati ottenuti negli USA in uno studio in 4106 pazienti dopo un pregresso evento coronarico. Meno del 50% venivano trattati secondo le raccomandazioni delle Linee guida per motivi dovuti al paziente (rifiuto o effetti collaterali) o al

medico (colesterolo LDL stabile e controllato). Circa il 30% non era in terapia con statine principalmente per decisione del medico e il 22% assumeva un dosaggio del farmaco inferiore a quello indicato dalle Linee guida a causa della comparsa di effetti collaterali (11).

Questi risultati dimostrano la presenza di un notevole *gap* fra le Linee guida e la pratica clinica e suggeriscono, soprattutto nei soggetti a rischio più elevato, una terapia più intensiva basata sull'impiego maggiore di altre terapie ipolipemizzanti in associazione con le statine ad alta intensità. Tuttavia, nella pratica clinica corrente, sia in prevenzione primaria che in prevenzione secondaria, il mancato raggiungimento

dei *target* può anche essere dovuto a una bassa aderenza alla terapia che può essere largamente subottimale a causa di numerosi fattori legati al paziente, al medico prescrittore e alle strutture sanitarie. Infatti, circa la metà dei pazienti interrompe la terapia entro il primo anno. In particolare, l'aderenza alla terapia diminuisce con il tempo. Ciò è stato ben dimostrato in un ampio studio effettuato in due ospedali di Boston dove sono state studiate le principali cause di sospensione della terapia con statine in oltre 100.000 soggetti ai quali erano state prescritte fra il 2000 e il 2008. Circa la metà dei soggetti aveva sospeso la terapia per un periodo di almeno 12 mesi e le principali motivazioni riferite dal paziente erano "non più necessaria, non più prescritta, interrotta dall'assicurazione o troppo cara". Eventi avversi legati alle statine venivano documentati solo nel 17% dei pazienti e di questi, dopo *rechallenge* con una statina, oltre il 90% era ancora in terapia dopo 1 anno (12).

Una aderenza molto bassa alla terapia con statine è stata osservata anche in Cina, sia nei pazienti in prevenzione primaria che in quelli in prevenzione secondaria. La grande maggioranza delle sospensioni avveniva nel corso dei primi tre mesi dopo la prescrizione delle statine. L'aderenza era di circa il 30 per cento dopo il primo mese e si riduceva fortemente nel secondo e terzo mese sino a raggiungere solo il 10% dopo i primi tre mesi (13).

Un'aderenza subottimale è stata osservata anche in Italia, a Firenze, in una coorte di soggetti che avevano ricevuto una prima prescrizione di statine. A 1 anno di distanza, l'aderenza era bassa nel 26% dei soggetti, bassa/intermedia nel 16.2%, alta/intermedia nel 19.7% e alta nel 41.1%. I soggetti con bassa aderenza erano più giovani ed avevano meno comorbidità (14). Dati simili sono stati osservati in Lombardia in

Tabella 2 - Azioni per migliorare l'aderenza alla terapia ipolipemizzante

A. Interventi da intraprendere al momento della prescrizione della terapia
Promuovere la condivisione del paziente nelle decisioni terapeutiche
Fornire informazioni chiare sui benefici della terapia
Aiutare a rendere il paziente consapevole del proprio rischio cardiovascolare
Definire con chiarezza gli obiettivi della terapia (target di colesterolo LDL)
Informare sulla possibile comparsa di effetti avversi (sintomi muscolari)
B. Interventi da attuare dopo la prescrizione della terapia
Programmare visite periodiche di follow up
Semplificare le procedure amministrative per accedere alle visite ambulatoriali
Attivare sistemi di promemoria per ricordare di assumere i farmaci
Rinforzare i concetti relativi ai benefici della buona aderenza alla terapia
Semplificare i regimi terapeutici complessi
Ridurre il numero di compresse da assumere
Intervenire prontamente (sospensione e/o <i>rechallenge</i>) o rassicurare il paziente nel caso di effetti avversi (sintomi muscolari)

una ampia casistica di soggetti ai quali erano state prescritte le statine. Circa il 60% dei soggetti aveva una bassa o molto bassa aderenza alla terapia e solo il 20% mostrava una buona aderenza. Anche in questo caso, i soggetti meno aderenti erano più giovani ed avevano meno comorbidità (15).

Un interessante studio sull'aderenza alla terapia è stato condotto su una ampia casistica di soggetti anziani ai quali erano state prescritte le statine alla dimissione dopo una sindrome coronarica acuta. Una buona aderenza è stata osservata il circa il 70% dei pazienti. L'aderenza era minore nei pazienti trattati con rivascolarizzazione coronarica rispetto a quelli trattati con terapia medica. Gli autori concludono che l'assenza di sintomi dopo avere effettuato una rivascolarizzazione può spiegare la percezione da parte del paziente di una minore necessità di assumere una terapia medica con statine (16).

In uno studio condotto su 90000 soggetti che iniziavano la terapia con statine, l'aderenza alle precedenti terapie croniche prediceva meglio l'aderenza alla terapia con statine a distanza di 1 anno rispetto alle variabili cliniche e demografiche del paziente (17). Questi risultati venivano confermati in uno studio retrospettivo di coorte, condotto su 22,925 pazienti arruolati nel *the Texas-based Medicare Advantage plan*, in cui in grado di aderenza alla progressiva terapia di base con ACE inibitori, con ARBs e con gli antidiabetici orali si associava con l'aderenza alla terapia con statine a distanza di 1 anno dalla loro prima prescrizione (18). Entrambi gli studi suggeriscono di valutare l'aderenza di base alle terapie croniche per potere predire e migliorare quella alle statine in occasione della loro prima prescrizione.

Una maggiore aderenza è stata descritta in coorti di pazienti con diabete e dislipidemia nei quali l'aderenza alla terapia con

statine era riscontrata in oltre il 70% e dove circa il 40% raggiungeva i valori *target* di colesterolo LDL raccomandato dalle Linee guida (19,20).

Un vasto studio condotto in Canada ha valutato l'effetto della concordanza di età e di genere fra paziente e medico prescrittore sull'aderenza dopo un anno da una prima prescrizione di statine. Lo studio conclude che la concordanza di età e di genere non sono predittori significativi di buona aderenza (21). Infine, nell'ambito del Kaiser Permanente Northern California (KPNC) è stata eseguita un'inchiesta telefonica per valutare le preoccupazioni e le barriere nei confronti della prescrizione delle statine (22). Le priorità più comunemente riportate erano di preferire i cambiamenti dello stile di vita (66%), non gradire i farmaci in generale (59%), e problemi al fegato o ai reni (31%); il motivo più comune per assumere un dosaggio inferiore era avere difficoltà a ricordare di prendere le statine (9%). I soggetti con maggiore consapevolezza di un rischio cardiovascolare elevato avevano meno probabilità di essere non aderenti (22).

Intolleranza alle statine e aderenza alla terapia

Sebbene le statine siano generalmente ben tollerate, l'intolleranza per la comparsa di sintomi muscolari è una causa frequente di bassa aderenza o sospensione della terapia. Tuttavia la reale prevalenza dell'intolleranza è difficile da valutare a causa di criteri diagnostici non ben definiti e per la presenza di sintomi indotti da un effetto nocebo.

L'intolleranza alle statine dovuta alla comparsa di sintomi muscolari è stata valutata retrospettivamente in 16717 pazienti dislipidemicici in trattamento in 23 *Lipid Clinic* italiane afferenti alla SISA. La pre-

valenza di sintomi muscolari era del 9.6%. Tuttavia, dopo *dechallenge* (interruzione del trattamento) e/o *rechallenge* (modifica o ripresa della terapia con statine), vi era ricomparsa dei sintomi muscolari solo nel 3,01% dell'intera casistica (23).

Recentemente una metanalisi condotta su oltre 4 milioni di soggetti trattati con statine ha confermato una prevalenza dell'intolleranza alle statine del 9.1% quando definita sulla base di criteri internazionali, sottolineando come spesso tale prevalenza possa essere sovrastimata (24). La prevalenza dell'intolleranza era significativamente più elevata negli studi di coorte (17%) rispetto a quella osservata nei *trial* clinici randomizzati (4.9%). L'intolleranza alle statine era più elevata tra le donne, nei soggetti con diabete, ipotiroidismo, malattie croniche del fegato e renali e in coloro che assumevano farmaci antiaritmici e calcioantagonisti, confermando pertanto l'importanza di una attenta valutazione clinica del paziente.

Una recente *review* ha valutato i *trial* clinici randomizzati, gli studi di coorte e le *review* sistematiche nei quali sono stati presi in considerazione gli interventi per migliorare l'aderenza alla terapia nei soggetti intolleranti alle statine. Lo studio dimostra che l'aderenza alla terapia può migliorare se si intensifica la cura del paziente e se si effettua un *rechallenge* con la stessa o con un'altra statina (25).

Come migliorare l'aderenza alla terapia ipolipemizzante

Numerose sono le strategie per migliorare la tolleranza e l'aderenza dei pazienti alla terapia ipolipemizzante. Gli interventi per migliorare l'aderenza possono essere effettuati al momento della prima prescrizione della statina o dopo la sua prescrizione (3,6,8-9).

Interventi al momento della prescrizione

Alla base della prima prescrizione di una terapia ipolipemizzante vi deve essere una decisione condivisa sulla terapia tra paziente e medico, fattore fondamentale per una pratica clinica realmente efficace. Inoltre, il paziente deve avere un ruolo attivo nella decisione terapeutica al fine di migliorare la *compliance* (26). Ciò lo aiuta a capire il motivo del trattamento, i benefici che ne possono derivare, incluso il fatto che le statine possono aiutare a prolungare la sua vita e a ridurre il rischio cardiovascolare. Questi concetti è bene siano estesi all'ambiente familiare del paziente che potrà in tal modo supportare l'aderenza alla terapia. In particolare, è importante che il paziente acquisisca una consapevolezza del proprio rischio cardiovascolare in modo da adeguare il suo stile di vita e mantenere nel tempo una buona aderenza alla terapia. Inoltre, è necessario anche che il medico condivida con il paziente gli obiettivi finali della terapia intesi come *target* di colesterolo LDL da raggiungere in relazione al livello di rischio. Tutto ciò potrà offrire al paziente un valido razionale per effettuare la terapia. Infine, il medico deve condividere con il paziente le informazioni relative all'eventuale comparsa di effetti collaterali chiarendo gli eventuali dubbi sulla terapia e come gestirli. In tal modo il paziente sarà in grado di prendere una decisione pienamente informata garantendo una migliore aderenza sul corretto proseguimento della terapia.

Interventi dopo la prescrizione

Dopo la prescrizione della terapia, è necessario attuare un attento monitoraggio che consenta di identificare le eventuali problematiche o effetti avversi da affrontare prontamente con l'attiva partecipazione del paziente. Ciò può realizzarsi attraverso frequenti visite di *follow up*, contatti telefo-

nici, la semplificazione di regimi terapeutici complessi, la collaborazione del personale sociosanitario e l'attivazione di sistemi di *reminder* (promemoria) anche per mezzo dell'impiego di strumenti digitali. È inoltre molto importante intensificare l'assistenza e semplificare le procedure amministrative per l'accesso alle visite di controllo al fine di prolungare i tempi dell'interazione medico paziente e motivare attivamente il paziente al proseguimento della terapia o alle sue eventuali modifiche. Tutti questi interventi potranno essere personalizzati individualmente sulla base delle ragioni specifiche della non aderenza del paziente. In aggiunta, sarà anche utile aumentare le conoscenze sia del medico che del paziente sull'importanza di massimizzare la terapia ipolipemizzante, in particolare nei soggetti a rischio più elevato.

Infine, sarà fondamentale intervenire prontamente nel caso della comparsa di segni di intolleranza alle statine attuando un breve periodo di sospensione della terapia e il *rechallenge* con la stessa statina o una diversa statina (o una dose più bassa).

Conclusione

La terapia ipolipemizzante riduce il rischio cardiovascolare e le statine sono i

farmaci più prescritti per ridurre il colesterolo LDL. Tuttavia, nella pratica clinica, nonostante i documentati benefici in prevenzione primaria e secondaria, molti pazienti riducono l'aderenza alla terapia.

Le cause della ridotta aderenza sono numerose: riguardano il paziente, il medico e l'organizzazione delle strutture sanitarie. Tra le più importanti vi sono la presenza di comorbidità, la mancata comprensione della propria condizione di rischio e la sottovalutazione dei benefici della terapia. Frequente causa di bassa aderenza può essere l'intolleranza alle statine che deve essere attentamente valutata ed eventualmente sottoposta a *rechallenge*. Il miglioramento dell'aderenza si basa principalmente su un diretto coinvolgimento del paziente nel processo decisionale terapeutico aumentando così le motivazioni e la consapevolezza dell'importanza della terapia. Altri efficaci interventi possono essere la semplificazione delle procedure di accesso alle visite di controllo, i periodici promemoria per l'assunzione regolare del farmaco, la semplificazione del regime terapeutico e la pronta valutazione dell'eventuale comparsa di effetti avversi. L'aumento dell'aderenza alla terapia ipolipemizzante può avere effetti più favorevoli dell'introduzione di nuovi farmaci.

RIASSUNTO

La scarsa aderenza alle terapie croniche compromette gravemente l'efficacia del trattamento caratterizzandosi come un elemento critico per la salute della popolazione sia dal punto di vista della qualità di vita che dell'economia sanitaria. Le cause della bassa aderenza sono molteplici e possono interessare il paziente, il medico e il sistema sanitario. La bassa aderenza alla terapia ipolipemizzante è un fenomeno assai diffuso che rischia di limitare fortemente i grandi vantaggi della riduzione dei lipidi in prevenzione cardiovascolare primaria e secondaria. Esistono numerose strategie per aumentare l'aderenza alla terapia. Esse riguardano il medico e il paziente. Alcune vanno attuate al momento della prescrizione, altre successivamente nel corso del *follow up*. Aumentare l'aderenza terapeutica può avere un impatto sulla salute della popolazione molto maggiore di qualunque altro progresso terapeutico.

Parole chiave: Statine, Terapia ipolipemizzante, Aderenza alla terapia.

Bibliografia

- Mach F, Baigent C, Catapano AL, et al. 2019 ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: lipid modification to reduce cardiovascular risk. *Eur Heart J*. 2020; 41:111-188
- Baigent C, Keech A, Kearney P, et al. Efficacy and safety of cholesterol-lowering treatment: prospective meta-analysis of data from 90,056 participants in 14 randomised trials of statins. *Lancet* 2005; 366:1267-1278
- Vonbank A, Agewall S, Kjeldsen KP et al. Comprehensive efforts to increase adherence to statin therapy. *Eur Heart J*. 2017; 38, 2473-2477
- Bouchard MH, Dragomir A, Blais L, et al. Impact of adherence to statins on coronary artery disease in primary prevention. *Br J Clin Pharmacol*. 2007; 63:698-708.
- Perreault S, Dragomir A, Blais L, et al. Impact of better adherence to statin agents in the primary prevention of coronary artery disease. *Eur J Clin Pharmacol*. 2009; 65:1013-1024.
- Bates TR, Connaughton VM, Watts GF. Non-adherence to statin therapy: a major challenge for preventive cardiology. *Expert Opin. Pharmacother*. 2009; 10:2973-2985
- Mauskop A, Borden WB. Predictors of statin adherence. *Curr Cardiol Rep*. 2011; 13:553-558
- Alrais M. Improving statin adherence in patients at risk for cardiovascular disease. *US Pharm*. 2021; 46:6-12
- Maningat P, Gordon BR, Breslow JL. How do we improve patient compliance and adherence to long-term statin therapy? *Curr Atheroscler Rep*. 2013; 15: 291
- Ray KK, Molemans B, Schoonen WM et al. EU-wide cross-sectional observational study of lipid-modifying therapy use in secondary and primary care: the DA VINCI study. *Eur J Prev Cardiol*. 2021; 28, 1279-1289
- Ramsaran E, Preusse P, Sundaesan D et al. Adherence to blood cholesterol treatment guidelines among physicians managing patients with atherosclerotic cardiovascular disease. *Am J Cardiol* 2019; 124,169-175
- Zhang H, Plutzky J, Skentzos S et al. Discontinuation of statins in routine care settings: a cohort study. *Ann Intern Med*. 2013; 158:526-534
- Zhao B, He X, Wu J, Yan S. Adherence to statins and its impact on clinical outcomes: a retrospective population-based study in China. *BMC Cardiovasc Disord*. 2020; 20:282
- Degli Esposti L, Saragoni S, Batacchi P et al. Adherence to statin treatment and health outcomes in an Italian cohort of newly treated patients: results from an administrative database analysis. *Clin Ther*. 2012; 34:190-199
- Corrao G, Conti V, Merlino L et al. Results of a retrospective database analysis of adherence to statin therapy and risk of nonfatal ischemic heart disease in daily clinical practice in Italy. *Clin Ther*. 2010; 32:300-310.
- Kulik A, Shrank WH, Levin R, Choudhry NK. Adherence to statin therapy in elderly patients after hospitalization for coronary revascularization. *Am J Cardiol*. 2011; 107:1409-1414.
- Kumamaru H, Lee MP, Choudhry NK et al. Using previous medication adherence to predict future adherence. *J Manag Care Spec Pharm*. 2018; 24:1146-1155
- Majd Z, Mohan A, Paranjpe R, Abughosh SM. Identifying adherent patients to newly initiated statins using previous adherence to chronic medications. *J Manag Care Spec Pharm*. 2021; 27:186-197
- Alwhaibi M, Altoaimi M, AlRuthia Y et al. Adherence to statin therapy and attainment of LDL cholesterol goal among patients with type 2 diabetes and dyslipidemia. *Patient Prefer Adherence*. 2019; 13:2111-2118
- Parris ES, Lawrence DB, Mohn LA, Long L. Adherence to statin therapy and LDL cholesterol goal attainment by patients with diabetes and dyslipidemia. *Diabetes Care*. 2005; 28:595-599.
- Yao S, Lix L, Teare G, Evans C, Blackburn D. The impact of age and sex concordance between patients and physicians on medication adherence: a population-based study. *Patient Prefer Adherence*. 2022; 16:169-178
- Fung V, Graetz I, Reed M, Jaffe MG - Patient-reported adherence to statin therapy, barriers to adherence, and perceptions of cardiovascular risk. *PLoS ONE* 13(2): e0191817
- Casula M, Gazzotti M, Bonaiti F et al. Reported muscle symptoms during statin treatment amongst Italian dyslipidaemic patients in the real-life setting: the PROSISA Study. *J Intern Med*. 2021; 290:116-128.
- Bytyçi I, Penson PE, Mikhailidis DP et al. Prevalence of statin intolerance: a meta-analysis. *Eur Heart J*. 2022;00, 1-16; <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehac015>
- Reston JT, Buelt A, Donahue MP, et al. Interventions to improve statin tolerance and adherence in patients at risk for cardiovascular disease : a systematic review for the 2020 U.S. Department of Veterans Affairs and U.S. Department of Defense Guidelines for Management of Dyslipidemia. *Ann Intern Med*. 2020; 173:806-812
- Krumholz HM. Treatment of cholesterol 2017. *JAMA*. 2017; 318:417-418

MEDICINA SCIENZA E SOCIETÀ

LDL ELETTRONEGATIVE: INTERVISTA AL DOTT. GABRIELE BITTOLO BON*

LDL electronegatives: interview with dr. Gabriele Bittolo Bon*

*Già primario di Medicina Interna negli Ospedali di Venezia e Mestre;
Già direttore del laboratorio di Fisiopatologia delle Lipoproteine del Centro per lo Studio dell'Aterosclerosi di Venezia

La scuola veneziana del prof. Piero Avogaro, di cui sei stato il massimo esponente, alla fine degli anni 80 del secolo scorso ha iniziato ad occuparsi di LDL modificate, quali sono state le motivazioni?

Sappiamo bene che elevate concentrazioni plasmatiche di lipoproteine a bassa densità (low density lipoproteins, LDL) sono ormai considerate fattore causale di aterosclerosi. Gran parte del colesterolo accumulato nelle lesioni aterosclerotiche è veicolato da LDL, invischiata dal loro legame con i proteoglicani nello spazio sub-endoteliale; la lipoproteina così ritenuta va incontro a modificazioni, per processi di ossidazione, lipolisi o proteolisi, che le conferiscono proprietà aterogene (1). Una volta modificata, la LDL innesca una risposta infiammatoria localizzata e promuove il reclutamento di monociti, che questi nel sub-endotelio assumono funzioni macrofagiche e spazzano le LDL modificate, dando così luogo alla formazione delle cosiddette

foam cells (cellule schiumose); si tratta il primo e più evidente segno di aterosclerosi a livello cellulare. In ogni suo stadio, dalle prime manifestazioni microscopiche, alla placca avanzata, la lesione aterosclerotica si caratterizza infatti per l'accumulo di lipidi intracellulari (soprattutto esteri di colesterolo) in cellule sottoendoteliali, la maggior parte delle quali di origine macrofagica (2). Si ritiene pertanto che uno dei momenti chiave dell'aterogenesi implichi la captazione di LDL ad opera di queste cellule immunitarie. Abbiamo imparato la LDL nativa, anche a concentrazioni molto elevate, non è tuttavia in grado di determinare accumulo di colesterolo nelle cellule macrofagiche umane in coltura (3, 4). Questi rilievi hanno stimolato la ricerca di vie di internalizzazione di LDL diverse dal meccanismo recettoriale classico, così finemente contro-regolato da non consentire un eccesso di colesterolo endocellulare. Si è così supposto che LDL dovesse essere modificata per poter essere riconosciuta dal macrofago e indurre la formazione di

foam cells. Godstein e Brown, gli stessi autori che avevano scoperto il recettore cellulare di LDL nativa, hanno confermato questa ipotesi osservando che, una volta modificata *in vitro* mediante acetilazione, LDL non è più riconosciuta dal suo recettore specifico, ma da uno diverso, chiamato recettore *scavenger*, che lega e internalizza la LDL modificata con un meccanismo non inibito dal contenuto cellulare di colesterolo e pertanto responsabile dell'esorbitante accumulo di colesterolo nelle *foam cells* (4). I recettori *scavenger* dei macrofagi riconoscono altre forme di LDL modificate per via chimica, o coniugate con aldeidi prodotte nel corso dalla loro perossidazione in presenza di rame (5). Nel 1981, Henriksen e collaboratori hanno osservato che LDL incubate con cellule endoteliali in coltura per 12-18 ore vanno incontro ad una serie di modificazioni chimico-fisiche che determinano il loro riconoscimento da parte dei macrofagi, acquisendo una affinità competitiva per lo stesso recettore *scavenger* delle LDL acetilate (6). La modificazione di LDL operata dalle cellule in coltura comporta una perossidazione lipidica, con conversione di lecitina in lisolecitina; può essere riprodotta *in vitro* dall'incubazione con metalli bivalenti, come lo ione rame o ferro, ed è totalmente inibita dagli antiossidanti (6).

Come nasce l'interesse per le LDL elettronegative o LDL(-)?

Attributo comune delle modificazioni di LDL, tali farle perdere affinità con il suo recettore specifico e di renderla affine al recettore *scavenger*, è l'aumento della sua carica negativa.

Durante uno degli abituali incontri per il caffè, con il direttore professor Pietro Avogaro, era emersa l'idea di sfruttare questa caratteristica fisica per cercare di verificare la presenza nel plasma umano di

una LDL modificata. Merita ricordare che il concetto di LDL elettronegativa era stato proposto per la prima volta nel 1979 dal gruppo di Gotto, al Baylor College of Medicine; studiando le caratteristiche delle lipoproteine estratte da lesioni aterosclerotiche dell'aorta umana, si era osservato che queste possiedono una carica elettrica più elettronegativa rispetto alla LDL plasmatica (8).

Il tecnico di laboratorio Giuseppe Cazolato aveva suggerito di verificare l'ipotesi di LDL plasmatiche con diversa carica elettrica utilizzando la tecnica della cromatografia a scambio ionico, capace appunto di discriminare le lipoproteine sulla base della loro carica. Con questa metodica si è ottenuta la separazione di LDL in due frazioni: una maggiore, pari al 90-98%, e una minore, che rende ragione fino al 10% di LDL totale. Fummo così i primi a descrivere la presenza nel plasma umano di una frazione di LDL, eluita ad una forza ionica maggiore di 0,3 M di NaCl, pertanto con carica elettrica più negativa rispetto al grosso della LDL (9). Questa LDL si caratterizza per aver un minor contenuto di fosfolipidi, una maggiore concentrazione di colesterolo libero e di proteine, e un contenuto maggiore di dieni coniugati, soprattutto di esteri di colesterolo. Si osserva inoltre la presenza di aggregati proteici, reattivi agli anticorpi monoclonali anti-apoB. La microscopia elettronica ha documentato nella frazione più elettronegativa una maggior variabilità nelle dimensioni delle particelle lipoproteiche e la tendenza a formare aggregati. Questa LDL, inoltre, ha una ridotta capacità di legame con alcuni anticorpi monoclonali che reagiscono con il dominio recettoriale di apoB e una minore affinità per i recettori specifici dei fibroblasti umani in coltura. Questo comportamento viene mantenuto anche nei confronti dei recettori specifici per LDL nativa nei macrofagi,

senza essere riconosciuta dal recettore *scavenger*; l'effetto netto è che questa frazione più elettronegativa viene internalizzata dai macrofagi meno di LDL acetilate ed anche di LDL con normale carica elettrica. Le modificazioni chimico-fisiche, il contenuto di dieni coniugati e il comportamento con i recettori dei fibroblasti e dei macrofagi ci avevano fatto concludere che la frazione LDL più elettronegativa poteva rappresentare un'aliquota di LDL umane circolanti che ha subito delle modificazioni dovute a fenomeni di tipo perossidativo. Il nostro lavoro, che portava il titolo di *Presence of a modified low-density lipoprotein in humans*, è stato pubblicato nel 1988 su *Arteriosclerosis* (9).

Come è stato accolto il vostro lavoro dalla comunità scientifica?

Certamente con grande interesse. Non mancavano dubbi circa la possibilità che i nostri risultati fossero da attribuirsi ad artefatti nel corso della preparazione delle frazioni lipoproteiche, e anche atteggiamenti decisamente critici. In particolare, le nostre conclusioni sono state duramente osteggiate dal prestigioso gruppo di San Diego, guidato da Steinberg. Si partiva dall'assunto che l'ossidazione di LDL fosse possibile solo nella parete arteriosa, in ambiente subintimale, non in circolo, data la ricca presenza di antiossidanti nel plasma; si sosteneva inoltre che, anche se LDL circolanti fossero coinvolte in fenomeni ossidativi, queste sarebbero spazzate dal sistema reticolo endoteliale nel giro di pochi minuti (10).

A dispetto di critiche severe, abbiamo continuato il nostro lavoro di studio. Da allora ci siamo tuttavia guardati bene dall'usare il termine di "LDL modificata", che qualcuno pretendeva dovesse essere riservato solo a modificazioni di LDL *in vitro* o dall'interazione con cellule in coltura. Si è così iniziato ad usare il termine più diplo-

matico di LDL elettronegativa [LDL "minus" o LDL(-)], per distinguerla da LDL con normale carica elettrica [nLDL]; questa terminologia è stata poi accolta da molti altri autori ed è tuttora in uso.

Quali sono stati i vostri passi ulteriori in questo campo di studio?

Innanzitutto si è migliorata la tecnica di frazionamento, passando alla cromatografia analitica ad alta pressione (High Pressure Ion Exchange Liquid Chromatography; IE-HPLC), che consente una miglior discriminazione di LDL(-) da nLDL, oltre a una più rapida esecuzione dell'indagine. Con questa metodica si è confermato in LDL(-) un maggior contenuto di sostanze reattive all'acido barbiturico (TBARS), ovvero di molecole a basso peso molecolare, fra cui la malondialdeide (MDA), che si formano durante la decomposizione di alcuni prodotti di perossidazione lipidica. A questo, si aggiunge una riduzione significativa del contenuto dell'antiossidante vitamina E, il che rende LDL(-) più facilmente ossidabile in presenza di ioni rame, con accorciamento o perdita della tipica *lag phase*, legata al tempo di consumo degli antiossidanti (11). Anche il rilievo di aggregati di apoB nella LDL(-) sembrava essere giustificato da una maggior concentrazione di MDA: l'incubazione di LDL *in vitro* con MDA determina infatti la formazione di aggregati di apoB (12). Si è così avuta conferma che questa frazione di LDL sia espressione di un, sia pur lieve, danno ossidativo occorso in circolo. Non potevamo comunque escludere che LDL potesse raccogliere, durante la sua permanenza in circolo, piccole quantità di MDA prodotta altrove, diventando simile alla LDL "minimamente" modificata, che si produce *in vitro* con incubazione con MDA (14) e che assume appunto una carica più elettronegativa. Restava aperta anche la possibilità che si

trattasse di LDL rientrata in circolo, dopo un passaggio nel sub-endotelio.

Abbiamo poi allargato lo spettro di ricerca, ricorrendo a collaborazioni internazionali, soprattutto con il gruppo di Los Angeles, guidato dal compianto amico Alex Sevanian. Si è così confermata la presenza di LDL(-) nella scimmia macaco cinomolgo; la sua concentrazione, relativa a LDL totale, aumenta sensibilmente negli animali trattati con dieta aterogena. Con gas cromatografia capillare si è documentato che il contenuto di ossisteroli in LDL(-) è 5 volte maggiore rispetto a quanto rilevato nella frazione meno elettronegativa. Inoltre, la LDL(-) della scimmia, diversamente dalla nativa, è citotossica nei confronti di cellule endoteliali in coltura (14). L'analisi degli idroperossidi, con una tecnica molto sensibile, basata sulla chemiluminescenza e conta dei singoli fotoni, ha documentato che LDL(-) è una lipoproteina circolante con un contenuto di idroperossidi più di sei volte maggiore rispetto alla nativa; a questo si aggiunge un minor contenuto di acidi grassi poli-insaturi, più suscettibili all'ossidazione, e una minor concentrazione degli aminoacidi più ossidabili, come istidina e lisina, verosimilmente consumati nel corso del processo ossidativo (15).

LDL(-) potrebbe dunque essere espressione di una popolazione di LDL più "vecchie", non sufficientemente modificate da essere rimosse rapidamente dal circolo, ma con minor affinità per il recettore proprio di LDL nativa (9), tale da favorire un maggior tempo di residenza in circolo. In queste circostanze i perossidi lipidici si possono accumulare per reazioni radicaliche di propagazione. Resta comunque aperta la possibilità di un coinvolgimento di perossidi lipidici generati dagli endoteli vascolari o provenienti da fonti dietetiche; gli idroperossidi lipidici sembrano infatti aumentare sensibilmente nella fase post-

prandiale (16). La possibilità che LDL(-) sia in qualche modo correlabile con modificazioni post-secretorie dovute a un maggior tempo di residenza in circolo, sembra anche confermata dal rilievo di una sua maggior concentrazione in LDL "piccole e dense" e può rendere ragione della loro maggior suscettibilità all'ossidazione *in vitro* (17). Sappiamo che le LDL più dense hanno un tempo di residenza in circolo significativamente maggiore e questo si correla con loro modificazioni ossidative (18). D'altra parte, un maggior tempo di circolo, aumenta per la lipoproteina le occasioni di entrare e riemergere dal sub-endotelio vascolare, ovvero dall'ambiente in cui è più facile che si verifichino fenomeni ossidativi (19). Il rapporto di LDL(-) con una sua più lunga permanenza in circolo sembra anche suffragato dalla marcata riduzione della concentrazione di questa frazione che si osserva dopo trattamento aferetico, capace di eliminare selettivamente le LDL più vecchie, più ossidate e con basso contenuto di vitamina E (20).

Che LDL(-) sia legata a fenomeni di tipo ossidativo sembra confermato dall'effetto del farmaco probucolo, che oltre al suo noto effetto ipocolesterolemizzante, ha proprietà antiossidanti ed è in grado di inibire *in vitro* la modificazione ossidativa di LDL ad opera delle cellule endoteliali in coltura (21). Il trattamento con probucolo in soggetti ipercolesterolemici induce la riduzione attesa del 17% della concentrazione di LDL totali e una riduzione molto più sensibile, pari al 43%, della frazione LDL(-); la LDL dei pazienti trattati si dimostra inoltre più resistente alla ossidazione *in vitro* indotta da ioni rame (22).

Come origina la carica negativa di LDL(-)?

La natura della carica negativa di LDL(-) è controversa. Come si è visto, il titolo dei

gruppi aminici di superficie indica un aumento della carica negativa, probabilmente per un consumo ossidativo preferenziale di lisina, fra gli altri aminoacidi sensibili all'ossidazione (16). In generale, più studi hanno sottolineato modificazioni dell'apolipoproteina B-100, come elemento chiave per determinare una aumentata elettronegatività della lipoproteina (23-25). Il dicroismo circolare ha documentato una parziale perdita della struttura secondaria di apoB-100, con maggior contenuto di strutture beta e un minor contenuto di alfa-eliche (26). Se è inoltre osservata una perdita di emissione di fluorescenza del triptofano attribuibile a una alterazione nell'impacchettamento dello strato lipidico di superficie, probabilmente legato alla presenza di lipidi ossidati; un monostrato lipidico meno compatto, può favorire un'alterazione del ripiegamento della proteina, con "affondamento" di sue parti in ambiente più idrofobico (26). Il disordine della struttura lipidica osservato in LDL(-) può anche rendere ragione della sua tendenza a formare aggregati, così come l'alterato ripiegamento di apoB-100 può essere motivo della sua scarsa affinità per il recettore specifico di LDL (9).

Ovviamente, una delle prime questioni che si sono poste riguarda la possibilità che l'ossidazione di LDL, con formazione di LDL(-), sia frutto di artefatti nel corso della sua preparazione e separazione. Vi sono tre ordini di evidenze che portano ad escludere questa ipotesi:

- 1) LDL(-) può essere rilevata mediante elettroforesi capillare nel plasma non frazionato (27);
- 2) la perossidazione in vitro di LDL isolate produce un largo spettro di lipoproteine con mobilità elettroforetica aumentata, ma pochissime particelle con i caratteri di LDL(-) (28);
- 3) si può misurare nel plasma utilizzando anticorpi monoclonali (29).

LDL(-) può essere generata da meccanismi diversi dall'ossidazione e la relativa preponderanza di un meccanismo rispetto ad un altro, dipende dalla patologia sottostante o dallo stato metabolico di ciascun individuo. Questo non significa che ciascun meccanismo specifico corrisponda ad uno stato patologico, ma piuttosto che modificazioni o alterazioni molecolari sono fra loro connesse e probabilmente si potenziano mutualmente.

La glicosilazione non enzimatica di LDL, ad esempio, contribuisce alla generazione di LDL(-) e, nello stesso tempo, rende la lipoproteina più prona alla perossidazione, riduce la sua affinità con il recettore specifico, aumenta il contenuto di esteri di colesterolo nei macrofagi e altera la funzione endoteliale (30).

Anche la rimozione di acido sialico dalle catene oligosaccaridiche di apo-B100 produce una LDL che determina accumulo di colesterolo nelle cellule in coltura e mostra avere effetti citotossici (31). In effetti si è osservato che la LDL desialilata isolata dal sangue umano presenta caratteristiche molto simili a LDL(-) (32).

La carbamilazione risulta dalla sostituzione di residui di lisina e arginina ad opera di cianati derivati dall'urea (nei pazienti uremici) o dal tiocianato (nei fumatori) (33); lo stress ossidativo proprio dell'insufficienza renale cronica e del consumo di tabacco può contribuire all'aumento della carica elettronegativa della LDL carbamilita. In questo contesto, si è osservato che la carbamilazione rende la LDL più suscettibile alla ossidazione (34).

Anche la presenza di LDL "piccole e dense" (small dense LDL; sdLDL), proprie della ipertrigliceridemia, della dislipidemia diabetica e della sindrome metabolica, contribuisce a una maggior proporzione di LDL(-), con meccanismi diversi (17, 35). Anzitutto le sdLDL hanno di per sé una carica elettrica più negativa e sono più su-

scettibili all'ossidazione e alla glicazione non enzimatica (17, 36, 37). Alla diversa carica elettrica di sdLDL potrebbe contribuire la presenza di piccole quantità di apolipoproteine non B (38).

Altro elemento con un ruolo rilevante nella formazione di LDL(-) è costituito dall'aumento di acidi grassi non esterificati (non-esterified fatty acids, NEFA) nel sangue. Si è sostenuto che la concentrazione plasmatica di NEFA sarebbe il maggior determinante della carica elettrica di LDL(-), almeno nei soggetti normolipidemicici (35). Elevate concentrazioni di NEFA nel plasma si osservano in condizioni fisiologiche, come la fase postprandiale e dopo intenso esercizio aerobico, e in processi patologici come il diabete, l'insulino-resistenza, la sindrome metabolica e la steatosi epatica non alcolica. Alcuni studi indicano che il contenuto di NEFA in LDL le conferisce capacità infiammatorie e favorisce l'aggregazione lipoproteica; entrambe caratteristiche di LDL(-) (39, 40).

Quali metodi sono in uso per isolare e studiare le LDL(-)?

Per separare LDL(-) in un primo tempo è stata utilizzata la cromatografia a scambio ionico, in un sistema HPLC (high performance liquid chromatography) (9); la tecnica è stata poi ottimizzata utilizzando un sistema FPLC (fast protein liquid chromatography) (11, 14, 15, 42). Si è anche impiegata l'isotacoforesi capillare (capillary isotachopheresis), che separa le subfrizioni lipoproteiche sulla base della loro carica elettrica netta (27, 42). Più recentemente si è ricorso all'uso di anticorpi monoclonali che riconoscono epitopi presenti in LDL(-), isolata con FPLC, e non nella LDL nativa (43, 44). Usando due diversi anticorpi monoclonali è stata messo a punto un sistema di dosaggio ELISA, che avrebbe il vantaggio di avere una maggiore

sensibilità e specificità, consentendo anche di testare numerosi campioni in tempo relativamente breve (45).

Va considerato che i metodi di dosaggio di LDL(-) sono specifici per la LDL elettro-negativa, indipendentemente dalla sua origine. Non discrimina LDL(-) generata da fenomeni ossidativi, da glicosilazione non enzimatica, da lipolisi o proteolisi enzimatiche, dall'arricchimento con NEFA, da presenza di apolipoproteine non B, o da altre modificazioni post-secretive. Infine, mancano studi che mostrino una stretta correlazione fra i vari metodi di dosaggio riportati in letteratura; non disponiamo pertanto di una metodica di studio standardizzata.

Quale significato hanno in ambito clinico le LDL(-)?

Una concentrazione percentuale maggiore di LDL(-) si osserva nell'ipercolesterolemia familiare e nell'ipertrigliceridemia (46); il trattamento con statine corregge l'eccesso percentuale di LDL(-) (47, 48). Anche nel diabete, sia esso di tipo 1 o di tipo 2, si osserva un significativo incremento di LDL(-) (49-51); l'ottimizzazione del controllo glicemico, con riduzione delle proteine glicosilate comporta una normalizzazione di LDL(-) (52). Nei pazienti con diabete si è rilevata una relazione fra glicazione di apoB-100 e la presenza di LDL(-); come già osservato, non si può escludere che la glicazione possa, per sé, conferire una carica elettrica più elettronegativa a LDL; in ogni caso, la LDL glicata è anche più suscettibile alla ossidazione in vitro (53). Un aumento della quota di LDL(-) interessa anche soggetti con insulino-resistenza o con sindrome metabolica (54, 55) e si correla negativamente con la concentrazione plasmatica di colesterolo HDL (56). Altre situazioni che comportano un aumento della frazione LDL(-) sono la steatosi epatica non alcolica (57), l'insufficienza

za renale cronica severa (58, 59) e il fumo di sigaretta (60). LDL(-) aumenta anche in fase post-prandiale (16), o dopo uno stress ossidativo, come un intenso esercizio aerobico (61). In malattie autoimmuni, come il lupus eritematoso sistemico, che si accompagna con complicazioni aterosclerotiche severe, aumenta significativamente la frazione di LDL più elettronegativa, a dispetto di valori normati o bassi di LDL totale (62). Analoghe osservazioni si riferiscono all'artrite reumatoide (63).

Si è osservata una correlazione fra prevalenza di LDL(-) e l'entità dell'aterosclerosi coronarica valutata con angiografia (64, 65).

La concentrazione di LDL(-) aumenta dopo infarto del miocardio (66, 67) o ictus ischemico (68); in queste situazioni è stato osservato l'aumento della frazione chiamata L5, che mostra carica elettrica più elettronegativa (69).

L'ampio spettro di situazioni nelle quali si osserva un aumento di LDL(-) riflette la loro eterogeneità e la varietà dei processi coinvolti nella sua generazione. Il suo comportamento nei processi aterosclerotici acuti, così come la sua correlazione con l'entità del danno aterosclerotico, potrebbe, per contro, essere espressione del processo patologico sottostante piuttosto che la sua causa. Questa ipotesi appare particolarmente credibile nelle situazioni in cui la rottura di una placca aterosclerotica determina ischemia; in questo caso le lipoproteine ingabbiate nello spazio sub-endoteliale possono essere rimesse in circolo e contribuire al pool di LDL(-), probabilmente sotto forma della più elettronegativa L5, in grado di peggiorare l'ischemia a causa della sua trombogenicità (66, 68).

Quale altri ruoli biologici sono stati ipotizzati per LDL(-)?

Non tutti gli effetti di LDL(-) sono da considerarsi strettamente aterogeni. È sta-

to descritto infatti un doppio ruolo per LDL(-) a proposito di una sua attività infiammatoria (70): l'espressione di molecole di adesione ad opera di cellule endoteliali indotta da LDL(-) può essere rovesciata per azione di lipoprotein lipasi (LpL). La lipolisi di LDL(-), mediata da LpL, genera dei fattori di trascrizione anti-infiammatori, che a loro volta inibiscono la sintesi di molecole di adesione; entrerebbe dunque in opera un meccanismo di feedback che limita la risposta infiammatoria. Si è poi osservato che LDL(-), in parallelo all'azione su citochine pro-flogistiche, promuove il rilascio da monociti e linfociti della citochina anti-infiammatoria interleuchina 10 (IL-10), contribuendo così a modulare la risposta infiammatoria (71). Dunque, l'attribuzione a LDL(-) di effetti biologici non può essere categorica, poiché dipende dalle situazioni. Può giocare un ruolo di modulatore della risposta infiammatoria per evitare risposte immuni inappropriate. Abbiamo visto come la concentrazione relativa di LDL(-) sia aumentata in situazioni flogistiche come l'artrite reumatoide o il lupus eritematoso sistemico. In queste situazioni potrebbe modulare in qualche modo la risposta immune, emergere per contrastare una risposta infiammatoria eccessiva: essere dunque conseguenza, piuttosto che causa, dei processi flogistici.

In conclusione, puoi riassumere le ragioni del rinnovato interesse scientifico e clinico verso le LDL(-)?

Ai classici fattori di rischio cardiovascolare, si sono aggiunti nel tempo le modificazioni fisico-chimiche delle lipoproteine, in particolare di LDL, che includono la sua carica elettrica. In questo contesto, un interesse particolare assume la frazione LDL con carica più elettronegativa, da noi connotata come LDL(-). La sua origine, complessa ed eterogenea, include processi di

tipo ossidativo. Diverse situazioni che aumentano il rischio cardiovascolare, favoriscono la formazione di LDL(-) o si associano a un suo aumento. In aggiunta, eventi cardiovascolari acuti danno luogo ad importanti incrementi di LDL(-), probabilmente per ritorno in circolo di questa lipoproteina modificata nel corso della sua permanenza in ambiente sottoendoteliale. Molti studi *in vitro* hanno dimostrato la capacità di LDL(-) di promuovere a livello cellulare varie azioni di tipo infiammatorio, ma anche di determinare alcuni effetti anti-infiammatori in grado di controllare una risposta infiammatoria eccessiva.

In conclusione LDL(-) è un probabile marcatore di stress metabolico. Non disponiamo ancora di una metodologia di studio ben standardizzata, anche se, ad ora, la più usata è la FLPC. Non disponiamo poi di informazioni di ampia scala, quali si potrebbero ottenere includendo lo studio di LDL(-) in studi prospettici, randomizzati; solo così sarà possibile valutare correttamente la sua rilevanza clinica.

Bibliografia

- Williams KJ, Tabas I. The response-to-retention hypothesis of atherogenesis reinforced. *Curr Opin Lipidol.* 1998; 9: 471-4.
- Brown MS, Goldstein JL. Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. *Annu Rev Biochem.* 1983; 52: 223-61.
- Goldstein JL, Ho YK, Basu SK, Brown MS. Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low-density lipoprotein producing massive cholesterol deposition. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1979; 76: 333-7.
- Brown MS, Goldstein JL, Krieger M, Ho YK, Anderson RG. Reversible accumulation of cholesterol esters in macrophages incubated with acetylated lipoproteins. *J Cell Biol.* 1979; 82: 597-613.
- Esterbauer H, Jurgens G, Quehenberger O, Koller E. Autooxidation of low density lipoprotein; loss of polyunsaturated fatty acids and vitamin E and generation of aldehydes. *J Lipid Res.* 1987; 28: 495-509.
- Henriksen T, Mahoney EM, Steinberg D. Enhanced macrophage degradation of low-density lipoprotein previously incubated with cultured endothelial cells: recognition by receptor for acetylated low density lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1981; 78: 6499-503.
- Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Koo JC, Witztum JL. Beyond Cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *New Engl J Med.* 1989; 320: 915-24.
- Hoff HF, Bradley WA, Heideman CL, Gaubatz JW, Caragas MD, Gotto AM. Characterization of low-density lipoprotein-like particle in the human aorta from grossly normal and atherosclerotic lesions. *Biochim Biophys Acta.* 1979; 573: 361-74.
- Avogaro P, Bittolo Bon G, Cazzolato G. Presence of a modified low-density lipoprotein in humans. *Arteriosclerosis.* 1988; 8 (1): 79-87.
- Steinbrecher UP, Witztum JL, Parthasarathy S, Steinberg D. Decrease in reactive amino groups during oxidation or endothelial cell modification of LDL: correlation with changes in receptor-mediated catabolism. *Arteriosclerosis.* 1987; 1: 135-43.
- Cazzolato G, Avogaro P, Bittolo Bon G. Characterization of a more electronegatively charged LDL subfraction by ion exchange HPLC. *Free Radical Biol Med.* 1991; 11: 247-53.
- Bittolo Bon G, Cazzolato G, Avogaro P. Changes of apolipoprotein B molecular weight and immunoreactivity in malondialdehyde-modified low density lipoproteins. *Artery.* 1983; 12: 74-80.
- Berliner JA, Territo MC, Sevanian A, Ramin S, Kim JA, Bamshad B, et al. Minimally modified low density lipoproteins stimulates monocyte endothelial interactions. *J Clin Invest.* 1990; 85: 1260-6.
- Hodis HN, Krams DM, Avogaro P, Bittolo Bon G, Cazzolato G, Hwang J, et al. Biochemical and cytotoxic characteristics of an *in vivo* circulating oxidized low density lipoprotein (LDL_{ox}). *J Lipid Res.* 1994; 35: 669-77.
- Sevanian A., Bittolo Bon G, Cazzolato G, Hodis H, Hwang J, Zamburlini A, et al. LDL_{ox} is a lipid hydroperoxide-enriched circulating lipoprotein. *J Lipid Res.* 1997; 38: 419-28.
- Ursini F, Zamburlini A, Cazzolato G, Maiorino M, Bittolo Bon G, Sevanian A. Postprandial lipid hydroperoxides: a possible link between diet and atherosclerosis. *Free Rad Biol Med.* 1998; 25: 250-2.
- Sevanian A, Hwang J, Hodis H, Cazzolato G, Avogaro P, Bittolo Bon G. Contribution of an *in vivo* oxidized LDL to LDL oxidation and its association with dense LDL subpopulations. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1996; 16: 784-93.

18. Pietzsch J, Lattke P, Julius U. Oxidation of apolipoprotein B-100 in circulating LDL is related to LDL residence time. *Arterioscl Thromb Vasc Biol.* 2000; 20: e63-e67.
19. Walzem RL, Watkins S, Frankel EN, Hansen RJ, German JB. Older plasma lipoproteins are more susceptible to oxidation: a linking mechanism for the lipid and oxidation theories of atherosclerotic cardiovascular disease. *Proc Natl Acad Sci Usa.* 1995; 92: 7460-4.
20. Cattin L, Petrucco A, Cazzolato G, Bittolo Bon G, Borelli V, Nardon E, et al. Low density lipoprotein apheresis decreases oxidized low density lipoproteins and monocyte adhesion to endothelial cells. *ASAIO J.* 1997; 43: 209-13.
21. Parthasarathy S, Young SG, Witztum JL, Pittman RC, Steinberg D. Probucol inhibits oxidative modification of low-density lipoprotein. *J Clin Invest.* 1986; 77: 641-4.
22. Bittolo Bon G, Cazzolato G, Avogaro P. Probucol protects Low-density lipoproteins from *in vitro* and *in vivo* oxidation. *Pharmacol Res.* 1994; 29: 337-44.
23. Hazell LJ, Stocker R. Oxidation of low-density lipoprotein with causes transformation of lipoprotein into a high-uptake for macrophages. *Biochem J.* 1993; 290: 165-72.
24. Podrez EA, Schmitt D, Hoff HF, Hazen SL. Myeloperoxidase-generated reactive nitrogen species convert LDL to an atherogenic form *in vitro*. *J Clin Invest.* 1999; 103: 1547-60.
25. Ziouzenkova O, Asatryan L, Akmal M, Tetta C, Wratten ML, Heineke J, Sevanian A. Cross-linking between low density lipoprotein ApoB and hemoglobin mediates conversion to electronegative LDL- during *ex-vivo* blood circulation. *J Biol Chem.* 1999; 274: 18916-24.
26. Parasassi T, Bittolo Bon G, Brunelli R, Cazzolato G, Krasnokova EK, Mei G, et al. Loss of apoB-100 secondary structure and conformation in hydroperoxide rich, electronegative LDL(-). *Free Radic Biol Med.* 2001; 31: 82-9.
27. Bittolo Bon B, Cazzolato G. Analytical capillary isotachopheresis of total plasma lipoproteins; a new tool to identify atherogenic low density lipoproteins. *J Lipid Res.* 1999; 40: 170-7.
28. Chang YH, Sevanian A. Characterization of cholesterol oxidation products during the formation of oxidatively modified low-density lipoprotein. *Free Radic Biol Med.* 1997; 23: 202-14.
29. Damasceno NRT, Sevanian A, Apolinario E, Oliveira JMA, Fernandes I, Abdalla DSP. Detection of electronegative low-density lipoprotein (LDL-) in plasma and atherosclerotic lesions by monoclonal antibody-based immunoassays. *Clin Biochem.* 2006; 39: 28-38.
30. Witztum JL, Steinberg D. The oxidative modification hypothesis of atherosclerosis: does it hold for humans? *Trends Cardiovasc Med.* 2001; 11: 93-102.
31. Orekhov AN, Tertov VV, Muchin DN, Mikhailenko IA. Modification of low-density lipoproteins by desialylation causes lipid accumulation in cultured cells: discovery of desialylated lipoprotein with altered cell metabolism in the blood of atherosclerotic patients. *Biochem Biophys Res Comm.* 1989; 162: 206-11.
32. Tertov VV, Bittolo Bon G, Sobenin IA, Cazzolato G, Orekhov AN, Avogaro P. Naturally occurring modified low-density lipoproteins are similar if not identical: more electronegative and desialylated lipoproteins subfractions. *Exp Mol Pathol.* 1995; 62: 166-72.
33. Basnakian AG, Shah SV, Ok E, Altunel E, Apostolov EO. Carbamylated LDL. *Adv Clin Chem.* 2010; 51: 25-52.
34. Verbrugge FH, Tang WH, Hazen SL. Protein carbamylation and cardiovascular disease. *Kidney Int.* 2015; 88: 474-8.
35. Gaubaz JW, Gillard BK, Massey JB, Hoogeveen RC, Huang M, Lloyd EE, et al. Dynamics of dense electronegative low-density lipoproteins and their preferential association with lipoprotein phospholipase A(2). *J Lipid Res.* 2007; 48: 348-57.
36. Tribble DL. Lipoprotein oxidation in dyslipidemia: Insights into general mechanisms affecting lipoprotein oxidative behavior. *Curr Opin Lipidol.* 1995; 6: 196-208.
37. Younis N, Charlton-Menys V, Sharma R, Soran H, Durrington PN. Glycation of LDL in non-diabetic people; Small dense LDL is preferentially glycated both *in vivo* and *in vitro*. *Atherosclerosis.* 2009; 202: 162-8.
38. Diffenderfer MR, Shaefer EJ. The composition and metabolism of large and small LDL. *Curr Opin Lipidol.* 2014; 25: 221-6.
39. Benitez S, Camacho M, Arcelus R, Vila L, Bancells C, Ordonez-Llanos J, et al. Increased lysophosphatidilcholine and non-esterified fatty acid content in LDL induces chemokine release in endothelial cells. Relationship with electronegative LDL. *Atherosclerosis.* 2004; 177: 299-305.
40. Jayaraman S, Gantz DL, Gursky O. Effect of phospholipase A(2) and its products on structural stability of human LDL: Relevance to formation of LDL-derived lipid droplets. *J Lipid Res.* 2011; 52: 549-57.
41. Sanchez-Quesada JM, Chamaco M, Anton R, Benitez S, Vila L, Ordonez-Llanos J. Electronegative LDL of FH subjects: chemical characterization and induction of chemokine release from

- human endothelial cells. *Atherosclerosis*. 2003; 166: 261-70.
42. Schmitz G, Mollers C, Richter V. Analytical capillary isotachopheresis of human serum lipoproteins. *Electrophoresis*. 1997; 18: 1807-13.
 43. Damasceno NRT, Sevanian A, Apolinario E, Oliveira JMA, Fernandes I, Abdalla DSP. Detection of electronegative low density lipoprotein [LDL(-)] in plasma and atherosclerotic lesions by monoclonal antibody-based immunoassays. *Clin Biochem*. 2006; 39: 28-38.
 44. Queiroz-Mello AP, Tande da Silva I, Parra Abdalla DS, Teixeira-Damasceno NR. Electronegative low-density lipoprotein: origin and impact in health and disease- *Atherosclerosis*. 2011; 215: 257-65.
 45. Faulin TES, Sena KC, Rodrigues-Telles AE, Mattos Grosso D, Bernardi Faulin EJ, Parra Abdalla DS. Validation of a novel ELISA for measurement of electronegative low-density lipoprotein. *Clin Chem Lab Med*. 2008; 46: 1769-75.
 46. Sanchez-Quesada JM, Ota-Entraigas C, Franco M, Blabco-Vaca F, Ordommez-Llanos J. Density distribution of electronegative LDL in normolipemic and hyperlipemic subjects. *J Lipid Res*. 2002; 43: 699-705.
 47. Sanchez-Quesada JM, Benitez S, Ota M, Franco M, Ota-Entraigas C, Franco M, et al. Effect of simvastatin treatment on electronegative low density lipoprotein present in patients with heterozygous familial hypercholesterolemia. *Am J Cardiol*. 1999; 84: 655-9.
 48. Zang B, Matsunaga A, Rainwater DL, Miura S, Noda K, Nishikawa H, et al. Effect of rosuvastatin on electronegative LDL as characterized by capillary isotachopheresis. The ROSARY study. *J Lipid Res*. 2009; 50: 1832-941.
 49. Sanchez-Quesada JM, Perez A, Caixas A, Ordonez-Llanos J, Carreras G, Payes A, et al. Electronegative low-density lipoprotein subform is increased in patients with short-duration IDDM and closely related to glycaemic control. *Diabetologia*. 1996; 39: 1469-76.
 50. Moro E, Zambon C, Pianetti S, Cazzolato G, Pais M, Bittolo Bon G. Electronegative low-density lipoprotein subform (LDL-) is increased in type 2 (non-insulin-dependent) microalbuminuric diabetic patients and is closely associated with LDL susceptibility to oxidation. *Acta Diabetol*. 1998; 35: 161-4.
 51. Yano M, Inoue M, Machata E, Shiba T, Yamakado M, Hirabayashi Y, et al. Increased electronegative charge of serum low-density lipoprotein in patients with diabetes mellitus. *Clin Chim Acta*. 2004; 340: 93-8.
 52. Sanchez-Quesada JM, Perez A, Caixas A, Rigla M, Payés A, Benitez S, Ordonez-Llanos J. Effect of glycemic optimization on electronegative low-density lipoprotein in diabetes: Relation to nonenzymatic glycosylation and oxidative modification. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001; 86: 3243-9.
 53. Moro E, Alessandrini P, Zambon C, Pianetti S, Pais M, Cazzolato G, Bittolo Bon G. Is glycation of low-density lipoprotein in patients with Type 2 diabetes mellitus a LDL pre-oxidative condition? *Diabet Med*. 1999; 16: 663-9.
 54. Zhang B, Kaneshi T, Ohta T, Saku K. Relation between insulin resistance and fast migrating LDL subfraction as characterized by capillary isotachopheresis. *J Lipid Res*. 2005; 46: 2265-77.
 55. Hsu JF, Chou TC, Lu J, Chen SH, Chen CC, Chen JL, Elayda M, Ballantyne CM, Shayani S, Chen CK. Low-density lipoprotein electronegativity is a novel cardiometabolic risk factor. *PLoS One*. 2014; 9 (9): e107340.
 56. Queiroz-Mello AP, Tande da Silva I, Silva Oliveira A, Sutti Nunes V, Abdalla DSP, Gidlund M, Teixeira Damasceno NR. Electronegative low-density lipoprotein is associated with dense low-density lipoprotein in subjects with different levels of cardiovascular risk. *Lipids*. 2010; 45: 619-25.
 57. Park H, Shima T, Yamaguchi K, Mitsuyoshi H, Minami M, Yasui K, et al. Efficacy of long-term ezetimibe therapy in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol*. 2011; 46: 101-7.
 58. Ziouzenkova O, Sevanian A. Oxidative modification of low-density lipoprotein (LDL) in HD patients: role in electronegative LDL formation. *Blood Purif*. 2000; 18: 169-76.
 59. Lobo JC, Mafra D, Farage NE, Faulin TE, Abdalla DS, de Nobrega AC, Torres JP. Increased electronegative LDL and decreased antibodies against electronegative levels LDL levels correlate with inflammatory markers and adhesion molecules in hemodialysed patients. *Clin Chim Acta*. 2011; 412: 1788-92.
 60. Tang D, Lu J, Walterscheid JP, Chen HH, Engler DA, Sawamura T, Chang PY, Safi HJ, Yang CY, Chen CH. Electronegative LDL circulating in smokers impairs endothelial progenitor cell differentiation by inhibiting Akt phosphorylation via LOX-1. *H Lipid Res*. 2008; 49: 33-47.
 61. Sanchez-Quesada JM, Jorba O, Payes A, Ota A, Serra-Grima R, Gonzales-Sastre F. Ascorbic acid inhibits the increase in low-density lipoprotein (LDL) susceptibility to oxidation and the proportion of electronegative LDL induced by intense aerobic exercise. *Coron Artery Dis*. 1998; 9: 249-55.
 62. Chan HC, Chan HC, Liang CJ, Lee HC, Su H, Lee AS. Role of low-density lipoprotein in early vascular

- aging associated with systemic lupus erythematosus. *Circulation*. 2019; 140 (Suppl. 1): A 16473.
63. Dai L, Zhang Z, Winyard PG, Gaffney K, Jones H, Blake DR, Morris CJ. A modified form of low-density lipoprotein with increased electronegative charge is present in rheumatoid arthritis synovial fluid. *Free Radic Biol Med*. 1997; 22: 705-10.
64. Tomasik A, Janchec W, Skrzep-Poloczek B, Widera-Romuk E, Wodniecki J, Wojciechowska C. Circulating electronegatively charged low-density lipoprotein in patients with angiographically documented coronary artery disease. *Scand J Clin Lab Invest*. 2003; 63: 259-65.
65. Niccoli G, Bacà M, De Spirito M, Parasassi T, Cosentino N, Greco G, et al. Impact of electronegative low-density lipoprotein on angiographic coronary atherosclerotic burden. *Atherosclerosis*. 2012; 223: 166-70.
66. Chan HC, Ke LY, Chu CS, Lee AS, Shen MY, Cruz MA, et al. Highly electronegative LDL from patients with ST-elevation myocardial infarction triggers platelets activation and aggregation. *Blood*. 2013; 122: 3632-41.
67. Yang TC, Chang PY, Lu SC. L5-LDL from ST-elevation myocardial infarction patients induces IL-1beta production via LOX-1 and NLRP3 inflammasome activation in macrophages. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2017; 312: H265-H274.
68. Shen MY, Chen FY, Hsu JF, Fu RH, Chang CM, Chang CT, et al. Plasma L5 levels are elevated in ischemic stroke patients and enhance platelet aggregation. *Blood*. 2016; 127: 1336-45.
69. Yang CY, Raya JL, Chen HH, Chen CH, Abe y, Pownall HJ, et al. Isolation, characterization, and functional assessment of oxidatively modified subfractions of circulating low-density lipoproteins. *Arterioscl Thromb Vasc Biol*. 2003; 23: 1083-90.
70. Ziouzenkova O, Asatryan L, Sahady D, Orasanu G, Perrey S, Cutak B, et al. Dual role for lipolysis and oxidation in peroxisome proliferation-activator receptor responses to electronegative low-density lipoprotein. *J Biol Chem*. 2003; 278: 39874-81.
71. Estruch M, Sancgez-Quesada JK, Ordonez-Llanos J, Benitez S. Electronegative LDL: a circulating modified LDL with a role in inflammation. *Mediators Inflamm*. 2013; 2013: 181324.

