

MECCANISMI DI MALATTIA

LA PCSK9 OLTRE I LIPIDI: RUOLO NELLO STRESS OSSIDATIVO E NELLA TROMBOSI

PCSK9 beyond lipids: role in oxidative stress and thrombosis

VITTORIA CAMMISOTTO¹, VALENTINA CASTELLANI², DANIELE PASTORI¹,
FRANCESCO BARATTA¹, PASQUALE PIGNATELLI¹

¹Dipartimento di Scienze Cliniche Internistiche, Anestesiologiche e Cardiovascolari, Sapienza Università di Roma;

²Dipartimento di Chirurgia Generale e Specialistica "Paride Stefanini", Sapienza Università di Roma

SUMMARY

Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9), mainly secreted in the liver, is a key regulator of cholesterol homeostasis inducing LDL receptors degradation. Beyond lipid metabolism, PCSK9 is involved in the development of atherosclerosis promoting plaque formation in mice and human, impairing the integrity of endothelial monolayer and promoting the events that induce atherosclerosis disease progression. In addition, the PCSK9 ancillary role on atherothrombosis process are widely debated. Indeed, recent evidence showed a regulatory effect of PCSK9 on redox system and platelet activation.

In particular, the role of PCSK9 in the activation of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase (Nox2) system, of MAP-kinase cascades and of CD36 and LOX-1 downstream pathways suggests PCSK9 as a significant cofactor in the atherothrombosis development.

This evidence suggests that serum levels of PCSK9 could represent a new biomarker for the occurrence of cardiovascular events. Finally, other evidence showed that PCSK9 inhibitors, a novel pharmacological tool introduced in clinical practice in the last years, counteracted phenomena above described.

Key words: PCSK9, platelets, thrombosis, anti-PCSK9, oxidative stress.

Introduzione

L'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) ha stimato che circa un terzo dei decessi a livello mondiale è attribuibile alle

malattie cardiovascolari (CVD) e, dunque, la loro prevenzione rappresenta una delle sfide più importanti dei nostri tempi.

L'aterosclerosi è il processo anatomico-patologico delle grandi arterie associato allo sviluppo di CVD. Tra i vari fattori predisponenti lo sviluppo dell'aterosclerosi, la lipoproteina a bassa densità (LDL) è l'u-

Indirizzo per la corrispondenza

Pasquale Pignatelli

E-mail: pasquale.pignatelli@uniroma1.it

nico a soddisfare i criteri di causalità (1). Tuttavia, il processo infiammatorio gioca un ruolo chiave nella promozione della transitosi dell'LDL attraverso l'endotelio e della ritenzione delle stesse nella parete arteriosa (2). In questo sito, le particelle di LDL subiscono processi ossidativi enzimatici e non enzimatici che inducono la produzione di LDL ossidate (ox-LDL) (3, 4) le quali, a loro volta, esercitano un ruolo pro-ossidante e pro-infiammatorio (2). Anche le piastrine giocano un ruolo nel processo di ossidazione delle LDL. Infatti, le piastrine, attivate dallo stimolo infiammatorio, aderiscono alle cellule dell'endotelio e amplificano il processo immuno-infiammatorio favorendo la chemiotassi delle cellule immunitarie innate (5) e il rilascio di mediatori pro-ossidativi e pro-infiammatori (6) che favoriscono la produzione di agenti pro-trombotici come le ox-LDL (7).

La proteina convertasi subtilisina kexin tipo 9 (PCSK9), un enzima appartenente alla classe delle serin-proteasi e descritta per la prima volta nel 2003 (8), viene sintetizzata nella cellula come zimogeno solubile e convertito nella sua forma attiva dopo un processo autocatalitico nel reticolo endoplasmatico (9). La PCSK9 è un regolatore critico dell'omeostasi del colesterolo in quanto agisce come contro-regolatore dell'espressione dei recettori LDL (LDLR) sulla superficie cellulare (10). La PCSK9 è secreta principalmente dagli epatociti ma è espressa anche nella parete arteriosa, dove può influenzare l'omeostasi locale e contribuire direttamente allo sviluppo dell'aterosclerosi (11). Data la forte correlazione tra dislipidemia e CVD, la riduzione dell'LDL-c, tramite l'inibizione dell'asse LDLR-PCSK9, contribuisce drasticamente a ridurre il rischio di CVD (12, 13).

Nell'ultimo decennio sono stati svilup-

pati diversi inibitori della PCSK9 (PCSK9-I) tra cui due anticorpi monoclonali umani, alirocumab ed evolocumab. I PCSK9-I legano la PCSK9 circolante, prevengono la produzione del complesso PCSK9-LDL-LDLR e il successivo turn-over dell'LDLR (14). La somministrazione di PCSK9-I, quando utilizzati in aggiunta alle statine, riduce l'LDL circolante di circa il 40-65% (15, 16). Studi interventistici di fase III hanno dimostrato che sia alirocumab che evolocumab riducono gli eventi cardiovascolari (17, 18). Negli ultimi anni sono state prodotte una serie di evidenze sui potenziali effetti ancillari dei PCSK9-I che potrebbero fornire ulteriori spiegazioni sui meccanismi alla base della protezione da CVD, in aggiunta a quanto attribuibile alla marcata riduzione delle LDL.

Ruolo dello stress ossidativo nel processo aterotrombotico

Numerose evidenze suggeriscono che lo stress ossidativo gioca un ruolo chiave nei processi di disfunzione endoteliale e nell'induzione di tutti quei meccanismi alla base della progressione delle CVD, inclusa l'attivazione piastrinica (19). Lo stress ossidativo è un fenomeno caratterizzato dallo squilibrio tra la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e la capacità riducente dei sistemi biologici atti allo smaltimento di questi prodotti (20). Diversi sistemi enzimatici come la xantina ossidasi, le nicotinamide adenin dinucleotide fosfato (NADPH) ossidasi, le fonti mitocondriali di ROS e l'ossido nitrico sintasi (NOS) sembrano svolgere un ruolo nell'equilibrio di questo sistema (21). La NADPH ossidasi gioca un ruolo fondamentale nello stress ossidativo, come dimostrato dalla completa soppressione della produzione cellulare dei ROS nei pazienti affetti da malattia granulomatosa cronica legata al cromosoma

X (X-CGD), patologia caratterizzata dal deficit ereditario di Nox2, subunità catalitica della NADPH (22).

Nell'uomo, l'albumina e l'acido urico rappresentano le principali molecole antiossidanti circolanti (23, 24). Altri antiossidanti non enzimatici includono le vitamine E e C, il coenzima Q10 e i polifenoli che sono introdotti attraverso la dieta (25) e il glutatione (GSH), composto tiolico a basso peso molecolare sintetizzato di origine endogena (26).

L'infiammazione vascolare di basso grado e lo stress ossidativo sono fortemente implicate nella patogenesi delle CVD, intervenendo nelle varie fasi della progressione delle placche e nello sviluppo delle complicanze trombotiche (27, 28). Inoltre, anche le piastrine, oltre ad essere coinvolte nel rilascio di molecole infiammatorie e pro-trombotiche, sono in grado di produrre ROS (29). La produzione di ROS piastrinici, principalmente generati dalla NADPH ossidasi, favorisce un meccanismo di amplificazione dell'attivazione piastrinica, favorendo il rilascio di agonisti piastrinici come l'adenosina difosfato (ADP), inducendo la formazione di isoprostani e ox-LDL ed il rilascio di molecole pro-aterogene come il ligando CD40 (CD40L) (30).

Diversi studi hanno dimostrato una stretta connessione tra la produzione di ROS da parte della Nox2, un'isoforma NADPH ossidasi, e l'attivazione delle piastrine. In particolare, l'interazione tra Nox2 e l'attivazione piastrinica è stata inizialmente studiata in piastrine di pazienti con malattia X-CGD (31). In questi pazienti, affetti da un deficit genetico di NADPH ossidasi (31), è stata dimostrata una ridotta produzione e rilascio di CD40L in seguito a stimolazione piastrinica con il collagene e la trombina, oltre alla quasi completa soppressione della produzione del radicale anione superossido ($O_2^{\cdot-}$) (32).

Le piastrine rappresentano una fonte di ROS e contribuiscono alla formazione delle ox-LDL che, a loro volta, stimolano una maggiore assorbimento di LDL da parte dei macrofagi.

Il CD36 e LOX-1 sono due recettori *scavenger* piastrinici che svolgono un ruolo importante nello sviluppo dell'aterosclerosi. CD36 è un ligando per le ox-LDL ed è in grado di innescare l'attivazione di cascate di segnali inducenti l'attivazione delle piastrine, in particolare attraverso l'espressione della P-selectina e l'attivazione dell'integrina $\alpha IIb\beta 3$ (un recettore del fibrinogeno) (33). Dunque, il legame delle ox-LDL con il CD36 è uno dei meccanismi di induzione dell'iperreattività piastrinica e gioca un ruolo cruciale nell'assunzione del fenotipo pro-trombotico da parte delle piastrine (33).

La produzione di ROS da parte del segnale delle ox-LDL mediante il CD36 richiede il coinvolgimento delle chinasi appartenenti alla famiglia Src e l'attivazione di Nox2. Non a caso tale attivazione può essere facilmente inibita in vitro con l'utilizzo degli inibitori del CD36 e Nox2 (gp91dstat) (34). Allo stesso modo, la produzione di ROS risulta inibita nei topi $Nox2^{-/-}$ (34), confermando il ruolo cruciale di questo enzima nel processo di attivazione (35). Il realizzarsi di tutti questi processi favorisce l'instaurarsi di un circolo vizioso di ossidazione delle LDL e l'attivazione piastrinica (36). Anche LOX1 è coinvolto nella regolazione dell'up-take di ox-LDL da parte sia delle cellule endoteliali che delle piastrine. Infine, l'espressione di LOX1 così come il CD36, e la sua interazione con le ox-LDL inducono l'aggregazione piastrinica, contribuendo alla formazione dei trombi (36).

PCSK9 e stress ossidativo

Dati recenti hanno evidenziato che PCSK9 ha funzioni pro-aterogene indi-

pendenti dal suo effetto sulla regolazione dei livelli lipidici circolanti. La PCSK9 è altamente espressa nelle cellule muscolari lisce dei vasi e nelle placche aterosclerotiche. Inoltre, la sua espressione può essere regolata da molti mediatori pro-aterogeni, inclusi i ROS prodotti dalla NADPH ossidasi, responsabili della formazione di ox-LDL (37). Le particelle di ox-LDL possono essere captate dai recettori LOX1 e CD36 e, una volta internalizzate, inducono la sovra-regolazione dell'espressione della PCSK9 perpetrando lo stimolo pro-aterogeno. Infatti, la PCSK9, tramite un meccanismo che coinvolge l'attivazione della Nox2, è in grado di stimolare la formazione di ox-LDL (34). La valutazione della relazione tra PCSK9, stress ossidativo e produzione di ox-LDL aterogene è stata esplorata tramite studi in vitro ed in vivo sia su modelli animali che sull'uomo, coinvolgendo pazienti ad alto rischio cardiovascolare.

In particolare, è stato dimostrato che le cellule endoteliali (EC) e le cellule muscolari lisce (SMC) trattate con differenti concentrazioni di proteina PCSK9 umana ricombinante (hPCSK9) mostrano un aumento della produzione di ROS in maniera dose-dipendente (38). Inoltre, la somministrazione della PCSK9 influenza l'attivazione della NADPH ossidasi migliorando l'espressione delle subunità citosoliche dell'enzima, come p47^{phox} e gp91^{phox} (38). Modelli murini geneticamente deficienti di p47^{phox} e gp91^{phox} hanno messo in luce la relazione tra PCSK9 e produzione di ROS (38, 39). In particolare, in questi modelli animali, un aumento dell'espressione del gene codificante per la PCSK9, indotto da una trasfezione plasmidica, induce un aumento della produzione di ROS nei macrofagi (39). Ancora, Ding et al. mostrano che i macrofagi dei topi gp91^{phox-/-}, p47^{phox-/-} e p22^{phox-/-} presentano livelli più bassi di

ROS rispetto ai topi di tipo selvatico (WT) (38).

Recentemente, uno studio condotto su pazienti affetti da fibrillazione atriale (FA) ha evidenziato non solo un aumento dei livelli circolanti della PCSK9 e dell'attivazione della sua cascata di segnalazione tramite un meccanismo stress ossidativo dipendente, ma anche che i livelli della PCSK9 discriminano i pazienti ad aumentato rischio cardiovascolare (40) e correlano con l'incremento del tasso di generazione di ROS e di ox-LDL (41). Infine, un'analisi *post-hoc* di uno studio prospettico condotto su 907 pazienti con FA ha dimostrato che i livelli circolanti di PCSK9 e LPS si associano all'attivazione della Nox2 e ad un rischio più elevato di sviluppare eventi cardiovascolari (42).

Effetto antiossidante di PCSK9-I

Da studi recenti è emersa un'associazione tra la PCSK9 e lo stress ossidativo. Pertanto, l'inibizione della PCSK9 potrebbe rappresentare una nuova strategia per ridurre il rischio cardiovascolare associato allo stress ossidativo. Lankin et al. hanno riportato, in pazienti in prevenzione secondaria trattati con evolocumab, una riduzione della concentrazione plasmatica di ox-LDL ma nessuna influenza sull'attività degli enzimi antiossidanti, tra cui glutatione perossidasi, superossido dismutasi e catalasi (43).

Parallelamente, alirocumab, in ratti con danno epatico indotto da alcool, è stato in grado di modulare lo stress ossidativo diminuendo i prodotti di perossidazione lipidica nel fegato (43). Gli effetti antiossidanti di evolocumab durante la condizione di stress ossidativo sono stati studiati anche in vitro, in colture di cellule endoteliali di vena ombelicale umana (HUVEC), dimostrando di essere capaci di contrastare i danni causati dall'H₂O₂ in eccesso (44).

Infine, i dati emersi da uno studio multicentrico, condotto in 80 pazienti con ipercolesterolemia familiare eterozigote (HeFH), riportano che lo stress ossidativo risulta significativamente inibito da 6 mesi di trattamento con PCSK9-I (45). Infatti, sia i livelli di attivazione di Nox2 che di produzione di ox-LDL si riducevano significativamente rispetto ai valori registrati al basale (45).

Il ruolo della trombosi nella malattia cardiovascolare aterosclerotica

Quella della trombosi arteriosa è una patogenesi complessa e dinamica che origina a partire da una placca aterosclerotica lesa. La formazione di trombi consegue al rilascio di molecole pro-trombotiche, all'adesione delle piastrine alla parete vascolare e alla loro conseguente aggregazione. Questi processi, insieme all'attivazione della cascata coagulativa che è, nel sito danneggiato, responsabile della produzione di fibrina, porta alla formazione e alla crescita dei trombi.

Il ruolo delle piastrine in questo contesto fisiopatologico dipende dalla loro capacità di legare specifici recettori che vengono espressi sull'endotelio danneggiato (46), come ad esempio il legame del collagene espresso sulla superficie endoteliale lesa con lo specifico recettore piastrinico (47). Quindi, le piastrine, attraverso le loro glicoproteine di superficie, interagiscono con il collagene e il fattore di von Willebrand (vWF), cambiano forma ed aderiscono al sito della lesione. Questo evento porta alla secrezione di α -granuli che rilasciano ADP, serotonina e TxA2 portando al reclutamento di ulteriori piastrine (48). Infine, la generazione di trombina, attiva la cascata coagulativa che prende parte alla formazione di trombi (47). Una maggiore

reattività piastrinica ed il conseguente aumentato rischio trombotico sono associati a condizioni patologiche, come l'aterosclerosi, ipercolesterolemia, diabete, ipertensione, fumo di sigaretta e obesità (49, 50), che possono contribuire alla crescita del trombo attraverso l'amplificazione e la propagazione dell'aggregazione piastrinica (51).

PCSK9 e attivazione piastrinica

Recentemente sono stati condotti diversi studi sperimentali, preclinici e clinici, volti a verificare l'ipotesi che la PCSK9 circolante possa influenzare, con diversi meccanismi, l'attivazione delle piastrine. I risultati di questi studi chiariscono il ruolo della PCSK9 nel processo trombotico. In particolare, il modello animale *knock-out* per PCSK9 (PCSK9^{-/-}) mostra una riduzione della trombosi indotta da FeCl₃ nell'arteria carotidea e della formazione di trombi non occlusivi (52). In linea con questi dati, si osserva, in un modello murino di trombosi simile al precedente, che PCSK9 induce la trombosi in vivo mentre, al contrario, il suo inibitore, l'evolocumab, inibisce tale effetto (53). Inoltre, le piastrine di topi PCSK9^{-/-}, rispetto alle piastrine provenienti da topi con fenotipo selvatico (Wt), mostrano una ridotta attivazione piastrinica, come testimoniato dai ridotti livelli di glicoproteina (Gp)IIb/IIIa, di sP-selectina e dalla ridotta formazione di aggregati piastrine-leucociti (52) (54).

È ben documentato che sP-selectina e CD40L sono due marcatori di attivazione piastrinica associati al rischio cardiovascolare (55). Esperimenti condotti su 30 conigli maschi affetti da dislipidemia, il trattamento con 10-deidrogingerdione, un nuovo inibitore della proteina di trasferimento dell'estere del colesterolo (CETP) in grado di sopprimere l'espressione di

PCSK9, mostrano una marcata diminuzione sia dei livelli di CD40L solubile che della sP-selectina (56). In aggiunta, la riduzione di questi marcatori correla positivamente con la soppressione dei livelli della PCSK9 (56). Queste osservazioni dimostrano che la PCSK9 potrebbe influenzare in maniera significativa l'attivazione piastrinica e gli eventi trombotici associati.

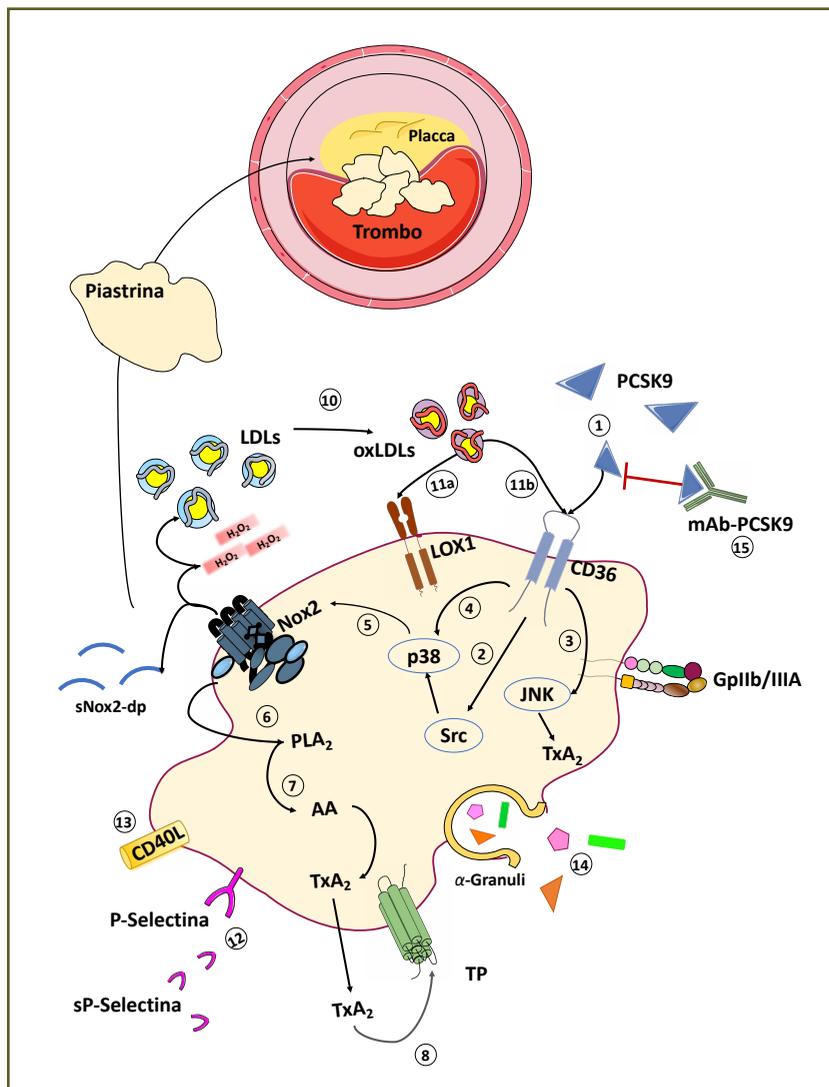
Navarese et al. hanno esaminato l'associazione tra PCSK9, aggregazione piastrinica e insorgenza di eventi cardiovascolari

avversi maggiori (MACE) in pazienti con sindrome coronarica acuta (SCA), trattati con inibitori P2Y12 (prasugrel o ticagrelor) e sottoposti a intervento coronarico percutaneo (PCI) (57). I dati dello studio mostrano un aumento dei livelli della PCSK9 associato ad una maggiore reattività piastrinica ed una maggiore ricorrenza di CVD. Più in dettaglio, pazienti con livelli di PCSK9 più elevati mostrano un rischio di sviluppare eventi coronarici ricorrenti 2,62 volte maggiore rispetto a pazienti

Figura I - Effetti di PCSK9 sull'attivazione delle piastrine.

(1) PCSK9 lega direttamente il recettore CD36 sulla superficie delle piastrine inducendo l'attivazione piastrinica e la segnalazione a valle tra cui l'attivazione delle chinasi (2) Src e (3) JNK. Inoltre, la PCSK9 aumenta la generazione di ROS mediante (4) fosforilazione di p38MAPK, (5) attivazione di Nox2, (6) fosforilazione di PLA2, (7) attivazione del metabolismo dell'AA e (8) segnalazione di TxA2. (9) La produzione di ROS mediata da Nox2 aumenta (10) la formazione di ox-LDL che amplificano l'attivazione piastrinica attraverso i recettori piastrinici (11a) LOX1 e (11b) CD36. Tutti questi eventi agiscono come segnale di amplificazione per l'attivazione piastrinica portando a (12) espressione di p-selectina, (13) espressione di CD40L e (14) rilascio del contenuto di granuli. (15) mAbs-PCSK9 inibiscono tutti questi meccanismi.

Abbreviazioni. AA: acido arachidonico; CD40L: ligando CD40; Gp: glicoproteina; H₂O₂: perossido di idrogeno; LDL: lipoproteine a bassa densità; ox-LDL: lipoproteine a bassa densità ossidate; PCSK9: proproteina convertasi subtilisina/kexina 9; PLA2: fosfolipasi A2; ROS: specie reattive dell'ossigeno; sNOX2-dp: peptide solubile derivato da NOX2; TP: recettore del trombossano; TxA₂: trombossano A₂; mAbs: anticorpi monoclonali.



con livelli plasmatici di PCSK9 più bassi (57). Questi risultati sono corroborati dagli esperimenti in cui hPCSK9, aggiunta al plasma ricco di piastrine (PRP) di soggetti sani, è in grado di aumentare significativamente l'aggregazione piastrinica e ridurre il tempo di latenza di aggregazione dopo la stimolazione delle piastrine con epinefrina (52). Allo stesso modo, l'incubazione delle piastrine con la PCSK9, a concentrazioni riscontrate nella circolazione dei pazienti con FA, aumenta l'aggregazione piastrinica, la biosintesi del TxB2 e il rilascio di sP-selectina (41), marcatori di attivazione piastrinica in vivo (58) (41). Complessivamente, questi dati rafforzano l'ipotesi per la quale l'aumento dei livelli della PCSK9 è correlato a un aumento della reattività piastrinica e di conseguenza ad un rischio aterotrombotico più elevato.

Nonostante tutte queste evidenze, l'effetto diretto della PCSK9 sulle piastrine, indipendentemente da quello generato dalla dislipidemia conseguente al suo legame con LDLR, è ancora dibattuto.

La dislipidemia induce la generazione di ox-LDL che, a loro volta, facilitano l'attivazione piastrinica legando i recettori *scavenger* quali il CD36 e LOX1 presenti sulla superficie delle piastrine (33, 59). Dunque, la PCSK9 non lega esclusivamente il LDLR ma ha, come ulteriori bersagli molecolari anche il recettore delle lipoproteine a densità molto bassa (VLDL), il CD36 e LOX1 (39). A conferma di tale dato, *in vitro*, la PCSK9 induce l'aumento dell'attivazione piastrinica, dello stress ossidativo e della fosforilazione delle proteine coinvolte nel *pathway* di attivazione della Nox2, come la p38, la p47phox e la fosfolipasi A2 (PLA2). Questi fenomeni sono amplificati dall'aggiunta di LDL esogene e attenuati dall'utilizzo dell'inibitore del CD36. Inoltre, un'analisi di co-immunoprecipitazione ha rivelato l'interazione diretta tra PCSK9

e CD36 (41). Successivamente, questi risultati sono stati confermati dal gruppo di Qi et al. che, attraverso esperimenti *in vitro* e *in vivo*, hanno dimostrato che la PCSK9 incrementa l'aggregazione piastrinica, il rilascio di ATP da parte dei granuli densi, l'attivazione dell'integrina α IIb β 3 e il rilascio di P-selectina dai granuli α (53). Topi knock-out per CD36 confermano che gli effetti della PCSK9 sull'attivazione piastrinica dipendono dal CD36 (53). Quindi, sulla base di questi dati, si potrebbe affermare che la PCSK9 amplifica, tramite un legame diretto con il CD36, l'attivazione piastrinica e la trombosi, attivando le vie di segnalazione a valle (*Figura 1*)

Effetto anti-piastrinico di PCSK9-I

I PCSK9-I, dopo 6 mesi di trattamento, oltre a ridurre lo stress ossidativo, riducendo l'attivazione della Nox2 e bloccando la via dell'acido arachidonico (45), riducono l'attivazione piastrinica come dimostrato da Barale et al. in uno studio condotto su 23 pazienti con HeFH (60). Infatti, lo studio ha documentato la diminuzione dei livelli circolanti di alcuni marcatori di attivazione piastrinica, come il CD62P, il CD40L solubile, il fattore piastrinico-4 (PAF-4) e la sP-selectina (60). Questi risultati sono stati recentemente confermati da uno studio multicentrico condotto su una popolazione più ampia di pazienti con HeFH (n=88) in cui, anche in questo caso, 6 mesi di trattamento con PCSK9-I riducevano l'attivazione piastrinica e inoltre, la diminuzione del TxB2 sierico correlava positivamente con i livelli di PCSK9 circolanti (45) (*Figura 1*).

Conclusioni

Alla luce delle scoperte appena descritte è possibile affermare che la PCSK9 è una delle attrici principali nel processo aterotrombotico. PCSK9 è in grado di modu-

lare direttamente e indirettamente diversi percorsi coinvolti nella produzione di ROS e nell'attivazione delle piastrine, come rappresentato nella Figura 1.

L'introduzione di PCSK9-I potrebbe rappresentare un nuovo strumento per contrastare questo processo attraverso la riduzione sia del colesterolo LDL che dell'attivazione piastrinica e della formazione di trombi.

Tuttavia, la disponibilità di questa nuova classe di farmaci non deve far dimenticare che anche strategie di prevenzione

cardiovascolare hanno mostrato effetti favorevoli sui livelli circolanti di PCSK9. Ad esempio, un'elevata aderenza alla Dieta Mediterranea è stata associata a livelli più bassi di PCSK9 (42). In particolare, l'olio extravergine di oliva, alimento ricco di composti antiossidanti, mostra un'associazione indipendente e inversa con i livelli di PCSK9 circolanti (42) suggerendo la Dieta Mediterranea, e/o la supplementazione con antiossidanti un potenziale strumento per regolare i livelli di PCSK9 e ridurre il rischio cardiovascolare.

RIASSUNTO

La proproteina convertasi subtilisina/kexina di tipo 9 (PCSK9), secreta principalmente nel fegato, è un regolatore chiave dell'omeostasi del colesterolo che induce la degradazione dei recettori bloccandone il riciclo sulla membrana del recettore per le LDL. Oltre al metabolismo lipidico, la PCSK9 è coinvolta nello sviluppo e nella progressione della malattia aterosclerotica infatti, promuove la formazione della placca sia in modelli murini che nell'uomo compromettendo l'integrità dell'endotelio.

Il ruolo della PCSK9 sul processo di aterotrombosi è ampiamente dibattuto. In effetti, prove recenti hanno mostrato un effetto regolatorio della PCSK9 sul sistema redox e sull'attivazione delle piastrine. In particolare, il ruolo della PCSK9 nell'attivazione del sistema della nicotinamide adenin dinucleotide fosfato (NADPH) ossidasi, delle MAP-chinasi e delle vie a valle di CD36 e LOX-1 suggerisce la PCSK9 come fattore importante nello sviluppo dell'aterotrombosi.

Queste evidenze indicano che il livello sierico della PCSK9 potrebbe rappresentare un nuovo predittore di eventi cardiovascolari. Infine, dati pre-clinici e clinici hanno mostrato che gli inibitori della PCSK9, introdotti nella pratica clinica negli ultimi anni, contrastano i fenomeni sopra descritti.

Parole chiave: PCSK9, piastrine, trombosi, anti-PCSK9, stress ossidativo.

Bibliografia

1. Ference BA, Ginsberg HN, Graham I, Ray KK, Packard CJ, Bruckert E, et al. Low-density lipoproteins cause atherosclerotic cardiovascular disease. 1. Evidence from genetic, epidemiologic, and clinical studies. A consensus statement from the European Atherosclerosis Society Consensus Panel. *Eur Heart J.* 2017; 38 (32): 2459-2472.
2. Borén J, Chapman MJ, Krauss RM, Packard CJ, Bentzon JF, Binder CJ, et al. Low-density lipoproteins cause atherosclerotic cardiovascular disease: pathophysiological, genetic, and therapeutic insights: a consensus statement from the European Atherosclerosis Society Consensus Panel. *Eur Heart J.* 2020; 41 (24): 2313-2330.
3. Binder CJ, Papac-Milicevic N, Witztum JL. Innate sensing of oxidation-specific epitopes in health and disease. *Nat Rev Immunol.* 2016; 16 (8): 485-497.
4. Bochkov VN, Oskolkova OV, Birukov KG, Levenon AL, Binder CJ, Stöckl J. Generation and biological activities of oxidized phospholipids. *Antioxid Redox Signal.* 2010; 12 (8): 1009-1059.
5. von Hundelshausen P, Weber C. Platelets as immune cells: bridging inflammation and cardiovascular disease. *Circulation research.* 2007; 100 (1): 27-40.
6. Badrnya S, Schrottmaier WC, Kral JB, Yaiw KC, Volf I, Schabbauer G, et al. Platelets mediate oxidized low-density lipoprotein-induced monocyte extravasation and foam cell formation. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology.* 2014; 34 (3): 571-580.

7. Morrell CN, Aggrey AA, Chapman LM, Modjeski KL. Emerging roles for platelets as immune and inflammatory cells. *Blood*. 2014; 123 (18): 2759-2767.
8. Seidah NG, Benjannet S, Wickham L, Marcinkiewicz J, Jasmin SB, Stifani S, et al. The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): liver regeneration and neuronal differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003; 100 (3): 928-933.
9. Poirier S, Mayer G. The biology of PCSK9 from the endoplasmic reticulum to lysosomes: new and emerging therapeutics to control low-density lipoprotein cholesterol. *Drug Des Devel Ther*. 2013; 7: 1135-1148.
10. Seidah NG, Abifadel M, Prost S, Boileau C, Prat A. The Proprotein Convertases in Hypercholesterolemia and Cardiovascular Diseases: Emphasis on Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin 9. *Pharmacol Rev*. 2017; 69 (1): 33-52.
11. Glerup S, Schulz R, Laufs U, Schluter KD. Physiological and therapeutic regulation of PCSK9 activity in cardiovascular disease. *Basic Res Cardiol*. 2017; 112 (3): 32.
12. Mancini GB, Baker S, Bergeron J, Fitchett D, Frohlich J, Genest J, et al. Diagnosis, prevention, and management of statin adverse effects and intolerance: proceedings of a Canadian Working Group Consensus Conference. *Can J Cardiol*. 2011; 27 (5): 635-662.
13. Marks D, Thorogood M, Neil HA, Humphries SE. A review on the diagnosis, natural history, and treatment of familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*. 2003; 168 (1): 1-14.
14. Gallego-Colon E, Daum A, Yosefy C. Statins and PCSK9 inhibitors: A new lipid-lowering therapy. *Eur J Pharmacol*. 2020; 878: 173114.
15. Robinson JG, Farnier M, Krempf M, Bergeron J, Luc G, Averna M, et al. Efficacy and safety of alirocumab in reducing lipids and cardiovascular events. *N Engl J Med*. 2015; 372 (16): 1489-1499.
16. Sabatine MS, Giugliano RP, Wiviott SD, Raal FJ, Blom DJ, Robinson J, et al. Efficacy and safety of evolocumab in reducing lipids and cardiovascular events. *N Engl J Med*. 2015; 372 (16): 1500-1509.
17. Sabatine MS, Giugliano RP, Keech AC, Honarpour N, Wiviott SD, Murphy SA, et al. Evolocumab and Clinical Outcomes in Patients with Cardiovascular Disease. *N Engl J Med*. 2017; 376 (18): 1713-1722.
18. Schwartz GG, Steg PG, Szarek M, Bhatt DL, Bitner VA, Diaz R, et al. Alirocumab and Cardiovascular Outcomes after Acute Coronary Syndrome. *N Engl J Med*. 2018; 379 (22): 2097-2107.
19. Harrison D, Griendling KK, Landmesser U, Hornig B, Drexler H. Role of oxidative stress in atherosclerosis. *The American journal of cardiology*. 2003; 91 (3A): 7A-11A.
20. Pizzino G, Irrera N, Cucinotta M, Pallio G, Mannino F, Arcoraci V, et al. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxid Med Cell Longev*. 2017; 2017: 8416763.
21. Di Meo S, Reed TT, Venditti P, Victor VM. Role of ROS and RNS Sources in Physiological and Pathological Conditions. *Oxid Med Cell Longev*. 2016; 2016: 1245049.
22. Violi F, Carnevale R, Loffredo L, Pignatelli P, Gallin JI. NADPH Oxidase-2 and Atherothrombosis: Insight From Chronic Granulomatous Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2017; 37 (2): 218-225.
23. Fabbrini E, Serafini M, Colic Baric I, Hazen SL, Klein S. Effect of plasma uric acid on antioxidant capacity, oxidative stress, and insulin sensitivity in obese subjects. *Diabetes*. 2014; 63 (3): 976-981.
24. Inoue M, Nakashima R, Enomoto M, Koike Y, Zhao X, Yip K, et al. Plasma redox imbalance caused by albumin oxidation promotes lung-predominant NETosis and pulmonary cancer metastasis. *Nat Commun*. 2018; 9 (1): 5116.
25. Cammisotto V, Nocella C, Bartimoccia S, Sanguigni V, Francomano D, Sciarretta S, et al. The Role of Antioxidants Supplementation in Clinical Practice: Focus on Cardiovascular Risk Factors. *Antioxidants (Basel)*. 2021; 10 (2).
26. Forman HJ, Zhang H, Rinna A. Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Mol Aspects Med*. 2009; 30 (1-2): 1-12.
27. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med*. 2005; 352(16):1685-95.
28. Shapiro MD, Fazio S. From Lipids to Inflammation: New Approaches to Reducing Atherosclerotic Risk. *Circulation research*. 2016; 118 (4): 732-749.
29. Pignatelli P, Pulcinelli FM, Lenti L, Gazzaniga PP, Violi F. Hydrogen peroxide is involved in collagen-induced platelet activation. *Blood*. 1998; 91(2): 484-490.
30. Violi F, Pignatelli P, Basili S. Nutrition, supplements, and vitamins in platelet function and bleeding. *Circulation*. 2010; 121 (8): 1033-1044.
31. Martire B, Rondelli R, Soresina A, Pignata C, Broccoletti T, Finocchi A, et al. Clinical features, long-term follow-up and outcome of a large cohort of patients with Chronic Granulomatous

- Disease: an Italian multicenter study. *Clin Immunol.* 2008; 126 (2): 155-1564.
32. Pignatelli P, Sanguigni V, Lenti L, Ferro D, Finocchi A, Rossi P, et al. gp91phox-dependent expression of platelet CD40 ligand. *Circulation.* 2004; 110 (10): 1326-1329.
 33. Podrez EA, Byzova TV, Febbraio M, Salomon RG, Ma Y, Valiyaveetil M, et al. Platelet CD36 links hyperlipidemia, oxidant stress and a prothrombotic phenotype. *Nature medicine.* 2007; 13 (9): 1086-1095.
 34. Magwenzi S, Woodward C, Wraith KS, Aburima A, Raslan Z, Jones H, et al. Oxidized LDL activates blood platelets through CD36/NOX2-mediated inhibition of the cGMP/protein kinase G signaling cascade. *Blood.* 2015; 125 (17): 2693-2703.
 35. Carnevale R, Bartimoccia S, Nocella C, Di Santo S, Loffredo L, Illuminati G, et al. LDL oxidation by platelets propagates platelet activation via an oxidative stress-mediated mechanism. *Atherosclerosis.* 2014; 237 (1): 108-116.
 36. Sawamura T, Kakino A, Fujita Y. LOX-1: a multi-ligand receptor at the crossroads of response to danger signals. *Curr Opin Lipidol.* 2012; 23 (5): 439-445.
 37. Ragusa R, Basta G, Neglia D, De Caterina R, Del Turco S, Caselli C. PCSK9 and atherosclerosis: Looking beyond LDL regulation. *European journal of clinical investigation.* 2021; 51 (4): e13459.
 38. Ding Z, Liu S, Wang X, Deng X, Fan Y, Sun C, et al. Hemodynamic shear stress via ROS modulates PCSK9 expression in human vascular endothelial and smooth muscle cells and along the mouse aorta. *Antioxid Redox Signal.* 2015; 22 (9): 760-771.
 39. Ding Z, Liu S, Wang X, Theus S, Deng X, Fan Y, et al. PCSK9 regulates expression of scavenger receptors and ox-LDL uptake in macrophages. *Cardiovascular research.* 2018; 114 (8): 1145-1153.
 40. Pastori D, Nocella C, Farcomeni A, Bartimoccia S, Santulli M, Vasaturo F, et al. Relationship of PCSK9 and Urinary Thromboxane Excretion to Cardiovascular Events in Patients With Atrial Fibrillation. *J Am Coll Cardiol.* 2017; 70 (12): 1455-1462.
 41. Cammisotto V, Pastori D, Nocella C, Bartimoccia S, Castellani V, Marchese C, et al. PCSK9 Regulates Nox2-Mediated Platelet Activation via CD36 Receptor in Patients with Atrial Fibrillation. *Antioxidants (Basel).* 2020; 9 (4).
 42. Pastori D, Ettorre E, Carnevale R, Nocella C, Bartimoccia S, Del Sordo E, et al. Interaction between serum endotoxemia and proprotein convertase subtilisin/kexin 9 (PCSK9) in patients with atrial fibrillation: A post-hoc analysis from the ATHERO-AF cohort. *Atherosclerosis.* 2019; 289: 195-200.
 43. Lee JS, Mukhopadhyay P, Matyas C, Trojnar E, Paloczi J, Yang YR, et al. PCSK9 inhibition as a novel therapeutic target for alcoholic liver disease. *Sci Rep.* 2019; 9 (1): 17167.
 44. Safaeian L, Mirian M, Bahrzadeh S. Evolocumab, a PCSK9 inhibitor, protects human endothelial cells against H2O2-induced oxidative stress. *Arch Physiol Biochem.* 2020; 1-6.
 45. Cammisotto V, Baratta F, Castellani V, Bartimoccia S, Nocella C, D'Erasmo L, et al. Proprotein Convertase Subtilisin Kexin Type 9 Inhibitors Reduce Platelet Activation Modulating ox-LDL Pathways. *Int J Mol Sci.* 2021; 22 (13).
 46. Jurk K, Kehrel BE. Platelets: physiology and biochemistry. *Semin Thromb Hemost.* 2005; 31 (4): 381-392.
 47. Furie B, Furie BC. Mechanisms of thrombus formation. *N Engl J Med.* 2008; 359 (9): 938-949.
 48. Semple JW, Italiano JE, Jr., Freedman J. Platelets and the immune continuum. *Nat Rev Immunol.* 2011; 11 (4): 264-274.
 49. Gresele P, Momi S, Migliacci R. Endothelium, venous thromboembolism and ischaemic cardiovascular events. *Thrombosis and haemostasis.* 2010; 103 (1): 56-61.
 50. Santos-Gallego CG, Picatoste B, Badimon JJ. Pathophysiology of acute coronary syndrome. *Curr Atheroscler Rep.* 2014; 16 (4): 401.
 51. Konstantinides SV, Meyer G, Becattini C, Bueno H, Geersing GJ, Harjola VP, et al. 2019 ESC Guidelines for the diagnosis and management of acute pulmonary embolism developed in collaboration with the European Respiratory Society (ERS). *Eur Heart J.* 2020; 41 (4): 543-603.
 52. Camera M, Rossetti L, Barbieri SS, Zanotti I, Canciani B, Trabattoni D, et al. PCSK9 as a Positive Modulator of Platelet Activation. *Journal of the American College of Cardiology.* 2018; 71 (8): 952-954.
 53. Qi Z, Hu L, Zhang J, Yang W, Liu X, Jia D, et al. PCSK9 (Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin 9) Enhances Platelet Activation, Thrombosis, and Myocardial Infarct Expansion by Binding to Platelet CD36. *Circulation.* 2021; 143 (1): 45-61.
 54. von Bruhl ML, Stark K, Steinhart A, Chandraratne S, Konrad I, Lorenz M, et al. Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo. *J Exp Med.* 2012; 209 (4): 819-835.
 55. Baidildinova G, Nagy M, Jurk K, Wild PS, Ten Cate H, van der Meijden PEJ. Soluble Platelet Release Factors as Biomarkers for Cardiovascular Disease. *Front Cardiovasc Med.* 2021; 8: 684920.

56. El-Seweidy MM, Sarhan Amin R, Hussein Atteia H, El-Zeiky RR, Al-Gabri NA. Dyslipidemia induced inflammatory status, platelet activation and endothelial dysfunction in rabbits: Protective role of 10-Dehydrogingerdione. *Biomed Pharmacother.* 2019; 110: 456-464.
57. Navarese EP, Kolodziejczak M, Winter MP, Alimohammadi A, Lang IM, Buffon A, et al. Association of PCSK9 with platelet reactivity in patients with acute coronary syndrome treated with prasugrel or ticagrelor: The PCSK9-REACT study. *International journal of cardiology.* 2017; 227: 644-649.
58. Catella F, FitzGerald GA. Paired analysis of urinary thromboxane B2 metabolites in humans. *Thrombosis research.* 1987; 47 (6): 647-656.
59. Hofmann A, Brunssen C, Morawietz H. Contribution of lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 and LOX-1 modulating compounds to vascular diseases. *Vascul Pharmacol.* 2017.
60. Barale C, Bonomo K, Frascaroli C, Morotti A, Guerrasio A, Cavalot F, et al. Platelet function and activation markers in primary hypercholesterolemia treated with anti-PCSK9 monoclonal antibody: A 12-month follow-up. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2020; 30 (2): 282-291.