

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II



**DOTTORATO DI RICERCA IN  
FISIOPATOLOGIA CLINICA E MEDICINA SPERIMENTALE**

*INDIRIZZO IN SCIENZE CARDIOVASCOLARI*

**XIX Ciclo**

**Coordinatore: Prof. Gianni Marone**

**TESI DI DOTTORATO**

“L’Adipocitochina Resistina Induce l’Espressione delle Molecole di Adesione e del Fattore Tissutale in Cellule Endoteliali Umane”

TUTOR

**Chiar.mo**

Prof. Massimo Chiariello

CANDIDATO

Dott. **Paolo Calabrò**

## **INDICE**

### **INTRODUZIONE**

Definizione e Epidemiologia della Cardiopatia Ischemica	pag. 3
Fisiopatologia della Cardiopatia Ischemica	pag. 3
Infiammazione ed Aterosclerosi	pag. 5
Instabilizzazione acuta della Placca Aterosclerotica	pag. 7
Aterosclerosi e Fattori di Rischio Cardiovascolare	pag. 9
Tissue Factor (TF) o Tromboplastina Tissutale	pag. 10
Tessuto Adiposo, Adipochine e Resistina	pag. 13
<b>SCOPO DELLO STUDIO</b>	pag. 16
<b>METODI</b>	pag. 18
<b>RISULTATI</b>	pag. 25
<b>DISCUSSIONE</b>	pag. 28
Prospettive Cliniche	pag. 32
<b>LEGENDA DELLE FIGURE</b>	pag. 33
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	pag. 37
<b>FIGURE</b>	pag. 45

## **INTRODUZIONE**

### **Definizione ed Epidemiologia della Cardiopatia Ischemica**

La Cardiopatia Ischemica costituisce la più importante causa di disabilità e mortalità nei paesi industrializzati; negli ultimi decenni, tuttavia, si è assistito ad un decremento più o meno significativo nell'incidenza delle malattie cardiovascolari, legato anche al notevole miglioramento delle tecniche diagnostiche e terapeutiche (1). In Italia, la prevalenza di individui affetti da invalidità cardiovascolare è pari al 4,4 per mille (dati ISTAT) e la Cardiopatia Ischemica è la causa del 28% di tutte le morti, verificandosi in media 100.000 casi di infarto miocardico acuto con circa 30.000 decessi annui. Studi epidemiologici hanno dimostrato l'esistenza di fattori di rischio cardiovascolare cosiddetti non modificabili, quali età, sesso maschile, familiarità per Cardiopatia Ischemica ed ischemia precoce, e di fattori di rischio modificabili, quali fumo di sigaretta, aumentati livelli di colesterolo LDL, Ipertensione Arteriosa Sistemica, Ipertrofia Ventricolare Sinistra, Diabete Mellito, obesità, sedentarietà, bassi livelli di colesterolo HDL (2).

### **Fisiopatologia della Cardiopatia Ischemica**

In condizioni fisiologiche, le resistenze intrinseche al flusso coronarico sono localizzate essenzialmente a livello dei vasi sub-endocardici, mentre può essere considerata trascurabile la loro presenza a livello sub-epicardico. La comparsa di stenosi

coronariche rende tuttavia significative le resistenze poste dalla componente vascolare epicardica. Il compenso che il circolo coronarico offre a tali stenosi si esplica con la capacità dilatativa a valle della stenosi stessa, la quale scaturisce dalla notevole riserva vasodilatatoria posseduta dai vasi epicardici. Tale meccanismo di compenso è sufficiente, in condizioni basali, a garantire un flusso coronarico adeguato anche in presenza di stenosi del 60-70% del lume vasale; in caso di aumentate richieste metaboliche, tuttavia, sarà compromessa l'ulteriore possibilità vasodilatatoria. Quando la riduzione del diametro coronarico sale al di sopra dell'80%, il flusso ematico risulterà compromesso anche in condizioni basali e la stenosi sarà definita critica (2).

La Cardiopatia Ischemica, pertanto, si manifesta sul piano anatomo-patologico con stenosi vasale coronarica critica; sul piano fisiopatologico si manifesta con lo squilibrio tra richiesta ed apporto di ossigeno al miocardio, per una primitiva riduzione del flusso coronarico, anche in assenza di un aumento delle richieste metaboliche (ischemia primaria), oppure per l'incapacità del flusso coronarico di adeguarsi a situazioni di aumentato consumo di ossigeno (ischemia secondaria); sul piano clinico si manifesta con angor, anche se esiste una molteplicità di possibili quadri clinici che si intercalano tra gli estremi dell'angina in presenza di coronarie apparentemente indenni e le stenosi critiche in assenza di sintomi

clinici riferibili ad angina (la cosiddetta 'ischemia silente', tipica dei soggetti diabetici ed anziani) (3).

Tra i meccanismi vascolari in grado di determinare ischemia miocardica acuta si annoverano, non solo l'ostruzione del vaso da parte della placca aterosclerotica, ma anche fenomeni di alterata vasomotilità coronarica e processi di attivazione ed evoluzione della placca (questi due ultimi vedono come fattore iniziante e/o aggravante, o comunque partecipante, la disfunzione endoteliale e l'attivazione ed instabilizzazione della placca).

### **Infiammazione ed Aterosclerosi**

Negli ultimi dieci anni le nostre conoscenze circa il ruolo dell'infiammazione nell'aterosclerosi sono decisamente migliorate; inizialmente considerata una patologia causata dal semplice deposito di lipidi, con il progresso della ricerca sperimentale l'aterosclerosi è stata legata sempre di più all'infiammazione, e le attuali visioni la considerano oramai una patologia dinamica e progressiva, risultante dalla combinazione di disfunzione endoteliale e infiammazione.

I meccanismi infiammatori giocano un ruolo centrale nel mediare tutte le fasi dell'aterosclerosi, dall'iniziale reclutamento dei leucociti circolanti nella parete arteriosa, alla progressione della placca, fino all'eventuale rottura della placca aterosclerotica instabile (4).

I leucociti circolanti non aderiscono all'endotelio normale, tuttavia, quando le cellule endoteliali, in seguito all'esposizione a fattori di rischio cardiovascolari e infiammatori, vanno incontro ad attivazione, cominciano ad esprimere molecole di adesione (CAMs) che selettivamente legano i leucociti, tra le quali figurano la P-selectina e la E-selectina, membri della superfamiglia delle Immunoglobuline, la Molecola di Adesione Intercellulare-1 (ICAM-1) e la Molecola di Adesione Vascolare-1 (VCAM-1) (5).

L'espressione di molecole di adesione è indotta da molte citochine pro-infiammatorie come IL1- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , dalla proteina C reattiva di fase acuta (PCR), dalle interazioni tra CD40 ed il suo ligando (CD40L) e dall'uptake delle LDL ossidate da parte del Recettore-1 delle LDL Ossidate (LOX-1) (5).

Una volta aderite all'endotelio, le cellule infiammatorie migrano nello spazio sub-endoteliale; a livello dell'ateroma in accrescimento i macrofagi, le cellule endoteliali e le cellule muscolari lisce producono il TNF- $\alpha$  che, insieme all'IFN- $\gamma$  e all'IL-1, stimola le cellule muscolari lisce a produrre IL-6.

Lo stato pro-infiammatorio locale è fonte di continuo stimolo chemiotattico per i leucociti circolanti, provoca aumento dell'espressione di Recettori Scavenger e promuove una ulteriore replicazione dei macrofagi (6).

Se i fattori di rischio infiammatori continuano ad essere presenti, l'ateroma neo-formato evolverà in lesione più complessa, con la formazione di un pool lipidico intra-placca ricco di Tissue Factor, molecola pro-trombotica, e la proliferazione, la migrazione verso l'intima e la sintesi di collagene (che contribuisce alla resistenza del cappuccio fibroso) da parte delle cellule muscolari lisce (7).

All'interno della placca i monociti acquisiscono le caratteristiche morfologiche dei macrofagi, fino a diventare cellule schiumose: aumenta, sulla loro superficie, l'espressione di Recettori Scavenger delle lipoproteine modificate, come il Recettore Scavenger A (SRA) e CD36, rendendo possibile l'internalizzazione delle lipoproteine modificate; secernono, inoltre, una serie di fattori di crescita e citochine coinvolti nella progressione della lesione e nella complicazione di essa. In più, i macrofagi si replicano nell'intima.

Anche i linfociti T partecipano in maniera critica all'aterogenesi, promuovendo la trombogenicità del core lipidico attraverso l'espressione di CD40L, che stimola la produzione di TF da parte dei macrofagi, il quale, esposto al Fattore VII plasmatico, dà inizio alla cascata coagulativa (8).

### **Instabilizzazione acuta della Placca Aterosclerotica**

Importanti lavori svolti negli anni Novanta hanno dimostrato che la maggioranza degli infarti miocardici sono determinati da lesioni aterosclerotiche che causano ostruzione di meno del 50% del lume

vasale, confermando che le caratteristiche biologiche della placca, piuttosto che il livello di ostruzione al flusso, rendono una lesione aterosclerotica più o meno incline a precipitare complicanze ischemiche acute (9).

La rottura delle placche potrebbe scatenare il processo trombotico e promuovere l'improvvisa espansione delle lesioni ateromasiche (10).

Si possono realizzare tre tipi di rottura: l'erosione superficiale (ovvero la generazione di aree microscopiche di desquamazione delle cellule endoteliali) fornisce un possibile nido per un trombo piastrinico, allorquando viene esposto il collagene sub-endoteliale e il Fattore di von Willebrand, il quale promuove l'adesione delle piastrine e la loro attivazione. La rottura dei microvasi neoformati all'interno delle placche aterosclerotiche costituisce un altro sistema di instabilizzazione improvvisa della placca. Negli ateromi è presente attività angiogenetica; i neo-vasi all'interno della placca sarebbero particolarmente fragili e causerebbero micro-emorragie. Il terzo, e più comune, meccanismo di rottura della placca è la frattura del cappuccio fibroso (11). Le molecole del collagene interstiziale costituiscono la principale componente di resistenza del cappuccio fibroso, e molti processi strettamente correlati determinano il livello di collagene cruciale per la stabilità di questa struttura. Il bilancio dinamico tra la sintesi e la rottura del collagene nel cappuccio fibroso è regolato dalle citochine: il PDGF e il TGF- $\beta$  aumentano il tasso di produzione di collagene, mentre l'IFN- $\gamma$  può



limitarne la sintesi da parte delle cellule muscolari lisce; i macrofagi, inoltre, in risposta alla stimolazione fornita dalle cellule T, secernono metallo-proteinasi di matrice che, insieme con le collagenasi, degradano attivamente il collagene e le altre proteine della matrice extra-cellulare, rendendo il cappuccio fibroso debole ed a rischio di rottura.

La rottura del cappuccio fibroso provoca il rilascio del contenuto lipidico pro-trombotico accumulatosi nel lume della placca, costituito essenzialmente dal collagene sub-endoteliale, dal TF e dal Fattore di von Willebrand, i quali diventano pertanto accessibili ai Fattori della Coagulazione circolanti, con l'innesco della cascata coagulativa, che conduce alla formazione di trombina, e con l'attivazione e l'aggregazione piastrinica, che culminano nella trombosi acuta e nell'infarto miocardico.

### **Aterosclerosi e Fattori di Rischio Cardiovascolare**

L'Angiotensina II (ATII) è in grado di stimolare l'infiammazione intimale mediante la produzione di anione superossido da parte delle cellule endoteliali e delle cellule muscolari lisce e di aumentare l'espressione delle citochine pro-infiammatorie.

L'obesità, l'insulino-resistenza ed il diabete (la cosiddetta sindrome metabolica) sono uno dei principali contributi allo sviluppo dell'aterosclerosi; il tessuto adiposo produce citochine che riducono la sensibilità insulinica e fornisce uno stimolo sistemico pro-infiammatorio, mentre l'iperglicemia persistente accelererebbe la

formazione di prodotti finali della glicazione avanzata (AGE), altro trigger per l'inflammation arteriosa.

Gli agenti infettivi potrebbero generare stimoli infiammatori potenzianti l'aterogenesi; le infezioni acute possono alterare i sistemi trombotico e fibrinolitico, precipitando eventi ischemici. Molte placche umane mostrano segni di infezione da agenti microbici quali *Chlamidia Pneumoniae*, che potrebbe rilasciare il lipopolisaccaride (LPS) e le Heat Shock Proteins (HSP), così da stimolare la produzione di mediatori pro-infiammatori da parte delle cellule endoteliali e muscolari lisce e dei leucociti infiltrati (6).

### **Tissue Factor (TF) o Tromboplastina Tissutale**

Il Tissue Factor (TF) è coinvolto nella fisiopatologia delle malattie sistemiche infiammatorie, delle coagulopatie, dell'aterosclerosi, dell'insufficienza renale cronica, della neo-angiogenesi tumorale e della metastatizzazione. Esiste una correlazione diretta tra livelli di TF e creatininemia, glicemia, colesterolo LDL, numero di sigarette fumate al giorno, ed una correlazione inversa tra livelli di TF e di insulina sierica (12).

Il TF è una proteina integrale di membrana, del peso molecolare di 25kD, espressa costitutivamente da monociti, macrofagi e fibroblasti (13); secondo alcuni autori (14) anche i cardiomiociti esprimerebbero il TF.

Recentemente è stata scoperta una piccola quota di TF circolante, che ne indicherebbe una produzione anche da parte di altri tipi cellulari ancora non noti, sebbene evidenze suggeriscano che i leucociti ne siano una delle principali sorgenti.

La formazione del trombo, primum movens delle complicanze acute della CAD, inizia quando la rottura della parete vasale o delle placche aterosclerotiche espone il TF al Fattore VII (FVII) circolante, attivandolo e innescando entrambe le cascate coagulative (quella estrinseca, principalmente, ma anche quella intrinseca) mediante la successiva attivazione del FIX che, a sua volta, attiva il FX, con la formazione di trombina e la possibile occlusione, completa e prolungata, del vaso ed evoluzione verso l'infarto miocardio (15).

L'attività del TF è inibita dal Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI), l'unico inibitore ad oggi noto della via estrinseca della cascata coagulativa, il quale forma un complesso neutralizzante interagendo con il TF, il FVIIa e il FXa (16).

Dal momento che il TF è una proteina integrale di membrana la cui espressione è limitata all'avventizia (a parte una sporadica espressione nella media), l'attivazione della coagulazione si realizza solo dove sussiste un danno endoteliale.

Tuttavia, studi sperimentali dimostrano che elevati livelli di TF sono presenti nei macrofagi, nelle cellule muscolari lisce e nelle cellule schiumose all'interno delle placche, oltre che nel core extra-

cellulare ricco di lipidi, per cui anche la rottura della placca attiva la coagulazione. La trombogenicità della placca è direttamente correlata, quindi, al suo contenuto di TF (17).

E' stato dimostrato che i livelli plasmatici di TF sono elevati in pazienti con IMA (18), in pazienti con angina stabile e in pazienti con angina instabile (19); esisterebbe un rischio maggiore di decorso sfavorevole in pazienti con angina instabile ed aumentati livelli di TF ed una correlazione tra livelli più elevati di TF e maggiore incidenza di re-infarto (20). Peraltro, il TF giocherebbe un ruolo, non solo nello sviluppo della Sindrome Coronarica Acuta, ma anche nella progressione della CAD, attraverso il deposito intramurale, TF-dipendente, di fibrina, che si realizza a seguito della rottura e successiva progressione della lesione aterosclerotica (21).

Studi su colture cellulari hanno dimostrato che il complesso TF/VIIa è critico per la migrazione delle cellule muscolari lisce (22).

Al contrario del ruolo alquanto noto nell'iniziare il trombo, rimane ancora da chiarire l'influenza che il TF derivato dalla parete vasale possiede nella propagazione di esso. Si è ipotizzato possa diventare inaccessibile ai Fattori della Coagulazione (e pertanto non partecipe alla progressione del trombo stesso), in conseguenza del rapido depositarsi di piastrine e fibrina sulla superficie lesa del vaso, che fungerebbe da barriera fisica all'interazione del TF con il circolo ematico. Il TF plasmatico, invece, è capace di depositarsi nel

trombo, per cui potrebbe giocare un ruolo significativo nella crescita di esso, supportando la continua attivazione del FX e la conseguente generazione di trombina alla superficie del coagulo (23).

### **Tessuto Adiposo, Adipochine e Resistina**

L'obesità costituisce uno dei principali problemi di salute pubblica degli ultimi decenni; essa si associa all'aumentata incidenza di molte patologie, tra cui ipertensione, dislipidemia, insulino-resistenza, diabete ed aterosclerosi, oltre a predisporre a numerose malattie indipendenti dal quadro della cosiddetta Sindrome Metabolica, quali asma, cancro del seno e steatosi epatica non alcool-correlata (24). L'obesità si associa ad uno stato di infiammazione generalizzata ed alla disfunzione endoteliale; gli adipociti e le altre cellule presenti nel tessuto adiposo sono in grado di liberare numerosi fattori vaso-attivi che determinano uno stato di morbosità cardiovascolare (25).

Queste sostanze, che esercitano significativi effetti sul sistema immune, sono chiamate adipocitochine in virtù della loro derivazione dal tessuto adiposo.

Il tessuto adiposo, pertanto, non è un semplice deposito di energia, ma un vero e proprio organo endocrino, i cui ormoni, tuttavia, non sono stati ancora caratterizzati completamente; tra l'altro, lo studio della natura e dell'attività delle adipocitochine rende sempre più

chiaro che esso è inoltre, se non principalmente, un organo immune (26).

Le cellule infiammatorie che infiltrano il tessuto adiposo generano un ambiente che perpetua l'infiammazione all'interno del tessuto adiposo stesso ed attivano gli adipociti a produrre i mediatori infiammatori e le adipocitochine, creando un circolo vizioso tra infiammazione e obesità (24).

Tra le adipocitochine, la più recente in ordine di scoperta è la Resistina, il cui nome scaturisce dalla sua capacità di determinare resistenza all'insulina (27). Peptide di 114 amminoacidi, la Resistina appartiene alla famiglia delle proteine ricche di cisteina, il cui recettore non è stato ancora identificato, e poco è ancora oggi noto sui meccanismi intra-cellulari da essa innescati. E' presente in sede sia intra-cellulare che extra-cellulare, per cui è una proteina secretoria.

Esiste una correlazione diretta tra Resistina ricombinante ed attivazione delle cellule endoteliali del distretto venoso (28); inoltre, la Resistina induce la proliferazione delle cellule muscolari lisce di arteria coronarica umana in maniera dose-dipendente (29), svolgendo un ruolo fondamentale nella patogenesi della re-stenosi vascolare, attraverso l'attivazione del pathway delle chinasi 1/2 (ERK), regolato da segnali extracellulari, e della chinasi PI3K. Il rilascio di Resistina sembra essere stimolato dall'infiammazione, dal lipopolisaccaride (LPS), dall'IL-6, dall'iperglicemia, dalla crescita e dagli ormoni gonadici.

Le cellule immuni, inoltre, sembrano essere la più importante fonte di questa adipocitochina. Infatti, gli studi di Jung et al. (30) hanno dimostrato che i macrofagi infiltranti la placca aterosclerotica producono Resistina, determinando disfunzione endoteliale, incrementando la proliferazione delle cellule muscolari lisce vasali e contribuendo all'aterosclerosi mediante la secrezione di citochine pro-infiammatorie da parte dei macrofagi e dei monociti.

I livelli di Resistina sono elevati nei pazienti sopravvissuti ad infarto miocardico ed in quelli con patologia coronarica precoce (31).

La Resistina ricombinante è in grado di determinare l'attivazione delle cellule endoteliali venose in condizioni sperimentali in vitro, inducendo l'espressione delle molecole di adesione e di alcune citochine infiammatorie (28). Comunque, rimane ancora da accertare se la Resistina sia solo un semplice marker di infiammazione o abbia anche effetti sistemici sull'aterosclerosi.

## **SCOPO DELLO STUDIO**

È stato dimostrato che l'infiammazione è alla base della patologia aterosclerotica e che da essa dipende la disfunzione endoteliale, uno degli elementi più precocemente implicati nello sviluppo della placca ateromasica.

L'attivazione endoteliale che ne deriva, come accennato in precedenza, si associa all'espressione di molecole di adesione quali VCAM-1 e ICAM-1, che servono a richiamare localmente i leucociti plasmatici.

La formazione del trombo, come prima accennato, rappresenta il primum movens delle complicanze acute della CAD ed inizia quando la rottura della parete vasale o delle placche aterosclerotiche espone il TF al Fattore VII (FVII) circolante, attivandolo e innescando entrambe le cascate coagulative.

La resistina è un'adipochina capace di stimolare un fenotipo proinfiammatorio nelle cellule monocitarie plasmatiche, ossia nei precursori delle cellule schiumose. Inoltre è considerata un marker plasmatico predittivo di aterosclerosi coronarica ed è secreta dai macrofagi presenti nell'ateroma.

In questo studio sono stati pertanto studiati i rapporti tra resistina, infiammazione, aterosclerosi e trombosi, testando in vitro la capacità della resistina di indurre un fenotipo proaterosclerotico e protrombotico nelle cellule endoteliali di arteria coronarica umana.



In particolare, è stata studiata la capacità di questa adipochina di stimolare l'espressione di molecole di adesione e del Fattore Tissutale ed i meccanismi intracellulari implicati, confrontando i risultati ottenuti con gli effetti del lipopolisaccaride batterico (LPS), nota molecola proinfiammatoria.

## **METODI**

### **Colture Cellulari**

Gli esperimenti sono stati condotti su cellule endoteliali provenienti da arteria coronarica umana (HCAEC, Cambrex Bio Science, USA). Le cellule sono state coltivate in EGM2 medium (Cambrex Bio Science, USA) con l'aggiunta di fattore di crescita per cellule endoteliali e siero fetale al 10%. Ci si è serviti di cellule a passaggi compresi tra 2 e 5.

Sono stati effettuati una serie di studi preliminari tesi ad ottimizzare il tempo di incubazione, mentre per le concentrazioni di Resistina ricombinante umana (PeproTech, Inc.) da utilizzare si è fatto riferimento a lavori precedenti (28, 29). Le concentrazioni di 25, 50 e 100 ng/mL di Resistina umana (MW 11.42 kDa) corrispondono rispettivamente a 2.19, 4.38 e 8.76 nM. Il livello di endotossina nella preparazione della Resistina era < 0.125 EU/mL (<12.5 pg/mL), come stabilito dal limulus assay. Sono stati analizzati tutti i mezzi e l'acqua, ed il livello di endotossina trovato era <0.125 EU/mL.

### **Analisi dell'espressione di VCAM-1 e ICAM-1**

Le HCAECs sono state incubate con resistina (25-50-100 ng/mL) o con LPS (50 µg/mL) per 12 ore al fine di ricercare l'espressione delle molecole di adesione (cellular adhesion molecules, CAMs) mediante analisi per citometria a flusso (Fluorescence-activated Cell Sorting, FACS). Dopo la stimolazione, le cellule sono state

staccate con 10 mmol/L di EDTA in soluzione salina con buffer fosfato allo 0.5%, prelevate dopo centrifugazione e incubate per 30 minuti al buio in ghiaccio con anticorpi monoclonali anti-VCAM-1 (CD106) o anti-ICAM-1 (CD54), marcati con i fluorocromi R-ficoeritrina o fluoresceina isotiocianato (Pharmingen), oppure incubate con un anticorpo aspecifico dell'isotipo appropriato di IgG, marcato con gli stessi fluorocromi e usato come controllo. E' stata analizzata l'intensità della fluorescenza di 104 cellule vive per ogni campione, mediante FACS Calibur Flow Cytometer (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Diego, CA) usando il software di acquisizione Cell Quest (Becton Dickinson). Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti in triplicato.

### **Effetti della Resistina sulla trascrizione di TF**

Gli effetti della Resistina sull'RNA messaggero specifico per il TF sono stati ricercati mediante l'analisi PCR quantitativa (32). Le cellule endoteliali (ECs) sono state incubate con Resistina (50 ng/mL) per trenta minuti, al termine dei quali le cellule sono state lavate con PBS ed è stato aggiunto mezzo fresco (EGM2 contenente siero allo 0.1%). E' stato estratto l'm-RNA totale a 0, 30, 60 e 120 minuti dopo la stimolazione con Resistina, ed i livelli di TF-mRNA sono stati valutati con la real-time reverse transcription (RT) e mediante polymerase chain reaction (PCR) con LightCycler (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland).

L'mRNA totale è stato estratto dalle colture cellulari usando TRIzol reagent (GIBCO), secondo le istruzioni della ditta produttrice. La reverse transcription è stata effettuata utilizzando mMLV (GIBCO) e 100 ng di campioni di RNA prelevati da ogni coltura presente in ciascuna piastra. I campioni sono stati corsi in triplicato, in reazioni di 50 uL, usando la macchina per PCR quantitativa ABI PRISM 5700 (Applied Biosystems). I campioni sono stati incubati a 50 °C per 2 minuti, 95 °C per 10 minuti e sono stati sottoposti a 40 cicli a 95 °C per 15 secondi e 60 °C per 1 minuto. Sono stati disegnati oligonucleotidi specifici per GAPDH umana (per la normalizzazione) e TF umano, in base alle sequenze pubblicate, usando il PRIMER EXPRESS Software (Applied Biosystems) e sono stati testati per valutarne la specificità. Per rilevare la fluorescenza è stato usato il SYBR-green ed uno standard interno (Applied Biosystems) per quantizzare il risultato. Nei controlli positivi, le HCAECs sono state incubate per 30 minuti con il lipopolisaccaride (LPS) (50 ug/mL) ed a 60 minuti è stato estratto l'mRNA. Sono stati realizzati tre diversi esperimenti per ogni condizione sperimentale.

### **Effetti dose-risposta della Resistina sull'espressione di TF**

Le ECs sono state incubate con Resistina (25-100 ng/mL) o con LPS (50 ug/mL) per 12 ore e è stata valutata l'espressione di TF mediante l'analisi FACS. Dopo aver ricevuto lo stimolo, le cellule

sono state staccate con 10 mmol/L di EDTA in soluzione salina con buffer fosfato allo 0.5%, recuperate dopo centrifugazione e incubate per 30 minuti al buio in ghiaccio con anticorpi monoclonali anti-TF marcati con R-phycoerythrina (Pharmingen), o con l'appropriato isotipo di IgG come controllo. E' stata analizzata l'intensità della fluorescenza di 10.000 cellule vive per ogni campione, mediante FACSCalibur Flow Cytometer (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Diego, CA) servendosi del software di acquisizione Cell Quest (Becton Dickinson).

Al fine di accertare se l'espressione di TF indotta dalla Resistina fosse il risultato di una sintesi de novo di questa proteina, in un altro gruppo di esperimenti le cellule sono state pre-incubate, prima dell'aggiunta di Resistina (50 ng/ml), con cicloesimide (10 ug/mL), un inibitore della sintesi proteica, o con 5,6- dicloro- 1-β-d-ribofuranosilbenzimidazolo (DRB, 10 ug/mL), un inibitore della trascrizione del DNA. Sono stati realizzati sei diversi esperimenti per ogni condizione sperimentale.

### **Effetti dose-risposta della Resistina sull'attività di TF**

Le ECs sono state incubate con concentrazioni crescenti di Resistina (25-100 ng/mL) per 6 ore. L'attività di TF è stata determinata mediante un dosaggio colorimetrico in due tappe basato sulla capacità del TF di promuovere la produzione del Fattore della Coagulazione Xa (33). Le cellule sono state incubate con 1 nmole di FVIIa ricombinante umano (Novo Nordisk A/S

Gentofte, Denmark), ed in seguito con 100 nmole di FX umano purificato (Calbiochem-Novobiochem, La Jolla, CA, USA) e 5mM di CaCl<sub>2</sub> per 15 minuti a 37 °C. E' stato poi aggiunto un substrato cromogeno specifico per FX, ed è stato incubato per 30 minuti a 37 °C. La reazione è stata quindi interrotta mediante l'aggiunta di 200 uL/mL di una soluzione di acido acetico al 30%. Il cambiamento della densità ottica a 405 nanometri è stato quantificato con uno spettrofotometro.

Con un altro gruppo di esperimenti si è valutato se l'attività del TF indotta dalla Resistina fosse il risultato della sintesi de novo di questa proteina. Per ottenere ciò, le cellule sono state pre-incubate con cicloesimide (10 ug/mL), un inibitore della sintesi proteica, o con 5,6- dicloro- 1-β-d-ribofuranosilbenzimidazolo (DRB, 10 μg/mL), un inibitore della trascrizione del DNA, prima dell'aggiunta della Resistina (50 ng/mL). Ulteriori esperimenti di controllo sono stati effettuati pre-incubando le ECs con un anticorpo monoclonale murino anti-TF umano (American Diagnostica Inc, Greenwich, CT, USA). I controlli positivi sono stati ottenuti con ECs incubate per 6 ore con LPS (50 ug/mL). Sono stati realizzati sei diversi esperimenti per ogni condizione sperimentale.

### **Effetti della Resistina sull'attivazione di NF-κB**

Al fine di analizzare più accuratamente i meccanismi intra-cellulari attraverso cui la Resistina induce il TF sulle ECs, abbiamo testato,

con un altro gruppo di esperimenti, l'ipotesi che NF- $\kappa$ B possa avere un ruolo nel mediare questo fenomeno.

I livelli delle proteine NF- $\kappa$ B negli estratti nucleari delle cellule sono stati analizzati mediante metodica EMSA. Le ECs, tenute in un mezzo senza siero, sono state lavate ed incubate con Resistina (25-100 ng/mL) per 60 minuti. Le cellule incubate con 50 ug/mL di LPS sono state usate come controllo positivo. I controlli comprendevano cellule pre-incubate con PDTC, 100  $\mu$ mol/L, un inibitore dell'attivazione di NF- $\kappa$ B, per 60 minuti prima della stimolazione con Resistina, come sopra descritto.

Le proteine nucleari di queste cellule sono state isolate (33) ed è stata effettuata un'analisi EMSA usando un oligonucleotide di NF- $\kappa$ B a doppia elica marcato con  $^{32}$ P (5'-ACTTGAGGGGACTTTCCCAGGC-3'). Le proteine nucleari sono state incubate con l'oligonucleotide per 30 minuti, sottoposte ad elettroforesi su gel ed quindi ad acquisizione di immagine mediante RX. Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti in triplicato.

Al fine di stabilire un legame tra l'attivazione del fattore NF $\kappa$ B e l'induzione dell'espressione delle CAM studiate, abbiamo utilizzato uno specifico inibitore dell'attivazione di questo fattore trascrizionale, il PDTC (100  $\mu$ mol/L), prima della stimolazione con resistina.

### **Analisi statistica**

Tutti i dati sono stati presentati come media  $\pm$  deviazione standard.

I dati sono stati analizzati utilizzando il test di Scheffe per le comparazioni multiple. E' stato considerato statisticamente significativo un valore di  $p < 0.05$ .



## **RISULTATI**

### **Effetti della resistina sull'espressione delle CAMs**

Le HCAECs esprimono, in condizioni basali, bassi livelli di VCAM-1 e ICAM-1. La stimolazione con LPS (50 µg/mL), noto per la sua capacità di indurre l'espressione delle CAMs sulle cellule endoteliali, ha determinato un significativo incremento sia di VCAM-1 che di ICAM-1. Anche l'incubazione con differenti dosi di resistina (25-50-100 ng/mL) ha indotto un significativo incremento dose-dipendente dell'espressione delle CAMs (Fig. 1). In particolare, la resistina ha prodotto un incremento dell'espressione di VCAM-1 di 1.6 volte rispetto alle cellule incubate con il solo mezzo di coltura, già alla concentrazione di 25 ng/mL e l'effetto massimo a 100 ng/mL (2.6 volte rispetto alle cellule incubate con il solo mezzo di coltura). Un simile effetto è stato osservato anche per l'espressione di ICAM-1. Infatti la resistina ha indotto anche in questo caso un incremento dell'espressione di ICAM-1 alla concentrazione di 25 ng/mL (1.8 volte rispetto alle cellule incubate con il solo mezzo di coltura) e l'effetto massimo a 100 ng/mL (3.2 volte rispetto alle cellule incubate con il solo mezzo di coltura).

### **Effetti della Resistina sulla trascrizione di TF**

Il TF-mRNA era indosabile nelle ECs non stimolate, così come previsto (35). L'incubazione con Resistina (50 ng/mL) ha provocato un incremento progressivo e tempo-dipendente dei livelli di mRNA-TF, come confrontato con le cellule non stimolate. Un incremento significativo nei livelli di TF-mRNA è stato osservato dopo 30 minuti di incubazione con Resistina, con un picco a 60 minuti (Figura 2).

### **Effetti dose-risposta della Resistina su espressione e attività di TF**

Le ECs al tempo 0 mostravano espressione ed attività di TF indosabile; l'esposizione a diverse dosi (25-100 ng/mL) di Resistina ha indotto un significativo aumento dose-dipendente sia dell'espressione che dell'attività di TF (Figura 3 e 4). In particolare, la Resistina ha mostrato un significativo aumento dell'espressione e dell'attività di TF alla concentrazione di 25 ng/mL (rispettivamente 2.3 e 1.7 volte rispetto alle cellule incubate con il solo mezzo di coltura), concentrazione che è vicina ai livelli plasmatici clinici di Resistina dell'obesità e dei pazienti diabetici (36, 37), e l'effetto massimo a 100 ng/mL (rispettivamente 4.1 e 2.4 volte rispetto alle cellule incubate con il solo mezzo di coltura).

In esperimenti addizionali, la pre-incubazione con cicloesimide, un inibitore della sintesi proteica, o con DRB, un inibitore della

trascrizione del DNA, ha inibito completamente l'attività del TF (Figura 5). Questi dati suggeriscono che la Resistina è in grado di indurre la sintesi de novo di TF e queste nuove molecole di TF sono poi espresse in forma attiva sulla superficie cellulare. Inoltre, i controlli, realizzati incubando HCAECs con un anticorpo monoclonale murino anti-TF umano, hanno confermato che l'attività pro-coagulante misurata è in realtà dovuta all'espressione del TF sulla superficie cellulare dopo l'induzione da parte della Resistina (dati non mostrati).

### **La Resistina e l'attivazione di NF-kB**

Per meglio valutare la relazione esistente tra i meccanismi intracellulari attivati dopo la stimolazione con Resistina e l'espressione di TF da essa indotta, abbiamo effettuato un'analisi EMSA sugli estratti nucleari ottenuti dalle cellule stimulate per analizzare l'attività di NF-kB. Come mostrato in Figura 6, NF-kB è stato attivato dopo incubazione delle ECs con Resistina (25-100 ng/mL). In effetti, la Resistina ha indotto uno shift distinto della banda nelle cellule stimulate, simile a quello osservato nelle cellule trattate con LPS (controllo positivo), mentre nessuno shift è stato osservato nei controlli non stimolati. Abbiamo, inoltre, utilizzato uno specifico inibitore dell'attivazione di NF-kB, il PDTC (100 umol/L), prima della stimolazione con Resistina.

Le cellule pre-trattate con PDTC hanno dimostrato una significativa riduzione d'espressione di VCAM-1 e ICAM-1 dopo resistina (Fig.

7). Inoltre, le cellule pre-trattate con PDTC hanno ridotto in maniera significativa l'attività di TF (Figura 8).

## **DISCUSSIONE**

Negli ultimi anni è divenuto sempre più chiaro che l'infiammazione gioca un ruolo fisiopatologico importante non solo nello sviluppo dell'aterosclerosi, ma anche nel determinare le sue complicanze, così come nello sviluppo delle Sindromi Coronariche Acute (38, 39).

I meccanismi infiammatori coinvolti nella genesi e nello sviluppo dell'aterosclerosi possono essere innescati da molteplici fattori quali le LDL, le specie reattive dell'Ossigeno, le cellule del sangue attivate, le Interleuchine e l'IFN- $\gamma$  (40); inoltre, importanza sempre maggiore è stata rivolta a markers selezionati dell'infiammazione sistemica (41) quali il CRP, intesi come predittori dei maggiori eventi cardiovascolari (42, 43, 44).

Ultimamente, molto lavoro è stato fatto al fine di conoscere meglio il tessuto adiposo; prove evidenti indicano che l'adipe è una importante sorgente di citochine (45) e l'adiposità contribuisce al mantenimento dello stato pro-infiammatorio (46). In particolare, negli ultimi anni si è scoperto che la Resistina, una delle citochine più recentemente descritte fra quelle prodotte dal tessuto adiposo e dai monociti circolanti (47, 48), induce l'espressione di molecole di adesione e la produzione di alcune citochine nelle HUVECs (28) ed

inoltre può giocare un ruolo significativo nella patogenesi della restenosi, dal momento che induce la proliferazione delle cellule muscolari lisce di arteria coronarica umana in una modalità dose-dipendente, attraverso l'attivazione del pathway delle chinasi 1/2 (ERK) regolato da segnali extracellulari e della chinasi PI3K (29); Jung et al. hanno dimostrato, in seguito, che la Resistina induce la migrazione delle SMCs vascolari (30), il che suggerisce che questa proteina non rappresenti solo un marker infiammatorio, ma che sia anche un importante modulatore dell'infiammazione (49). Secondo una prospettiva clinica, infatti, i livelli di Resistina sono correlati a malattia coronarica precoce (50, 51).

Uno studio recente ha ulteriormente ampliato le attuali conoscenze, dimostrando un incremento dei livelli di Resistina in corso di SCA; dal momento che i livelli di Resistina sono sostanzialmente più alti nelle cellule infiammatorie umane, se confrontati agli adipociti umani (52), l'incremento della Resistina in condizioni di SCA può essere considerato espressione dell'attività infiammatoria che si realizza durante questi fenomeni. Esistono prove, infine, che la Resistina si accumuli nelle placche aterosclerotiche carotidee e non nella parete delle arterie mammarie normali, il che suggerisce un ruolo nel legame tra l'infiammazione ed il processo aterosclerotico (51). Comunque, ancora molto poco si conosce della biologia della Resistina e dell'infiammazione vascolare. In supporto ad un possibile ruolo infiammatorio nell'uomo, in condizioni sperimentali in vitro, Verma et al. hanno mostrato un effetto diretto della

Resistina ricombinante umana nel promuovere l'attivazione delle cellule endoteliali venose, tramite l'analisi dell'espressione delle molecole di adesione e la produzione di alcune citochine, suggerendo possibili effetti vascolari diretti di questa adipocitochina (28). Nel presente studio, utilizzando cellule endoteliali di arteria coronarica umana (un modello in vitro più fisiologico per investigare l'infiammazione vascolare), abbiamo confermato l'effetto della Resistina su tali cellule. In particolare, abbiamo dimostrato che l'incubazione con Resistina induce la trascrizione dell'mRNA del TF e la sintesi de novo di TF funzionalmente attivo; questi fenomeni sembrano essere regolati dall'attivazione del pathway di NF-kB in quanto modulati dal pre-trattamento con uno specifico inibitore di NF-kB. Un effetto statisticamente significativo della Resistina è stato osservato già alla concentrazione di 25 ng/mL, corrispondente ai livelli plasmatici di Resistina riscontrati in pazienti obesi e diabetici (36, 37). Il livello sierico medio di Resistina, inoltre, sembra sia più basso dei livelli presenti localmente nella parete vasale, o nelle aree delle lesioni aterosclerotiche.

Abbiamo dimostrato che la Resistina induce l'espressione di TF nelle cellule endoteliali di arterie coronariche umane; in particolare, la Resistina esplica i suoi effetti sull'espressione del TF in modo dose-dipendente. Questo fenomeno sembra essere maggiormente correlato con la sintesi di nuove molecole di TF, data la pre-incubazione con cicloesimide e DRB, inibitori rispettivamente della

sintesi proteica e della trascrizione dell'mRNA, in grado di bloccare completamente gli effetti della Resistina sull'espressione del TF. Di particolare interesse fisiopatologico è stata la scoperta che queste molecole di TF di nuova sintesi risultano funzionalmente attive, come dimostrato dal parallelo incremento nell'attività pro-coagulante del TF, evidenziabile sulla superficie delle cellule stimulate.

Il Tissue Factor (TF) gioca un ruolo chiave nella fisiopatologia delle Sindromi Coronariche Acute, innescando la formazione di trombi intra-coronari in seguito a danno endoteliale. In questo contesto, le cellule endoteliali, normalmente esposte al flusso sanguigno, esprimono il TF sulle loro membrane solo quando attivate in seguito all'esposizione a determinati stimoli (53-55).

Il nostro studio mostra che il pathway di trascrizione dell'NF-kB media l'effetto stimolatorio della Resistina sul rilascio delle citochine. La Resistina induce, direttamente ed indirettamente, la traslocazione dell'NF-kB dal citoplasma al nucleo, come dimostrato dall'EMSA. In più, un'importante riduzione degli effetti periferici della Resistina è evidenziabile in cellule endoteliali sottoposte a trattamento con pyrrolidine dithio carbamate ammonium (PDTC), un inibitore dell'attività dell'NF-kB. Questi dati avvalorano l'ipotesi delle proprietà regolatrici di tipo pro-infiammatorio attribuite alla Resistina.

In conclusione, questo studio, sebbene in vitro, descrive la forte correlazione esistente tra l'infiammazione, (come dimostrato dagli

alti livelli di Resistina) e l'atero-trombosi, avvalorando ulteriormente l'ipotesi che la Resistina potrebbe essere non solo un marker di rischio, ma un importante fattore nell'aterogenesi e nella trombosi. Sono necessari, tuttavia, ulteriori studi per chiarire se questi meccanismi possano essere di concreta rilevanza anche nella pratica clinica.

### **Prospettive Cliniche**

La natura infiammatoria dell'aterosclerosi offre nuove opportunità nella prevenzione e nel trattamento della CAD. Tra le classiche adipocitochine, la Resistina potrebbe rappresentare un importante contatto tra obesità e insulino-resistenza, attraverso un pathway pro-infiammatorio.

Ulteriori indagini sono necessarie, ovviamente, per capire il meccanismo attraverso cui gli adipociti comunicano con il sistema vascolare, al fine di ottenere una più chiara comprensione della relazione esistente tra obesità e disturbi cardiovascolari. Studi sulla regolazione di tali meccanismi ci aiuteranno, inoltre, a sviluppare strategie terapeutiche volte a prevenire il diabete e le malattie cardiovascolari nell'obesità, sindrome in drammatica crescita oramai da decenni.



## **LEGENDA DELLE FIGURE**

### **Figura 1.**

Determinazione mediante analisi FACS degli effetti della resistina sull'espressione delle molecole di adesione VCAM-1 (pannello A) e ICAM-1 (pannello B) in HCAECs.

La resistina è stata utilizzata alla concentrazione di 25, 50 o 100 ng/mL, come indicato; LPS (50 µg/mL) è stato utilizzato come controllo positivo. Gli istogrammi rappresentano la media  $\pm$  deviazione standard di 3 esperimenti indipendenti. \* =  $p < 0.05$  e \*\* =  $p < 0.01$  rispetto ai corrispettivi valori basali.

### **Figura 2.**

Effetti della Resistina (50 ng/mL) sulla trascrizione del TF in cellule endoteliali di arteria coronarica umana, ricercati mediante analisi PCR quantitativa. I livelli di mRNA del TF sono risultati indosabili al tempo 0 (Base). L'incubazione con Resistina ha provocato una crescita progressiva, dose-dipendente, dei livelli di m-RNA del TF, così come appare dal confronto con le cellule non stimulate. Il picco di livelli di m-RNA di TF è stato osservato dopo 60 minuti di incubazione con Resistina, mentre a 120 minuti i livelli di m-RNA di TF sono iniziati a diminuire. Il lipopolisaccaride (LPS) è stato usato come controllo positivo. Ciascun istogramma

rappresenta la media  $\pm$  la deviazione standard di tre differenti esperimenti.

### **Figura 3, 4 e 5.**

Effetti dose-risposta della Resistina (25, 50, e 100 ng/mL) sull'espressione di TF (pannello A) e sulla sua attività (pannello B) in cellule endoteliali di arteria coronarica umana, determinati mediante analisi FACS e mediante un dosaggio colorimetrico in due tappe basato sulla capacità del complesso TF/FVIIa di promuovere la produzione del Fattore della Coagulazione Xa, rispettivamente. La Resistina ha indotto un aumento dose-risposta sia dell'espressione di TF (A) che della attività (B), con una risposta massima a 100 ng/mL. Il lipopolisaccaride (LPS) è stato usato come controllo positivo. \* =  $p < 0.05$  e \*\* =  $p < 0.01$  vs valore corrispondente al tempo 0. Gli esperimenti di controllo, effettuati mediante pre-incubazione delle cellule endoteliali con cicloesimide (CE) o con DRB (Pannello C), hanno dimostrato che l'attività di TF indotta dalla Resistina richiede una trascrizione e sintesi proteica de novo del TF. Ciascun istogramma rappresenta la media  $\pm$  la deviazione standard di sei differenti esperimenti.

\* =  $p < 0.01$  vs valore corrispondente al tempo 0; \*\* =  $p < 0.01$  vs Resistina alla dose di 100 ng/ml.

### **Figura 6.**

Effetti della Resistina sulla traslocazione nucleare di NF- $\kappa$ B in cellule endoteliali di arteria coronarica umana, identificata da uno shift distinto della mobilità elettroforetica. Gli estratti nucleari sono stati ottenuti da cellule non trattate, trattate con concentrazioni crescenti di Resistina (25 e 100 ng/ml) o con LPS usato come controllo positivo. La Resistina è stata in grado di indurre uno shift distinto della banda elettroforetica nelle cellule stimulate, mentre nessuno shift è stato osservato nelle cellule non stimulate, di controllo. I dati sono rappresentativi di tre distinti esperimenti.

\* =  $p < 0.01$  vs valore corrispondente al tempo 0.

### **Figura 7.**

Coinvolgimento del fattore di trascrizione NF $\kappa$ B nell'espressione delle molecole di adesione VCAM-1 (pannello A) e ICAM-1 (pannello B) mediata dalla resistina in HCAECs.

La resistina è stata utilizzata alla concentrazione di 100 ng/mL; LPS (50  $\mu$ g/mL) è stato utilizzato come controllo positivo. Dove indicato, PDTC (pirrolidina ditiocarbamato ammonio, 100  $\mu$ mol/L), un inibitore dell'attivazione dell'NF $\kappa$ B, è stato aggiunto al mezzo di coltura delle cellule 60 min prima della resistina. Gli istogrammi rappresentano la media  $\pm$  deviazione standard di 3 esperimenti indipendenti. \* =  $p < 0.01$  rispetto ai corrispettivi valori basali; \*\* =  $p < 0.01$  rispetto alla resistina.

**Figura 8.**

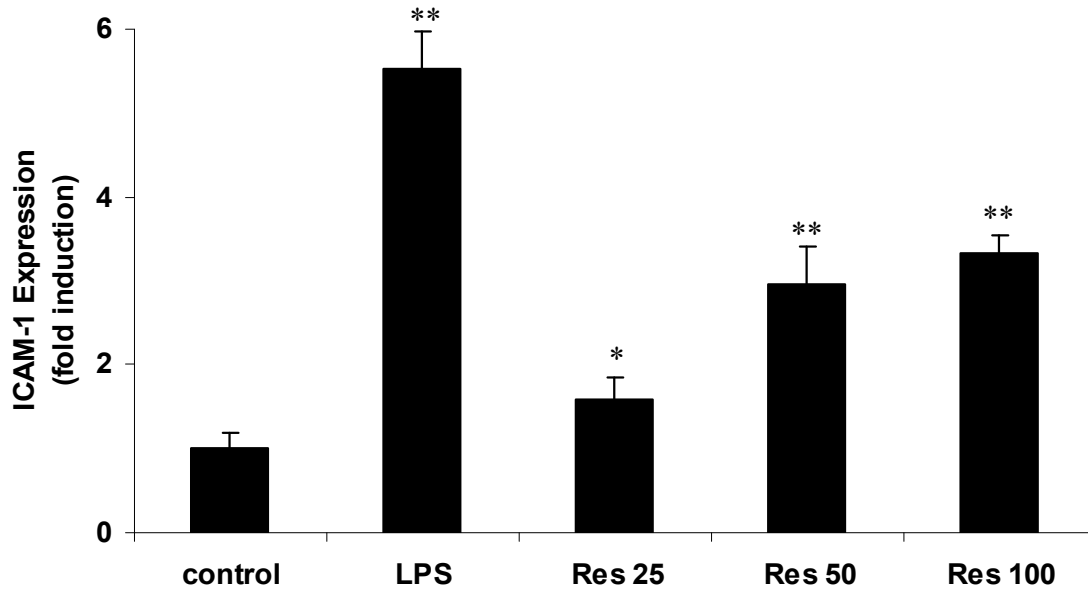
Ruolo di NF-kB nell'attività di TF indotta da Resistina in cellule endoteliali di arteria coronarica umana. Il pre-trattamento delle cellule endoteliali con pyrrolidone dithio carbamate ammonium (PDTC), inibitore della attivazione di NF-kB, ha determinato una riduzione dell'attività del TF. Ciascun istogramma rappresenta la media  $\pm$  la deviazione standard di tre differenti esperimenti.

\* =  $p < 0.01$  vs valore corrispondente al tempo 0. \*\*= $p < 0.01$  vs

Resistina alla dose di 100 ng/ml.

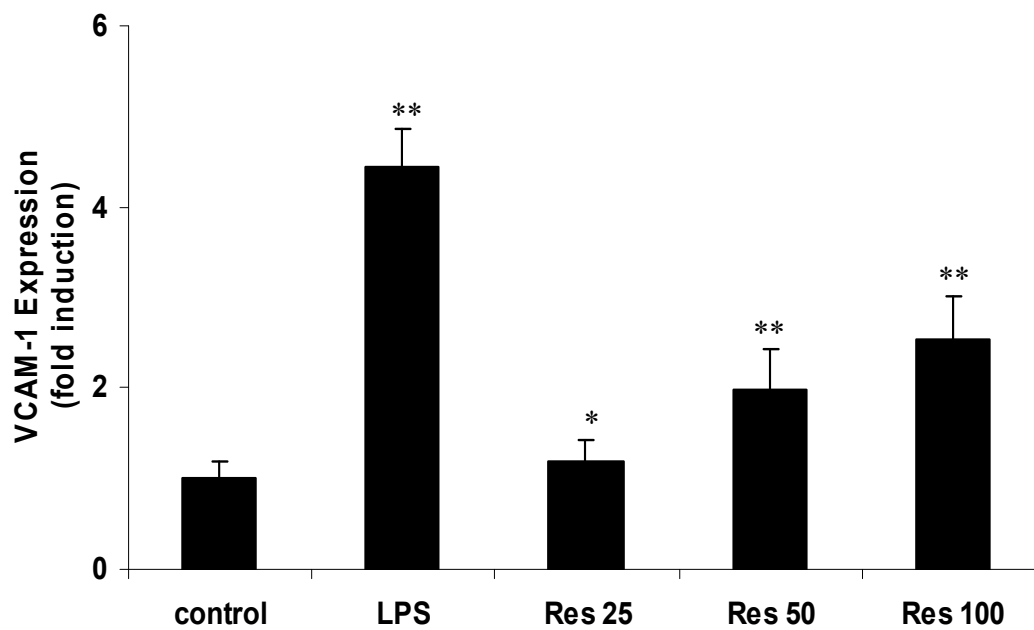
**Fig.1 A**

**FACS: espressione di VCAM-1**



**Fig.1 B**

**FACS: espressione di ICAM-1**



## Espressione del Fattore Tissutale: RT-PCR

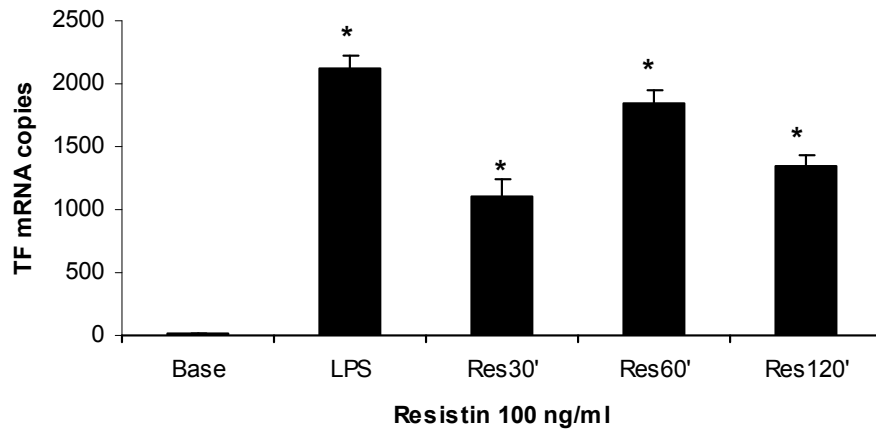


Fig.2

## FACS: espressione del Fattore Tissutale

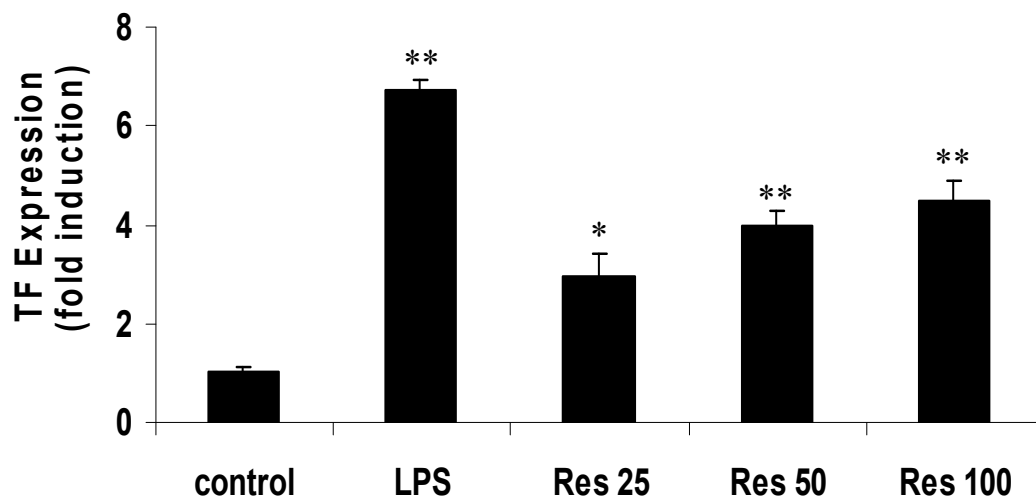


Fig.3

## Saggio colorimetrico: attività del Fattore Tissutale

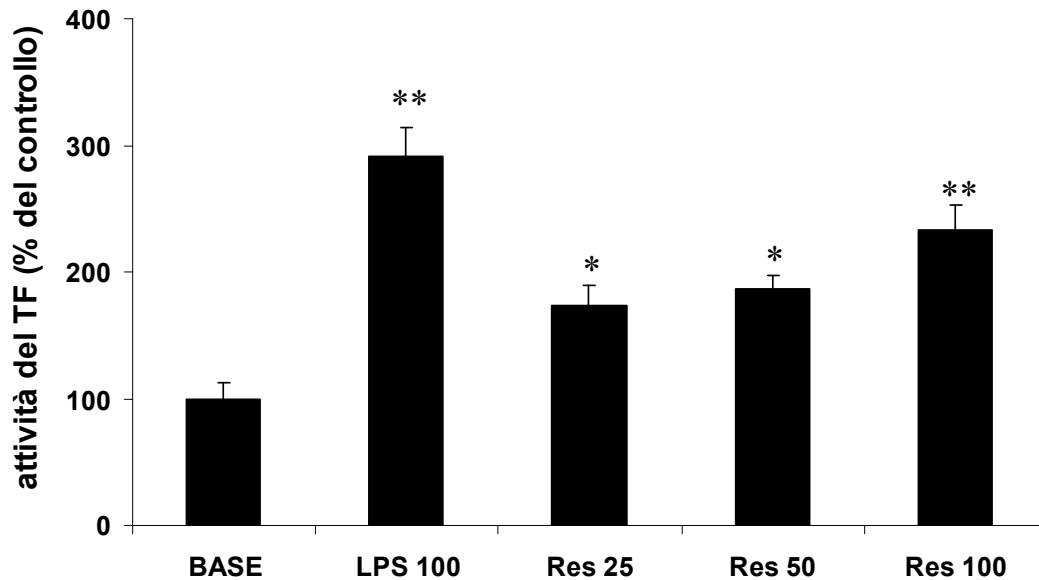


Fig. 4

## Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

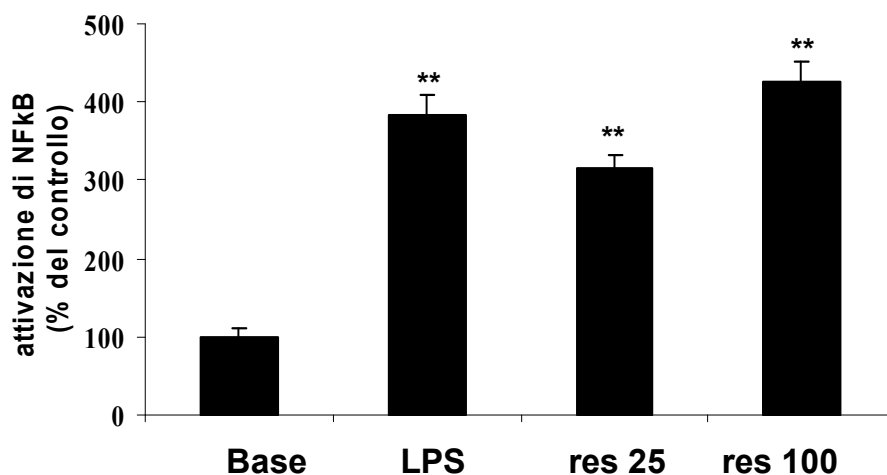


Fig.6

## FACS: espressione di VCAM-1 con PDTC

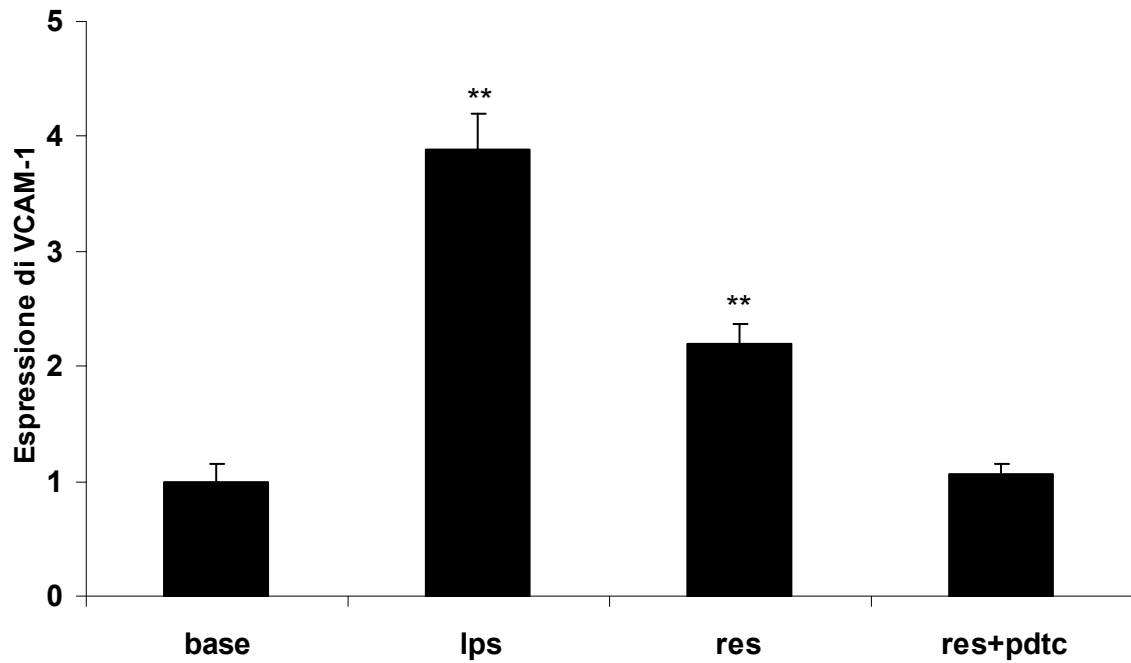


Fig.7A

## FACS: espressione di ICAM-1 con PDTC

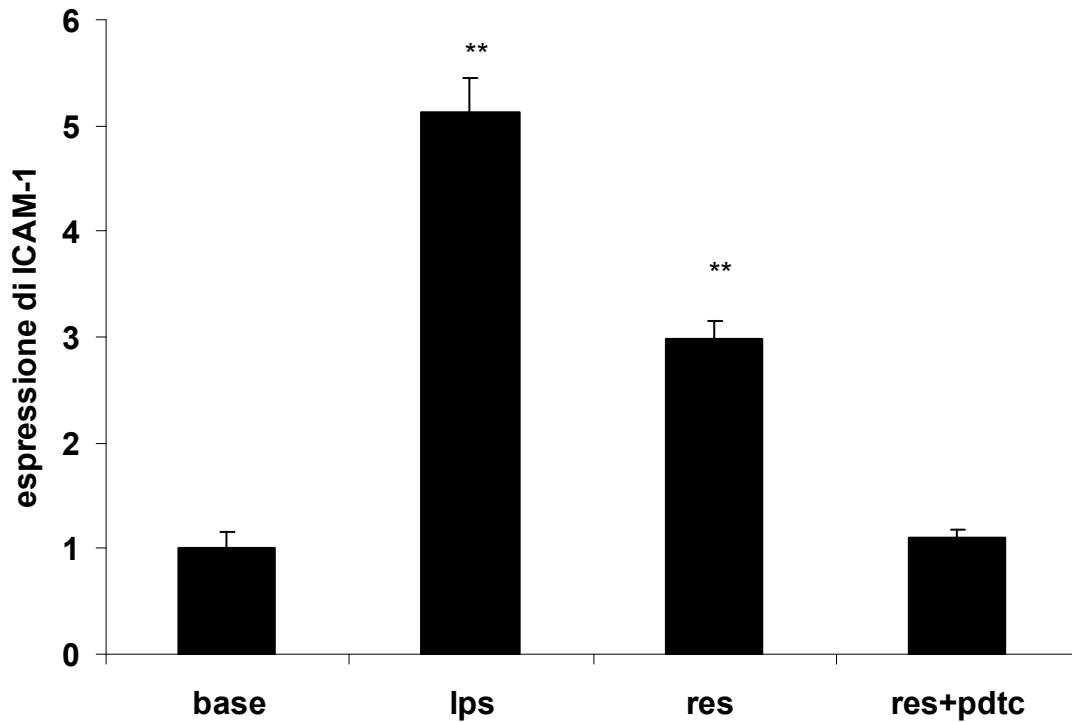
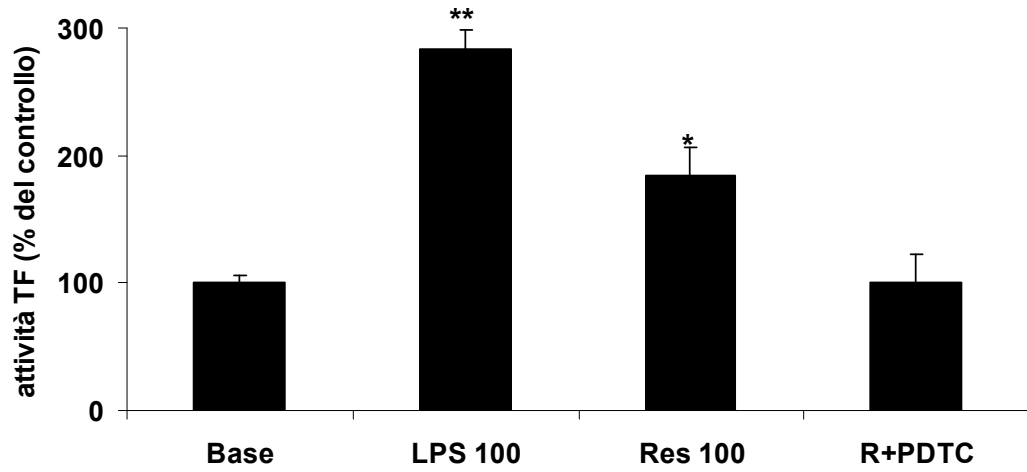


Fig.7B



## Saggio colorimetrico: espressione di TF con PDTC



**Fig.8**

## **BIBLIOGRAFIA**

1. Libby P. Current concepts of the pathogenesis of the acute coronary syndromes. *Circulation* 2001;104:365-72.
2. P. Cugini, G. Fiorelli, G. Guarini, M. Lopez, F. Violi e M. Volpe. Teodori 2004: Trattato Italiano di Medicina Interna; 300-303.
3. Braunwald E, Mark DB, Jones RH, et al. Unstable angina: diagnosis and management. Clinical Practice Guideline 10. Rockville, MD: Department of Health and Human Services, 1994.
4. Paolo Calabrò and Edward T.H. Yeh Inflammatory Vascular Markers in Atherosclerosis Current Topics in Atherosclerosis Research 2005 pp 49-65.
5. Peter Libby. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 2002;420.
6. Peter Libby, Paul M. Ridker and Attilio Maseri. Inflammation and Atherosclerosis. *Circulation* 2002;105;1135-1143.
7. Peter Libby. Pathophysiology of Coronary Artery Disease. *Circulation* 2005;111:3481-3488.
8. Peter Libby. Inflammation and cardiovascular disease mechanisms. *Am J Clin Nutr* 2006;83(suppl):456S– 60S.
9. Roberto Corti, Randolph Hutter, Juan Jose Badimon and Valentin Fuster. Evolving Concepts in the Triad of Atherosclerosis, Inflammation and Thrombosis. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis* 2004;17(1):35-44.

10. Viles-Gonzalez JF, Fuster V, Badimon JJ. Links between inflammation and thrombogenicity in atherosclerosis *Curr Mol Med*. 2006 Aug;6(5):489-99.
11. Virmani R, Burke A, Farb A, Kolodgie FD. Pathology of the unstable plaque. *Prog Cardiovasc Dis* 2002; 44:349-356.
12. Jan Steffel, Thomas F. Luscher and Felix C. Tanner Tissue Factor in Cardiovascular Diseases Molecular Mechanisms and Clinical Implications. *Circulation* 2006;113;722-731.
13. Thomas J Girard and Nancy S Nicholson. The role of tissue factor/factor VIIa in the pathophysiology of acute thrombotic formation. *Current Opinion in Pharmacology* 2001;1:159-163.
14. Mummford AD, McVey JH. Tissue factor in the myocardium: evidence of roles in haemostasis and inflammation. *Dis Markers* 2004; 20(6):353-8
15. Steppich BA, Ott I. Tissue Factor in acute coronary syndromes. *Hamostaseologie* 2006; 26(2):147-53.
16. John H. McVey. Tissue Factor pathway. *Bailliere's Clinical Haematology* 1999; 3(12):361-372.
17. Jude B, Zawadzki C, Susen S, Corseaux D. Relevance of tissue factor in cardiovascular disease. *Archives des maladies du coeur et des vaisseaux* 2005;98(6):667-71.
18. Suefuji H, Ogawa H, Yasue H, Kaikita K, Soejima H, Motoyama T, Mizuno Y, Oshima S, Saito T, Tsuji I, Kumeda K, Kamikubo Y, Nakamura S. Increased plasma tissue factor levels in acute myocardial infarction. *Am Heart J* 1997;134:253-259.

19. Soejima H, Ogawa H, Yasue H, Kaikita K, Nishiyama K, Misumi K, Takazoe K, Miyao Y, Yoshimura M, Kugiyama K, Nakamura S, Tsuji I, Kumeda K. Heightened tissue factor associated with tissue factor pathway inhibitor and prognosis in patients with unstable angina. *Circulation* 1999;99:2908-2913.
20. Seljeflot I, Hurlen M, Arnesen H. Increased levels of soluble tissue factor during long-term treatment with warfarin in patients after an acute myocardial infarction. *J Thromb Haemost* 2004;2:726-730.
21. Arno H.M. Moons, Marcel Levi, Ron J.G. Peters. Tissue factor and coronary artery disease. *Cardiovascular Research* 2002;53:313–325.
22. Plinio Cirillo, Gaetano Cali, Paolo Golino, Paolo Calabrò, Lavinia Forte, Salvatore De Rosa, Mario Pacileo, Massimo Ragni, Francesco Scopacasa, Lucio Nitsch, and Massimo Chiariello. Tissue Factor Binding of Activated Factor VII Triggers Smooth Muscle Cell Proliferation via Extracellular Signal–Regulated Kinase Activation. *Circulation* 2004;109: 2911-2916.
23. Sharlene M. Day, Jennifer L. Reeve, Brian Pedersen, Diana M Farris, Daniel D. Myers, Michael Im, Thomas W. Wakefield, Nigel Mackman, and William P. Fay. Macrovascular thrombosis is driven by tissue factor derived primarily from the blood vessel wall. *Blood* 2005;105:192-198.

24. T.J.Guzik, D.Mangalat, R.Korbut. Adipocytokines-Novel Link Between Inflammation And Vascular Function? *Journal Of Physiology and Pharmacology* 2006; 57(4):505-528.
25. Calabro P, Chang DW, Willerson JT, Yeh ET. Release of C-reactive protein in response to inflammatory cytokines by human adipocytes: linking obesity to vascular inflammation. *J Am Coll Cardiol.* 2005;46(6):1112-3.
26. Calabro P, Yeh ET. Obesity, inflammation, and vascular disease: the role of the adipose tissue as an endocrine organ. *Subcell Biochem.* 2007;42:63-91.
27. Stepan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, Patel HR, Ahima RS, Lazar MA. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 2001; 409:307-312.
28. Verma S, Li SH, Wang CH, Fedak PW, Li RK, Weisel RD, Mickle DA. Resistin promotes endothelial cell activation: further evidence of adipokine-endothelial interaction. *Circulation* 2003; 108:736-740.
29. Calabro P, Samudio I, Willerson JT, Yeh ET. Resistin promotes smooth muscle cell proliferation through activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and phosphatidylinositol 3-kinase pathways. *Circulation* 2004; 110:3335-3340.
30. Hye Seung Jung, Ki-Ho Park, Young Min Cho et al. Resistin is secreted from macrophages in atheromas and promotes atherosclerosis. *Cardiovascular Research* 2006;69:76-85.

31. Burnett MS, Lee CW, Kinnaird TD, Stabile E, Durrani S, Dullum MK, Devaney JM, Fishman C, Stamou S, Canos D, Zbinden S, Clavijo LC, Jang GJ, Andrews JA, Zhu J, Epstein SE. The potential role of resistin in atherogenesis. *Atherosclerosis*. 2005;182(2):241-8.
32. Cirillo P GP, Calabro P, Cali G, Ragni M, De Rosa S, Cimmino G, Pacileo M, De Palma R, Forte L, Gargiulo A, Corigliano GG, Angri V, Spagnuolo R, Nitsch L, Chiariello M. C-Reactive Protein induces Tissue Factor expression and promotes smooth muscle and endothelial cell proliferation. *Cardiovasc Res* 2005; 68:47-55.
33. Adams DH, Shaw S. Leucocyte-endothelial interactions and regulation of leucocyte migration. *Lancet* 1994; 343:831-836.
34. Yudkin JS, Stehouwer CD, Emeis JJ, Coppack SW. C-reactive protein in healthy subjects: associations with obesity, insulin resistance, and endothelial dysfunction: a potential role for cytokines originating from adipose tissue? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19:972-978.
35. Wilcox JN, Smith KM, Schwartz SM, Gordon D. Localization of tissue factor in the normal vessel wall and in the atherosclerotic plaque. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86:2839-2843.
36. Fehmann HC, Heyn J. Plasma resistin levels in patients with type 1 and type 2 diabetes mellitus and in healthy controls. *Horm Metab Res* 2002; 34:671-673.

37. Stejskal D, Proskova J, Adamovska S, Jurakova R, Bartek J. Preliminary experience with resistin assessment in common population. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2002; 146:47-49.
38. Libby P, Aikawa M. Stabilization of atherosclerotic plaques: new mechanisms and clinical targets. *Nat Med* 2002;8:1257-1262.
39. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis--an update. *N Engl J Med* 1986;314:488-500.
40. Mehta JL, Saldeen TG, Rand K. Interactive role of infection, inflammation and traditional risk factors in atherosclerosis and coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 1998; 31:1217-1225.
41. Calabro P, Yeh E. Inflammatory vascular markers in atherosclerosis. In: Geng YJ. *Current Topics in Atherosclerosis Research*. 2005:49-65.
42. Liuzzo G, Biasucci LM, Gallimore JR, Grillo RL, Rebuffi AG, Pepys MB, Maseri A. The prognostic value of C-reactive protein and serum amyloid a protein in severe unstable angina. *N Engl J Med* 1994;331:417-424.
43. Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE, Rifai N. C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *N Engl J Med* 2000;342:836-843.
44. Ridker PM, Koenig W, Fuster V. C-reactive protein and coronary heart disease. *N Engl J Med* 2004;351:295-298; author reply 295-298.

45. Ahima RS, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends Endocrinol Metab* 2000;11:327-332.
46. Yudkin JS, Stehouwer CD, Emeis JJ, Coppack SW. C-reactive protein in healthy subjects: associations with obesity, insulin resistance, and endothelial dysfunction: a potential role for cytokines originating from adipose tissue? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:972-978.
47. Patel L, Buckels AC, Kinghorn IJ, Murdock PR, Holbrook JD, Plumpton C, Macphee CH, Smith SA. Resistin is expressed in human macrophages and directly regulated by PPAR gamma activators. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;300:472-476.
48. Savage DB, Sewter CP, Klenk ES, Segal DG, Vidal-Puig A, Considine RV, O'Rahilly S. Resistin / Fizz3 expression in relation to obesity and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma action in humans. *Diabetes* 2001; 50:2199-2202.
49. Reilly MP, Lehrke M, Wolfe ML, Rohatgi A, Lazar MA, Rader DJ. Resistin Is an Inflammatory Marker of Atherosclerosis in Humans. *Circulation* 2005.
50. Pischon T, Bamberger CM, Kratzsch J, Zyriax BC, Algenstaedt P, Boeing H, Windler E. Association of plasma resistin levels with coronary heart disease in women. *Obes Res* 2005;13:1764-1771.
51. Burnett MS, Lee CW, Kinnaird TD, Stabile E, Durrani S, Dullum MK, Devaney JM, Fishman C, Stamou S, Canos D, Zbinden S, Clavijo LC, Jang GJ, Andrews JA, Zhu J, Epstein SE.



The potential role of resistin in atherogenesis. *Atherosclerosis* 2005;182:241-248.

52. Yang RZ, Huang Q, Xu A, McLenithan JC, Eisen JA, Shuldiner AR, Alkan S, Gong DW. Comparative studies of resistin expression and phylogenomics in human and mouse. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;310:927-935.

53. Annex BH, Denning SM, Channon KM, Sketch MH, Jr., Stack RS, Morrissey JH, Peters KG. Differential expression of tissue factor protein in directional atherectomy specimens from patients with stable and unstable coronary syndromes. *Circulation* 1995;91:619-622.

54. Pawashe AB, Golino P, Ambrosio G, Migliaccio F, Ragni M, Pascucci I, Chiariello M, Bach R, Garen A, Konigsberg WK, et al. A monoclonal antibody against rabbit tissue factor inhibits thrombus formation in stenotic injured rabbit carotid arteries. *Circ Res* 1994;74:56-63.

55. Ragni M, Cirillo P, Pascucci I, Scognamiglio A, D'Andrea D, Eramo N, Ezekowitz MD, Pawashe AB, Chiariello M, Golino P. Monoclonal antibody against tissue factor shortens tissue plasminogen activator lysis time and prevents reocclusion in a rabbit model of carotid artery thrombosis. *Circulation* 1996;93:1913-1918.