

Attivazione di MAP-chinasi in linfociti T di pazienti con Sindrome Coronarica Acuta

Le sindromi coronariche acute (SCA) costituiscono una delle principali cause di morbidità e mortalità nei paesi occidentali (26). L'identificazione precoce di ischemia miocardica e la diagnosi accurata di SCA rappresentano un obiettivo centrale al fine di orientare la scelta degli interventi terapeutici e consentire una valutazione prognostica (1, 36). La combinazione di una anamnesi accurata, un esame obiettivo e la misurazione dei livelli circolanti di troponine cardiache (cTn) e dell'isoforma MB delle creatin-chinasi (CK), assieme alla valutazione dei risultati di ECG ed ecocardiografia aiuta il medico nell'individuazione dei pazienti con SCA (37, 39). Tuttavia, la disponibilità di un esame diagnostico in grado di individuare precocemente i pazienti con un elevato rischio di complicanze nonostante sintomi atipici o segni clinici di dubbia interpretazione permetterebbe di sviluppare strategie mirate al contenimento del rischio di eventi cardiovascolari. L'attivazione dei processi infiammatori, tipica della fisiopatologia dell'aterosclerosi, può innescare una cascata di eventi che induce l'infiltrazione di cellule immunitarie, l'attivazione e l'aggregazione piastrinica, fino a provocare la rottura della placca ateromasica e l'occlusione arteriosa intermittente, che rappresentano il substrato fisiopatologico della SCA (30). In linea con tale teoria, numerosi biomarcatori sono stati valutati in tale contesto clinico. In particolare, il dosaggio dei livelli di proteina creattiva (PCR) in pazienti con SCA ha dimostrato un valore prognostico. Anche il numero di linfociti T attivati è incrementato nel sangue periferico di soggetti affetti da patologie cardiovascolari (9). Tali evidenze suggeriscono che l'attivazione infiammatoria caratteristica delle SCA potrebbe essere individuata sistemicamente attraverso marcatori rilevabili nel sangue circolante (2, 3, 8, 27). Tuttavia, nonostante i biomarcatori di infiammazione possano fornire informazioni strategiche al clinico oltre a quelle provenienti dai marcatori di necrosi miocardica, il significato prognostico di questi è ancora dibattuto in relazione alla loro capacità di migliorare la cura dei pazienti (4, 25, 29, 34, 35). L'infiammazione e altre forme di stress cellulare sono in grado di elicitare risposte biochimiche (10, 46) e successivamente di attivare cascate di trasduzione del segnale, come ad esempio la via delle protein-chinasi attivate da mitogeno (MAPK), che agisce fosforilando vari substrati intracellulari inclusi alcuni fattori di trascrizione, regolando in tal modo i processi cellulari in risposta a stimoli extracellulari specifici (19, 21). La famiglia delle MAPK include tre sottogruppi principali, le chinasi regolate da segnali extracellulari (ERK1/2), Jun N-terminal Kinase (JNK) e la chinasi p38 (43). In particolare, nel sistema cardiovascolare ERK 1/2 è coinvolta in diverse cascate di fosforilazione in serina/treonina che controllano la proliferazione cellulare, la differenziazione, la sopravvivenza e la motilità in risposta a vari stimoli extracellulari quali mitogeni, fattori di crescita e citochine (13), in maniera analoga l'attivazione di JNK è stata

dimostrata dopo shock cellulare iperosmotico, o in conseguenza a basse concentrazioni di inibitori della sintesi proteica quali l'anisomicina, l'agente cardiotossico daunomicina, ed in risposta ad ipossia o stress ossidativo, o ancora in risposta a stiramento meccanico o stimolazione elettrica (31). Anche l'attivazione di p38 è stata associata a diverse condizioni cardiovascolari, come nel preconditionamento ischemico sperimentale in modelli di ratto (23), nel coniglio (18) e nel maiale (40, 41). Più recentemente, è stato osservato che l'inibizione di p38 è in grado di aumentare il numero di cellule vasogeniche circolanti e di migliorare la capacità funzionale di cellule proangiogeniche, rallentando così la progressione della malattia aterosclerotica (42).

Ad oggi, non è noto se le proteine MAPK siano attivate in cellule infiammatorie circolanti in risposta all'ischemia miocardica acuta in pazienti con SCA. Inoltre, non è mai stato valutato se un'attivazione differenziale delle vie di trasduzione del segnale possa essere modulata dal contesto fisiopatologico delle SCA. Se l'attivazione delle MAPK fosse proporzionale all'estensione dell'ischemia miocardica partendo da una parziale attivazione delle MAPK nell'angina instabile fino all'attivazione completa nei pazienti con NSTEMI e STEMI, la sua misurazione potrebbe rappresentare un prezioso test diagnostico ai fini della stratificazione del rischio nei pazienti con SCA.

Pertanto scopo di questo studio è stato valutare l'attivazione delle MAPK in linfociti T di pazienti con SCA.

METODI

Popolazione

Sono stati arruolati nello studio ottantuno pazienti consecutivi ricoverati presso il Dipartimento di Cardiologia dell'Università Magna Grecia per eseguire un'angiografia coronarica. Tutti i pazienti hanno rilasciato il consenso informato a partecipare allo studio, che è stato condotto in accordo con i principi della Dichiarazione di Helsinki ed è stato approvato dal Comitato Etico locale. I pazienti sono stati assegnati a differenti gruppi a seconda delle caratteristiche cliniche, angiografiche e dei risultati di laboratorio. Il gruppo I include 21 pazienti con angina pectoris stabile (CAD), evidenza clinica di classe II e III della Canadian Cardiovascular Society, ed almeno 1 stenosi coronarica evidenziata con esame angiografico (riduzione del 75% del diametro del lume). Il gruppo II includeva 22 pazienti con angina instabile (UA). Tutti i pazienti con UA avevano presentato dolore toracico a riposo nelle 12 ore precedenti senza evidenza di infarto del miocardio (MI) come dimostrato dalla negatività dei marcatori di necrosi (CK-MB o Troponina I). In tutti i pazienti del gruppo II la coronarografia ha dimostrato una lesione responsabile. Il gruppo III include 19 pazienti

con infarto miocardico senza sopraslivellamento del tratto ST (NSTEMI) che si sono presentati entro 12 ore dall'inizio del dolore, con un rialzo dei livelli sierici di cTnI ed evidenza angiografica di lesioni coronariche. Infine i pazienti con sopraslivellamento del tratto ST (STEMI, N=19), documentato da un aumento dei valori di CKMB e cTnI, ricoverati entro 12 ore dall'inizio del dolore toracico sono stati inclusi nel gruppo IV. I pazienti sono stati sottoposti a coronarografia e rivascolarizzazione coronarica, se necessario, durante il ricovero. Per allestire un gruppo di controllo sono stati inoltre reclutati dalla banca dei donatori di sangue dei volontari sani (CTRL, N=20) senza segni clinici di CAD e senza fattori di rischio cardiovascolari.

I seguenti criteri di esclusione sono stati identificati prima dell'inizio dello studio: MI nei 6 mesi precedenti, precedenti procedure di rivascolarizzazione, condizioni infiammatorie associate con una risposta di fase acuta, malattie autoimmuni, patologie neoplastiche, insufficienza epatica avanzata, insufficienza renale o grave insufficienza cardiaca (classi NYHA III-IV).

Nei gruppi I-IV, prelievi di sangue per l'analisi delle MAP-chinasi sono stati ottenuti al ricovero. La misurazione di CKMB e di cTnI è stata effettuata secondo le attuali linee guida, secondo le procedure di routine del nostro Istituto.

Isolamento di cellule mononucleate del sangue periferico e analisi di citometria a flusso.

I prelievi di sangue periferico sono stati effettuati su tutti i pazienti con una provetta Vacutest KIMA con K₃EDTA. L'isolamento delle cellule mononucleate è stato effettuato con centrifugazione in gradiente di densità su Ficoll (Biochrom AG). Le cellule mononucleate sono state risospese in un tampone di incubazione freddo (PBS 1x, BSA 0.5%) (Becton-Dickinson) e sono state incubate con 10 µl di anticorpi CD3-PE o CD19-PE (diretti contro antigeni di superficie esposti, rispettivamente da linfociti T e B) a 4°C per 30 minuti al buio. Poi, dopo lavaggio degli anticorpi nel tampone di incubazione, le cellule sono state fissate con paraformaldeide 2% (Sigma-Aldrich) per 10 minuti a 30°C, e permeabilizzate con metanolo 90% freddo (Sigma-Aldrich) per 30 minuti a 4°C. Le cellule sono state quindi risospese con un tampone di incubazione e successivamente incubate con anticorpi fosfo-ERK1/2, fosfo-p38 e fosfo-JNK per 1 ora a temperatura ambiente. Dopo tale incubazione, le cellule venivano risciacquate ed incubate con anticorpi monoclonali anti-coniglio coniugati con FITC (Jackson Immuno research laboratories). Sono stati analizzati un totale di 30000 eventi in una specifica uscita, con citometro a flusso FACS Calibur con il software di acquisizione di analisi Cell Quest (Becton-Dickinson).

Analisi di immunoblotting.

Per confermare i dati ottenuti mediante citometria a flusso, è stata condotta un'analisi di immunoblotting in altri 28 pazienti. In breve, le proteine sono state estratte dai linfociti T dei soggetti CTRL (N=5) e dei pazienti con malattia coronarica acuta e cronica (CAD, N=5; UA, N=6; NSTEMI, N=6; STEMI, N=6) ottenuti come descritto. Quaranta microgrammi di proteine totali sono state separate da SDS-PAGE, trasferite su un filtro di nitrocellulosa attraverso un sistema semi-asciutto trans-blot (Biorad) e ibridizzate con anticorpi primari differenti per MAPK attivate: phospho-ERK1/2, phospho-JNK, phospho-p38, e normalizzate da anticorpi che riconoscono il totale ERK1/2, JNK e p38 (Cell signaling). I filtri di nitrocellulosa sono stati bloccati con albumina serica bovina 5% e sono stati usati degli anticorpi primari diluiti 1:1000 secondo le istruzioni del produttore (Cell Signaling Technology). Sono stati usati anticorpi secondari HRP-coniugati (Santa Cruz Biotechnology). Le bande di proteine specifiche sono state misurate mediante chemoluminescenza usando il sistema Chemidoc XRS (BioRad). I Western blots per l'espressione totale di ERK1/2, JNK a p38 (anticorpi di Cell Signaling Technology) sono stati effettuati per normalizzare i livelli fosforilati per ogni proteina kinasi.

Analisi statistica

La significatività tra tutti i gruppi è stata determinata in confronti multipli con l'analisi della varianza (ANOVA). Il metodo Bonferroni post-hoc è stato usato per individuare le differenze. Le capacità diagnostiche sui livelli di attivazione di fosfo-ERK1/2, fosfo-JNK e fosfo-p38 per UA, NSTEMI e STEMI ACS sono state valutate mediante ROC. Le aree sotto le curve ROC indicano l'accuratezza relativa dei test diagnostici. I valori inferiori a $p < 0.05$ sono stati considerati statisticamente significativi.

RISULTATI

Le caratteristiche di base di tutti i pazienti arruolati sono ben bilanciate tra i gruppi, come riportato nella tabella 1. Le MAP-chinasi sono attivate nei linfociti T ma non in linfociti B di pazienti con SCA.

I linfociti T sono attivati in maniera anomala durante la fase acuta della malattia aterosclerotica e possono essere considerati come nuovi biomarkers per una diagnosi precoce di SCA (16). In questo lavoro abbiamo verificato se l'attivazione delle MAPK fosse limitata ai linfociti T o coinvolgesse anche i linfociti B di pazienti con SCA (UA, n=5, NSTEMI, N=%, STEMI, N=%). Le cellule mononucleate isolate a fresco dai campioni di sangue sono state marcate con anticorpi specifici per le forme fosforilate di ERK1/2, JNK e p38 oppure con anticorpi anti-CD3 (che riconoscono linfociti

T) o anticorpi anti-CD18 (che riconoscono i linfociti B) e sono state analizzate con metodica FACS (fluorescent activated cell sorting). In tutti i pazienti con SCA ERK1/2, JNK e p38 sono presenti in forma fosforilata solo nei linfociti T mentre sono per la maggior parte non fosforilati nei linfociti B (Fig.1). Quindi, abbiamo ristretto l'analisi dell'attivazione delle MAPK ai soli linfociti T, isolati mediante MACS (immunomagnetic bead cell sorting) dalle cellule mononucleate.

ERK1/2 è attivato nei linfociti T di tutti i soggetti con SCA.

L'attivazione di ERK1/2 è stata determinata mediante analisi FACS ed il livello di fosforilazione di ERK1/2 (fosfo-ERK1/2) riportato come intensità di fluorescenza per lo specifico anticorpo.

I livelli di ERK1/2 fosforilata erano significativamente incrementati nei pazienti UA, NSTEMI, e STEMI (fosfo-ERK1/2 negli UA= 40 ± 18 , nei NSTEMI= 26 ± 15 e negli STEMI = 34 ± 23) rispetto ai soggetti di controllo (phospho-ERK1/2 nei CTRL = 6 ± 3 ; $p < 0.05$ vs. UA, NSTEMI e STEMI). Al contrario i livelli di ERK1/2 fosforilato non erano incrementati in pazienti con coronaropatia cronica (fosfo-ERK1/2 in CAD = 16 ± 8 ; $p = \text{NS}$ vs. UA, NSTEMI, STEMI e CTRL, figure 2, 3). Questi dati indicano dunque che la MAP-chinasi ERK 1/2 è attivata in linfociti T di pazienti con SCA in risposta all'ischemia miocardica indipendentemente dalla presenza di necrosi miocitaria.

JNK è attivata in linfociti T solo in pazienti con SCA con necrosi miocardica.

È stato osservato un incremento statisticamente significativo di fosfo-JNK solo in pazienti con infarto miocardico rispetto ai pazienti con angina instabile (phospho-JNK = 36 ± 19 in pazienti NSTEMI e 40 ± 28 in pazienti STEMI; $p < 0.05$ vs. UA, CAD e CTRL), laddove JNK non è significativamente attivata in UA (phospho-JNK = 12 ± 7) rispetto ai pazienti con CAD (10 ± 5 ; $p = \text{NS}$ vs. UA), o rispetto ai controlli (CTRL: 4 ± 2 , $p = \text{NS}$ vs. UA e CAD, figure 2,3).

Per tali motivi, in linfociti T di pazienti con SCA, diversamente da ERK1/2, l'attivazione di JNK potrebbe distinguere pazienti con infarto miocardico (nei quali JNK è fosforilato) dai pazienti con angina instabile in cui JNK è disattivata.

p38 è attivata in linfociti T sia nell' ischemia acuta che in quella cronica.

Infine, l'analisi FACS ha mostrato che i livelli di p38 fosforilato sono significativamente aumentati in linfociti T isolati da pazienti con ischemia miocardica sia cronica che acuta (figure 2, 3). Infatti, si è verificato un incremento statisticamente significativo della forma fosforilata di p 38 in pazienti con STEMI (34 ± 27), NSTEMI (21 ± 20), angina instabile (15 ± 13) e CAD (16 ± 13) rispetto ai soggetti sani di controllo ($p < 0.05$, figure 2, 3). L'attivazione di p38 inoltre è maggiore nei pazienti con STEMI rispetto agli altri gruppi.

L'analisi di immunoblotting conferma l'attivazione differenziale di MAP-chinasi in pazienti con SCA.

Successivamente sono stati convalidati i dati mediante l'analisi western blot delle MAP-chinasi attivate negli estratti proteici di linfociti T ottenuti da ulteriori pazienti di tutti i gruppi inclusi nello studio. In accordo con i dati FACS, l'analisi western blot ha mostrato che fosfo-ERK 1/2 era significativamente aumentata in tutti i pazienti con SCA rispetto ai pazienti con CAD e a quelli del gruppo di controllo (figura 4). Infine p38 era significativamente fosforilata in tutti i pazienti ischemici quando confrontati ai soggetti di controllo, e livelli più alti di fosfo-p38 sono stati riscontrati in linfociti T di pazienti con STEMI. Questi dati suggeriscono che lo stress miocardico acuto ed intenso prodotto dall'occlusione coronarica si associa all'attivazione di ERK 1/2 nei linfociti T. Un ulteriore segnale, rappresentato dall'attivazione di JNK, è attivato quando il tempo di ischemia dura abbastanza da indurre necrosi miocardica.

Inoltre, in accordo con i risultati sopra descritti, sia l'ischemia miocardica cronica che quella acuta attivano p38 nei linfociti T con una modalità dose-risposta.

Sensibilità e Specificità

Con un cut-off di 22.5 per fosfo-ERK 1/2 per i livelli di intensità di fluorescenza in linfociti T, il test diagnostico per l'identificazione di angina instabile rispetto alla cardiopatia ischemica cronica (CAD) raggiunge una sensibilità del 78% ed una specificità del 90% (tabella 2). Inoltre, adottando un cut-off di 13.5 lo stesso test diagnostico identificherebbe i pazienti con NSTEMI dai soggetti di controllo con una sensibilità del 56% ed una specificità del 84% (figura 5). Ancora più interessante, fosfo-JNK permette di diagnosticare uno NSTEMI con una sensibilità del 94% ed una specificità del 90% (cut-off 18.5), ed uno STEMI con una sensibilità del 95% ed una specificità del 100% (cut-off di 21).

L'attivazione di ERK 1/2 in linfociti T è un evento transiente in pazienti con angina instabile.

Dal momento che è stato dimostrato che ERK 1/2 è significativamente attivato in linfociti T di pazienti con angina instabile in risposta ad ischemia miocardica acuta, ci è sembrato interessante investigare se quest'attivazione molecolare fosse correlata alla fase acuta di stress cellulare o fosse legata alla patologia indipendentemente dal tempo di rilevazione. Per questo motivo, in pazienti trattati efficacemente mediante angioplastica percutanea per angina instabile (N = 22), abbiamo valutato l'attivazione di ERK 1/2 nei linfociti T ad un follow-up di 180 giorni dall'evento acuto. È stato interessante notare che l'attivazione di ERK 1/2 espressa dai livelli della sua forma fosforilata

era significativamente ridotta al follow-up a 6 mesi rispetto all'evento acuto (da 40 ± 18 a 16 ± 8 , $p<0.05$, figura 6a-b), tornando a valori simili a quelli dei pazienti con cardiopatia ischemica cronica. Inoltre, considerando un follow-up intermedio di 60 giorni, si può ipotizzare che la riduzione dei livelli di attivazione di ERK 1/2 sia un fenomeno progressivo che inizia dopo una rivascolarizzazione efficace e si protrae fino alla completa normalizzazione dopo 6 mesi. Di conseguenza, ERK 1/2 è specificamente attivata in linfociti T durante l'ischemia miocardica acuta nei pazienti con angina instabile e non è influenzata da una concomitante terapia antiplastrinica.

L'inibizione della HMG-CoA reduttasi riduce l'attivazione delle MAP-chinasi in linfociti T attivati in vitro

Numerosi studi hanno dimostrato che il ruolo degli inibitori del HMG-CoA reduttasi è fondamentale nella stabilizzazione della placca aterosclerotica. In precedenti studi, il nostro gruppo ha osservato come la somministrazione di statine sia in grado di ridurre la proliferazione di cellule muscolari lisce vascolari sia in vitro che in vivo(22). Al fine di investigare il ruolo effettivo del trattamento farmacologico sull'attivazione dei linfociti T a distanza dall'evento acuto, sono stati isolati linfociti T da pazienti sani e sono state studiate le vie di trasduzione del segnale delle MAP-chinasi mediante analisi di immunoblotting. In breve, per mimare lo stato infiammatorio, sono state trattate cellule T in coltura con 1000 UI/ml di interleuchina-2 (IL-2) a 37°, 5% CO₂ per 15 ore; successivamente, sono stati somministrati 10 µmol di rosuvastatina (Rosu) in singola dose e le cellule raccolte 15 minuti dopo la stimolazione. La somministrazione di IL-2 determinava un incremento marcato dei livelli di ERK1/2 (Fig. 6c), mentre il trattamento con Rosuvastatina determinava una riduzione tempo-dipendente dei livelli di ERK1/2 fosforilati (attivi) in linfociti T in coltura. Tali risultati suggeriscono come l'attivazione di ERK1/2 nei linfociti T rappresenti un meccanismo continuo, responsabile del peggioramento dello stato infiammatorio e come l'infiammazione - sia cronica che acuta - influenzi i linfociti T circolanti. Tali risultati rafforzano l'importanza di un inizio precoce della terapia medica ottimale, statine incluse, nei pazienti acuti.

Discussione

Il risultato principale del presente studio è rappresentato dall'osservazione che MAP-chinasi sono attivate in maniera differenziale nei linfociti T di pazienti con SCA, in relazione alla presentazione clinica. In particolare, un incremento significativo di fosfo-ERK 1/2 è stata osservata in tutti i pazienti con SCA, indipendentemente dalla presenza di necrosi miocitaria. In contrasto, i livelli di attivazione di fosfo-JNK erano significativamente elevati solo in pazienti con infarto miocardico acuto ma non in quelli con angina instabile. Infine, fosfo-p38 è risultata essere attivata in tutti i

pazienti con aterosclerosi, ivi inclusi i pazienti con SCA e cardiopatia ischemica cronica. E' interessante notare come questi risultati non siano correlati con l'estensione della coronaropatia (tabella 1). I biomarcatori rappresentano uno strumento clinico fondamentale, in particolar modo nell'indirizzare il percorso diagnostico-terapeutico in caso di dolore toracico o sindrome coronarica acuta (5). La troponina I (cTn I) costituisce il paradigma di un moderno utilizzo clinico di biomarcatori nell'identificazione di pazienti ad alto rischio, per i quali specifici interventi terapeutici potrebbero essere implementati al fine di modificare il rischio associato (33). Infatti, una volta stabilito che non vi è stato rilascio di cTnI, una sospetta SCA può essere inquadrata come angina instabile. D'altronde, la diagnosi di infarto miocardico (IM) si basa sul rialzo di un biomarcatore di necrosi, misurabile nel sangue (25). Inoltre, un precedente lavoro ha riportato che l'attivazione di cellule T mediata dalla beta2-integrina è incrementata nei pazienti con angina instabile e severa cardiopatia ischemica indipendentemente dai livelli di troponina cardiaca (24), e potrebbe rappresentare una strategia che consentirebbe di identificare i pazienti a rischio di infarto prima che si instauri la necrosi miocardica. Per tale motivo, la diagnosi di infarto miocardico potrebbe essere anticipata, potendo osservare la positivizzazione di marcatori antecedente l'elevazione dei marcatori di necrosi miocardica (2, 3, 8, 9, 37, 38). Ad oggi, l'angina instabile rappresenta ancora una diagnosi difficile in una considerevole percentuale di pazienti. Nei soli Stati Uniti sono circa 5.3 milioni i pazienti che giungono ogni anno in pronto soccorso con dolore toracico. Di questi sono poi approssimativamente 1.4 milioni quelli che vengono ospedalizzati con diagnosi di angina instabile e NSTEMI. Una corretta diagnosi ed il conseguente trattamento dei pazienti con angina instabile rappresenta ancora un punto critico per i medici, a causa della mancanza di un marcatore in grado di identificare l'ischemia miocardica in assenza di necrosi (15, 16). E' universalmente riconosciuto che il fenomeno della trombosi coronarica stia alla base delle complicanze acute dell'aterosclerosi, quali l'angina instabile e l'infarto miocardico acuto. Esiste un consenso universale sul fatto che l'infiammazione abbia un ruolo chiave nella fisiopatologia di tali fenomeni (15). Il fumo di sigaretta, notoriamente associato all'insorgere di processi infiammatori, si associa ad un numero ridotto di cellule progenitrici endoteliali circolanti, con conseguente maggiore incidenza di complicanze trombotiche (11). A tale proposito, è stato dimostrato come l'effetto del polimorfismo del gene della glutatione S-trasferasi fosse più marcato nei fumatori affetti da CAD (44). A conferma di ciò, l'infiammazione cronica indotta dal fumo è sufficiente ad incrementare le forme attivate di tutte le MAP-chinasi. Tuttavia, il presente studio dimostra per la prima volta che i livelli di fosfo-ERK-1/2 sono significativamente elevati in presenza di una SCA o di una angina instabile, rispetto al gruppo CAD. La ricerca ha fatto emergere un crescente numero di nuovi candidati marcatori nel contesto dell'ischemia miocardica; tuttavia, questi marcatori devono ancora

essere incorporati nell'uso clinico (5). Indicatori non invasivi di diversi fattori che contribuiscono in maniera indipendente alla progressione della malattia cardiovascolare, come l'infiammazione e la trombosi, potrebbero aggiungere informazioni complementari a quelle attualmente disponibili (32). Infatti, nuovi biomarcatori di infiammazione, come la proteina C reattiva (PCR) e la mieloperossidasi, e biomarcatori della trombosi, come il ligando CD40 ed il fattore di von Willebrand, hanno dimostrato un valore prognostico indipendente in pazienti con cardiopatia ischemica stabile ed instabile (5, 33). In aggiunta, è stato dimostrato che i livelli sierici di LOX-1 (lectin-like oxidized LDL receptor-1) sono significativamente aumentati in pazienti con SCA (16). Recentemente, il nostro gruppo ha dimostrato, attraverso l'uso dell'analisi proteomica del siero, che la proteina che lega la vitamina D è significativamente aumentata nel siero di pazienti con STEMI (14).

Il ruolo dell'infiammazione sistemica e dell'attivazione linfocitaria nel corso di SCA è ampiamente riconosciuto (34). Osservazioni indipendenti hanno infatti riportato un incremento del numero di cellule T attivate ed un aumento della concentrazione di IgM nel circolo di pazienti con angina instabile. In particolare, percentuali significativamente più elevate di cellule T-helper (CD41) circolanti sono state riscontrate in pazienti con SCA rispetto ai controlli. Linfociti T attivati sono anche più frequentemente rilevabili nel sangue periferico di pazienti con SCA (9, 26, 28, 30). Studi precedenti hanno mostrato l'utilità di interventi mirati in tali pazienti, come l'uso dell'ecografia intravascolare con istologia virtuale per prevenire la microembolizzazione coronarica periprocedurale dopo PCI (6, 7). A tale riguardo, l'efficacia mostrata dalle statine e dai farmaci antiplastrinici nel trattamento della rottura di placche infiammatorie si traduce in una riduzione del carico trombotico riscontrato all'angiografia coronarica (17). Il presente studio dimostra per la prima volta che i livelli di ERK 1/2 fosforilata, misurati con metodica FACS, potrebbero rappresentare un importante marcatore nella stratificazione del rischio di pazienti acuti. Tale potere predittivo veniva esercitato indipendentemente dalla terapia farmacologica in corso. A conferma di tale osservazione, nessuna differenza significativa è stata rilevata nei sieri 24 ore dopo la somministrazione di clopidogrel rispetto ai valori basali. Dati sperimentali suggeriscono che gli inibitori della HMG-CoA reduttasi possono influire sulle MAP-chinasi nel contesto delle SCA. Nel presente studio, il pretrattamento con statina era capace di ridurre l'attivazione di ERK1/2 indotta dall'interleuchina 2.

Purtroppo, i dati del presente lavoro non consentono di verificare tale ipotesi in un contesto clinico, poiché la maggior parte dei pazienti arruolati erano già in trattamento con differenti tipi e dosaggi di statine, rendendo difficile la valutazione dell'impatto delle statine sulle MAP-chinasi.

E' noto che la famiglia delle MAP-chinasi ricopre un ruolo critico nella trasduzione e nella regolazione dei segnali intracellulari. Queste proteine formano complesse reti di segnali che possono essere indotte da un'ampia serie di stimoli esterni e possono raggiungere effetti cellulari altamente specifici attraverso molti meccanismi regolatori (31). L'inflammation così come altri stimoli di varia natura attivano le MAP-chinasi ed in particolare le tre cascate JNK, ERK 1/2 e p38 (10, 22). La cascata di ERK 1/2 risponde principalmente allo stimolo di segnali di crescita e di citochine infiammatorie. JNK e p38 sono entrambe definite MAP-chinasi attivate dallo stress a causa della loro risposta selettiva a vari fattori di stress fisici e chimici (come raggi ultravioletti, shock osmotico, infezioni e citochine). La valutazione delle MAP-chinasi in pazienti con SCA, prima e dopo PCI, non è stata accompagnata da variazioni dell'attività di fosfo-ERK 1/2. Questo risultato è stato precedentemente osservato in altri studi, che hanno dimostrato come l'attivazione dei recettori epatici X inibisca la migrazione di linfociti CD4 (45). Recentemente, un incremento dei livelli di MAP-chinasi sono stati riscontrati in cellule leucocitarie isolate da pazienti ipertesi con valori pressori non controllati, rinforzando quindi l'ipotesi che in diverse patologie cardiovascolari, le MAP-chinasi possano essere utili biomarcatori, in grado di riconoscere diversi processi fisiopatologici in una fase precoce (12). Per questo motivo, abbiamo valutato se le proteine MAP-chinasi siano attivate nei linfociti T circolanti in risposta all'ischemia miocardica acuta in pazienti con SCA. La forma fosforilata di ERK 1/2 nei linfociti T è risultata essere considerevolmente maggiore in pazienti con angina instabile, NSTEMI e STEMI rispetto a quelli con CAD ed ai soggetti di controllo. D'altronde, i livelli di fosfo-ERK 1/2 non erano significativamente aumentati in pazienti con CAD rispetto a controlli sani. E' stato poi interessante notare come JNK sia significativamente fosforilata in linfociti T di pazienti con SCA con positività dei marcatori di necrosi - come lo STEMI ed il NSTEMI - ma non in pazienti con angina instabile senza evidenza di necrosi miocardica. Una spiegazione meccanicistica per l'attivazione differenziale delle MAP-chinasi potrebbe essere offerta dalla presenza di stimoli differenti nel contesto dell'angina instabile rispetto all'infarto miocardico acuto. Alcuni studi hanno già dimostrato come l'ipossia, l'ischemia e l'ischemia/riperfusionne inducano le MAP-chinasi e variazioni a livello trascrizionale nei miociti cardiaci. Stress cellulari, incluso l'ipossia, sono in grado di attivare p38 e JNK, mentre l'attivazione di ERK 1/2 mediata dall'ischemia/riperfusionne resta un meccanismo controverso. In questo studio, la fosforilazione di tutte le MAP-chinasi era incrementata in corso di infarto miocardico acuto, mentre ERK 1/2 era aumentata nell'angina instabile, in assenza di modifiche dell'attivazione di JNK. In tale contesto, abbiamo riscontrato che la finestra temporale dell'attivazione di ERK 1/2 e p38 è differente da quella di JNK. Infatti, l'attività delle MAP-chinasi ERK 1/2 e p38 aumenta più rapidamente rispetto a quella di JNK. In aggiunta, JNK è attivata da citochine proinfiammatorie e

da fattori di stress ambientale, come il TNF (tumor necrosis factor) e l'irradiazione ultravioletta, mentre l'attivazione di ERK 1/2 coinvolge la via di trasduzione di Ras. E' interessante notare che, sebbene le vie del segnale di JNK siano molto simili a quelle di p38, nella maggior parte degli studi in vitro è stato riportato che la cinetica temporale dell'attivazione di JNK è differente da quella di p38 in un modello di legatura di arteria coronaria di ratto. L'inflammation della regione infartuata potrebbe indurre l'attivazione di JNK. In conclusione, nel presente studio la valutazione dell'attivazione delle MAP-chinasi in linfociti T di pazienti con SCA ha dimostrato una buona efficacia diagnostica, essendo inoltre in grado di evidenziare l'ischemia miocardica acuta prima dell'insorgenza di necrosi miocardica. Infatti, i pazienti con angina instabile ma senza evidenza di necrosi miocardica presentano attivazione di ERK 1/2 ma non di JNK, laddove i linfociti T di pazienti con STEMI e NSTEMI presentano livelli aumentati della forma attiva sia di ERK 1/2 che di JNK.

Limitazioni dello studio

Questo studio è stato condotto per valutare l'attivazione molecolare dei linfociti T in una popolazione relativamente piccola di pazienti con SCA. Per confermare il ruolo potenziale dell'attivazione delle MAP-chinasi per la diagnosi e la stratificazione del rischio dei pazienti con sindrome coronarica acuta, sono necessari ulteriori studi prognostici, di maggiore ampiezza e randomizzati. Ulteriori studi potrebbero inoltre meglio definire l'esatta cinetica temporale dell'attivazione delle MAP-chinasi nei linfociti T durante SCA.

Bibliografia

1. Antman EM, Sacks DB, Rifai N, McCabe CH, Cannon CP, Braunwald E (1998) Time to positivity of a rapid bedside assay for cardiac-specific troponin T predicts prognosis in acute coronary syndromes: a Thrombolysis in Myocardial Infarction (TIMI) 11A substudy. *J Am Coll Cardiol* 31:326–330. doi:10.1016/S0735-1097(97)00485-3
2. Berk BC, Weintraub WS, Alexander RW (1990) Elevation of C-reactive protein in “active” coronary artery disease. *Am J Cardiol* 65:168–172. doi:10.1016/0002-9149(90)90079-G
3. Biasucci LM, Vitelli A, Liuzzo G, Altamura S, Caligiuri G, Monaco C, Rebuffi AG, Ciliberto G, Maseri A (1996) Elevated levels of interleukin-6 in unstable angina. *Circulation* 94:874–877
4. Biasucci LM, D’Onofrio G, Liuzzo G, Zini G, Monaco C, Caligiuri G, Tommasi M, Rebuffi AG, Maseri A (1996) Intracellular neutrophil myeloperoxidase is reduced in unstable angina and acute myocardial infarction, but its reduction is not related to ischemia. *J Am Coll Cardiol* 27:611–616. doi:10.1016/0735-1097(95)00524-2
5. Bonaca MP, Morrow DA (2008) Defining a role for novel biomarkers in acute coronary syndromes. *Clin Chem* 54:1424–1431. doi:10.1373/clinchem.2008.105387 *Basic Res Cardiol* 123
6. Böse D, von Birgelen C, Zhou XY, Schmermund A, Philipp S, Sack S, Konorza T, Möhlenkamp S, Leineweber K, Kleinbongard P, Wijns W, Heusch G, Erbel R (2008) Impact of atherosclerotic plaque composition on coronary microembolization during percutaneous coronary interventions. *Basic Res Cardiol* 103: 587–597. doi:10.1007/s00395-008-0745-9
7. Bose D, Leineweber K, Konorza T, Zahn A, Bröcker-Preuss M, Mann K, Haude M, Erbel R, Heusch G (2007) Release of TNF α during stent implantation into saphenous vein aortocoronary bypass grafts and its relation to plaque extrusion and restenosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292:H2295–H2299. doi:10.1152/ajpheart.01116.2006
8. Buja LM, Willerson JT (1994) Role of inflammation in coronary plaque disruption. *Circulation* 89:503–505
9. Caligiuri G, Liuzzo G, Biasucci LM, Maseri A (1998) Immune system activation follows inflammation in unstable angina: pathogenetic implications. *J Am Coll Cardiol* 32:1295–1304. doi:10.1016/S0735-1097(98)00410-0
10. Cook SA, Sugden PH, Clerk A (1999) Activation of c-Jun N-terminal kinases and p38-mitogen-activated protein kinases in human heart failure secondary to ischaemic heart disease. *J Mol Cell Cardiol* 31:1429–1434. doi:10.1006/jmcc.1999.0979
11. Dernbach E, Randriamboavonjy V, Fleming I, Zeiher AM, Dimmeler S, Urbich C (2008) Impaired interaction of platelets with endothelial progenitor cells in patients with cardiovascular risk factors. *Basic Res Cardiol* 103:572–581. doi:10.1007/s00395-008-0734-z

12. Esposito G, Perrino C, Schiattarella GG, Belardo L, di Pietro E, Franzone A, Capretti G, Gargiulo G, Pironti G, Cannavo A, Sannino A, Izzo R, Chiariello M (2010) Induction of mitogenactivated protein kinases is proportional to the amount of pressure overload. *Hypertension* 55:137–143. doi:10.1161/HYPERTENSION.AHA.109.135467
13. Friedrich EB, Werner C, Walenta K, Böhm M, Scheller B (2009) Role of extracellular signal-regulated kinase for endothelial progenitor cell dysfunction in coronary artery disease. *Basic Res Cardiol* 104:613–620. doi:10.1007/s00395-009-0022-6
14. Gasparri C, Curcio A, Torella D, Gaspari M, Celi V, Salituri F, Boncompagni D, Torella M, Gulletta E, Cuda G, Indolfi C (2010) Proteomics reveals high levels of vitamin D binding protein in myocardial infarction. *Front Biosci* 2:796–804. doi:10.2741/E140
15. Gibler WB, Cannon CP, Blomkalns AL, Char DM, Drew BJ, Hollander JE, Jaffe AS, Jesse RL, Newby LK, Ohman EM, Peterson ED, Pollack CV (2005) American Heart Association Council on Clinical Cardiology (Subcommittee on Acute Cardiac Care); Council on Cardiovascular Nursing, and Quality of Care and Outcomes Research Interdisciplinary Working Group; Society of Chest Pain Centers. Interdisciplinary Working Group, in Collaboration With the Society of Chest on Cardiovascular Nursing, and Quality of Care and Outcomes Research Council on Clinical Cardiology (Subcommittee on Acute Cardiac Care), Council Department: A Scientific Statement From the American Heart Association Angina/Non–ST-Segment Elevation Myocardial Infarction in the Emergency. *Circulation* 111:2699–2710. doi:10.1161/01.CIR.0000165556.44271.BE
16. Hayashida K, Kume N, Murase T, Minami M, Nakagawa D, Inada T, Tanaka M, Ueda A, Kominami G, Kambara H, Kimura T, Kita T (2005) Serum soluble lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 levels are elevated in acute coronary syndrome a novel marker for early diagnosis. *Circulation* 112:812–818. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.104.468397
17. Heusch G, Kleinbongard P, Böse D, Levkau B, Haude M, Schulz R, Erbel R (2009) Coronary microembolization: from bedside to bench and back to bedside. *Circulation* 120:1822–1836. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.109.888784
18. Heusch P, Canton M, Aker S, van de Sand A, Konietzka I, Rassaf T, Menazza S, Brodde OE, Di Lisa F, Heusch G, Schulz R (2010) The contribution of reactive oxygen species and p38 mitogenactivated protein kinase to myofilament oxidation and progression of heart failure in rabbits. *Br J Pharmacol* 160:1408–1416. doi:10.1111/j.1476-5381.2010.00793.x
19. Indolfi C, Avvedimento EV, Rapacciuolo A, Di Lorenzo E, Esposito G, Stabile E, Feliciello A, Mele E, Giuliano P, Condorelli G, Chiariello M (1995) Inhibition of cellular ras prevents smooth muscle cell proliferation after vascular injury in vivo. *Nat Med* 6:541–545. doi:10.1038/nm0695-541

20. Indolfi C, Chiariello M, Avvedimento EV (1996) Selective gene therapy for proliferative disorders: sense and antisense. *Nat Med* 2:634–635. doi:10.1038/nm0696-634
21. Indolfi C, Avvedimento EV, Di Lorenzo E, Esposito G, Rapacciuolo A, Giuliano P, Grieco D, Cavuto L, Stingone AM, Ciullo I, Condorelli G, Chiariello M (1997) Activation of cAMP-PKA signaling in vivo inhibits smooth muscle cell proliferation induced by vascular injury. *Nat Med* 7:775–779. doi:10.1038/nm0797-775
22. Indolfi C, Curcio A, Chiariello M (2003) Simvastatin reduces neointimal thickening after experimental angioplasty. *Circulation* 107:e25. doi:10.1161/01.CIR.0000050549.85811.9D
23. Jacquet S, Nishino Y, Kumphune S, Sicard P, Clark JE, Kobayashi KS, Flavell RA, Eickhoff J, Cotten M, Marber MS (2008) The role of RIP2 in p38 MAPK activation in the stressed heart. *J Biol Chem* 283:11964–11971. doi:10.1074/jbc.M707750200
24. Konstandin MH, Aksoy H, Wabnitz GH, Volz C, Erbel C, Kirchgessner H, Giannitsis E, Katus HA, Samstag Y, Dengler TJ (2009) Beta2-integrin activation on T cell subsets is an independent prognostic factor in unstable angina pectoris. *Basic Res Cardiol* 104:341–351. doi:10.1007/s00395-008-0770-8
25. Kovanen PT, Kaartinen M, Paavonen T (1995) Infiltrates of activated mast cells at the site of coronary atheromatous erosion or rupture in myocardial infarction. *Circulation* 92:1084–1088
26. Libby P (2001) Current concepts of the pathogenesis of the acute coronary syndromes. *Circulation* 104:365–372
27. Liuzzo G, Biasucci LM, Gallimore JR, Grillo RL, Rebuffi AG, Pepys MB, Maseri A (1994) The prognostic value of C-reactive protein and serum amyloid a protein in severe unstable angina. *N Engl J Med* 331:417–424. doi:10.1056/NEJM19940818 3310701
28. Liuzzo G, Biasucci LM, Trotta G, Brugaletta S, Pinnelli M, Digianuario G, Rizzello V, Rebuffi AG, Rumi C, Maseri A, Crea F (2007) Unusual CD4⁺ CD28null T lymphocytes and recurrence of acute coronary events. *J Am Coll Cardiol* 50:1450–1458. doi:10.1016/j.jacc.2007.06.040
29. Mazzone A, De Servi S, Ricevuti G, Mazzucchelli I, Fossati G, Pasotti D, Bramucci E, Angoli L, Marsico F, Specchia G (1993) Increased expression of neutrophil and monocyte adhesion molecules in unstable coronary artery disease. *Circulation* 88:358–363
30. Methe H, Brunner S, Wiegand D, Nabauer M, Koglin J, Edelman ER (2005) Enhanced T-helper-1 lymphocyte activation patterns in acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol* 45:1939–1945. doi:10.1016/j.jacc.2005.03.040
31. Michel MC, Li Y, Heusch G (2001) Mitogen-activated protein kinases in the heart. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 363:245–266. doi:10.1007/s002100000363

32. Morrow DA, Braunwald E (2003) Future of biomarkers in acute coronary syndromes: moving toward a multimarker strategy. *Circulation* 108:250–252. doi:10.1161/01.CIR.0000078080.37974.D2
33. Morrow DA, Cannon CP, Jesse RL, Newby LK, Ravkilde J, Storrow AB, Wu AH, Christenson RH, Apple FS, Francis G, Tang W (2007) National Academy of Clinical Biochemistry Basic Res Cardiol 123 Laboratory Medicine Practice Guidelines: clinical characteristics and utilization of biochemical markers in acute coronary syndromes. *Clin Chem* 53:552–574. doi:10.1373/clinchem.2006.084194
34. Mulvihill N, Foley B, Ghaisas N, Murphy R, Crean P, Walsh M (2000) Evidence of prolonged inflammation in unstable angina and non Q-wave myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 34: 1210–1216. doi:10.1016/S0735-1097(00)00824-X
35. Neri Seneri GG, Prisco D, Martini F, Gori AM, Brunelli T, Poggesi L, Rostagno C, Gensini GF, Abbate R (1997) Acute T-cell activation is detectable in unstable angina. *Circulation* 95:1806–1812
36. Ohman EM, Armstrong PW, Christenson RH, Granger CB, Katus HA, Hamm CW, O’Hanesian MA, Wagner GS, Kleiman NS, Harrell FE Jr, Califf RM, Topol EJ (1996) Cardiac troponin T levels for risk stratification in acute myocardial ischemia. GUSTO IIA Investigators. *N Engl J Med* 335:1333–1341. doi: 10.1056/NEJM199610313351801
37. Puleo PR, Meyer D, Wathen C, Tawa CB, Wheeler S, Hamburg RJ, Ali N, Obermueller SD, Triana FJ, Zimmerman JL, Perryman MB, Roberts R (1994) Use of a rapid assay of subforms of creatine kinase-MB to diagnose or rule out acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 331:561–566. doi:10.1056/NEJM199409013310901
38. Quilici J, Banzet N, Paule P, Meynard JB, Mutin M, Bonnet JL, Ambrosi P, Sampol J, Dignat-George F (2004) Circulating endothelial cell count as a diagnostic marker for non–st-elevation acute coronary syndromes. *Circulation* 110:1586–1591. doi: 10.1161/01.CIR.0000142295.85740.98
39. Sabatine MS, Morrow DA, de Lemos JA, Gibson CM, Murphy SA, Rifai N, McCabe C, Antman EM, Cannon CP, Braunwald E (2002) Multimarker approach to risk stratification in non-ST elevation acute coronary syndromes simultaneous assessment of Troponin I, C-reactive protein, and B-type natriuretic peptide. *Circulation* 105:1760–1763. doi:10.1161/01.CIR.0000015464.18023.0A
40. Schulz R, Gres P, Skyschally A, Duschin A, Belosjorow S, Konietzka I, Heusch G (2003) Ischemic preconditioning preserves connexin 43 phosphorylation during sustained ischemia in pig hearts in vivo. *FASEB J* 10:1355–1357. doi:10.1096/ fj.02-0975fje

41. Schulz R, Belosjorow S, Gres P, Jansen J, Michel MC, Heusch G (2002) p38 MAP kinase is a mediator of ischemic preconditioning in pigs. *Cardiovasc Res* 55:690–700. doi:10.1016/S0008-6363(02)00319-X
42. Seeger FH, Sedding D, Langheinrich AC, Haendeler J, Zeiher AM, Dimmeler S (2010) Inhibition of the p38 MAP kinase in vivo improves number and functional activity of vasculogenic cells and reduces atherosclerotic disease progression. *Basic Res Cardiol* 105:389–397. doi:10.1007/s00395-009-0072-9
43. Sun C, Liang C, Ren Y, Zhen Y, He Z, Wang H, Tan H, Pan X, Wu Z (2009) Advanced glycation end products depress function of endothelial progenitor cells via p38 and ERK 1/2 mitogenactivated protein kinase pathways. *Basic Res Cardiol* 104:42–49. doi:10.1007/s00395-008-0738-8
44. Tamer L, Ercan B, Camsari A, Yildirim H, Cic,ek D, Sucu N, Ates, NA, Atik U (2004) Glutathione S-transferase gene polymorphism as a susceptibility factor in smoking-related coronary artery disease. *Basic Res Cardiol* 99:223–229. doi:10.1007/ s00395-004-0465-8
45. Walcher D, Vasic D, Heinz P, Bach H, Durst R, Hausauer A, Hombach V, Marx N (2010) LXR activation inhibits chemokineinduced CD4-positive lymphocyte migration. *Basic Res Cardiol* 105:487–494. doi:10.1007/s00395-010-0092-5
46. Wang Y (2007) Mitogen-activated protein kinases in heart development and diseases. *Circulation* 116:

Tabella

Tabella 1 Caratteristiche cliniche e parametri biologici della popolazione.

	CTRL	CAD	UA	NSTEMI	STEMI
Patients, <i>n</i>	20	21	22	19	19
Age (years)	59 ± 13	61 ± 7	61 ± 8	60 ± 13	60 ± 11
Male sex, <i>n</i> (%)	16 (80%)	16 (76%)	17 (77%)	15 (79%)	15 (79%)
Risk Factors, <i>n</i> (%)					
Hypertension	2 (10%)	5 (25%)*	6 (26%)*	5 (26%)*	5 (26%)*
Diabetes mellitus	0 (0%)	1 (3%)*	1 (3%)*	1 (5%)*	1 (5%)*
Smoking	0 (0%)	5 (23%)*	6 (25%)*	4 (23%)*	5 (28%)*
Hypercholesterolemia	0 (0%)	4 (18%)*	4 (18%)*	4 (19%)*	4 (20%)*
Familial history of CAD	2 (10%)	6 (27%)*	7 (30%)*	5 (28%)*	6 (29%)*
Single-vessel disease	0 (0%)	10 (48%)*	11 (50%)*	10 (53%)*	9 (47%)*
Multi-vessels disease	0 (0%)	11 (52%)*	11 (50%)*	9 (47%)*	10 (53%)*
BMI	26.5 ± 4.2	26.7 ± 2.0	27.1 ± 5.0	26.7 ± 2.9	27.8 ± 3.5
EF (%)	55 ± 10	50 ± 12	52 ± 7	50 ± 7	42 ± 16* ^{#,+}
hs CRP (mg/l)	0.9 ± 0.9	1.9 ± 0.6*	8.4 ± 3.4* [#]	25.0 ± 8.3* ^{#,+}	21.1 ± 8.6* ^{#,+}
Lymphocyte count (×10 ³ /μl)	2.1 ± 0.9	2.1 ± 0.6	2.3 ± 0.6	2.0 ± 0.5	2.0 ± 0.5
cTnI (ng/ml)	<0.01 ± 0	<0.01 ± 0	<0.01 ± 0	0.88 ± 0.87* ^{#,+}	1.6 ± 4* ^{#,+}
CK (U/l)	89.0 ± 57.0	99.0 ± 87.0	154.2 ± 26.4*	266.3 ± 23.8* ^{#,+}	2085.0 ± 999.0* ^{#,+,§}
Pro-BNP (pg/ml)	198.3 ± 13.6	213.7 ± 140.7	216.0 ± 120.0	1800.2 ± 230.0* ^{#,+}	5650.0 ± 521.0* ^{#,+,§}

Tutti i valori sono espressi come media ± DS o percentuale.

I confronti statistici sono stati eseguiti applicando il test ANOVA. Per la valutazione della PCR, è stato applicato il test *t* di Student con la correzione di Bonferroni.

CTRL volontari sani dalla banca dei donatori, *CAD* cardiopatia ischemica cronica, *UA* angina instabile, *NSTEMI* infarto miocardico senza soprasslivellamento del tratto ST, *STEMI* infarto miocardico con soprasslivellamento del tratto ST, *EF* frazione di eiezione, *hsCRP* proteina C reattiva ad alta sensibilità, *cTnI* isoforma cardiaca della subunità I del complesso delle troponine, *CK* creatin-chinasi, *Pro-BNP* precursore del peptide natriuretico cerebrale

**p* < 0.05 versus CTRL, #*p* < 0.05 versus CAD, +*p* < 0.05 versus UA, §*p* < 0.05 versus NSTEMI

Tabella 2 Performance diagnostica dei campioni

	Phospho-ERK1/2	Phospho-JNK
UA		
Cut-off	22,5	10,5
Sensitivity	78	67
Specificity	90	60
NSTEMI		
Cut-off	13,5	18,5
Sensitivity	56	94
Specificity	79	90
STEMI		
Cut-off	12	21
Sensitivity	56	95
Specificity	84	100

Valore di cut-off, sensibilità e specificità di fosfo ERK 1/2 e JNK in pazienti con angina instabile (UA), infarto miocardico senza sopraslivellamento del tratto ST (NSTEMI) e STEMI.

Figure

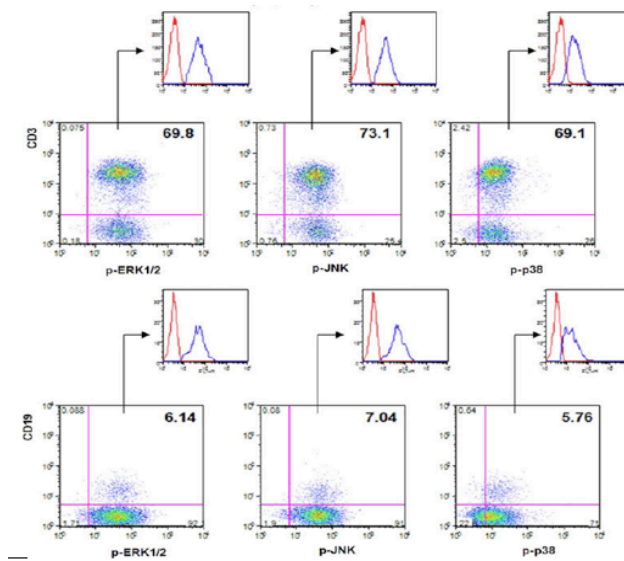


Figura 1 I livelli delle forme attivate di ERK 1/2 , JNK e p38 sono aumentati in linfociti T ma non in linfociti B durante SCA. L'analisi FACS mostra che ERK 1/2, JNK e p38 sono specificamente attivate (fosforilate) in linfociti T CD3+ mentre sono sostanzialmente non fosforilate in linfociti B CD19+ di pazienti con sindrome coronarica acuta. La figura riporta i risultati in un paziente con NSTEMI, a titolo esemplificativo.

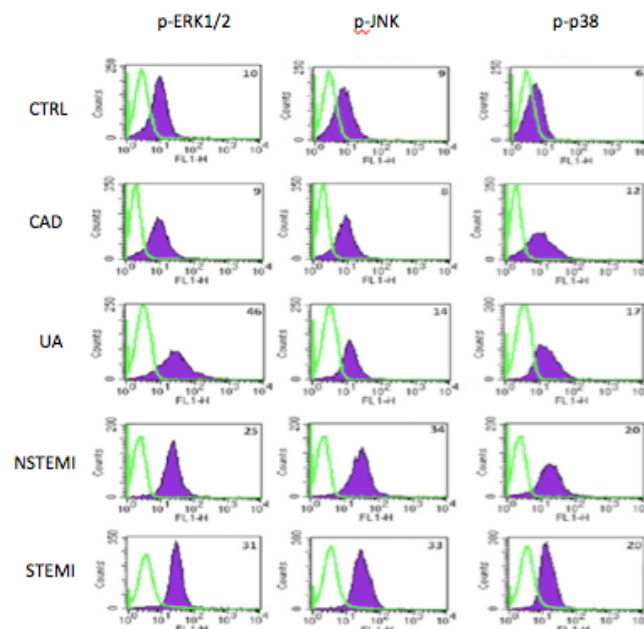


Figura 2 Attivazione differenziale delle MAP-chinasi in linfociti T di pazienti con SCA. L'analisi FACS mostra diversi pattern di espressione di fosfo-ERK 1/2, fosfo-JNK e fosfo-p38 in linfociti T di pazienti con SCA, (UA = angina instabile, NSTEMI = infarto miocardico senza sopraslivellamento del tratto ST, STEMI = infarto miocardico con sopraslivellamento del tratto ST), pazienti con cardiopatia ischemica cronica (CAD), e controlli sani (CTRL).

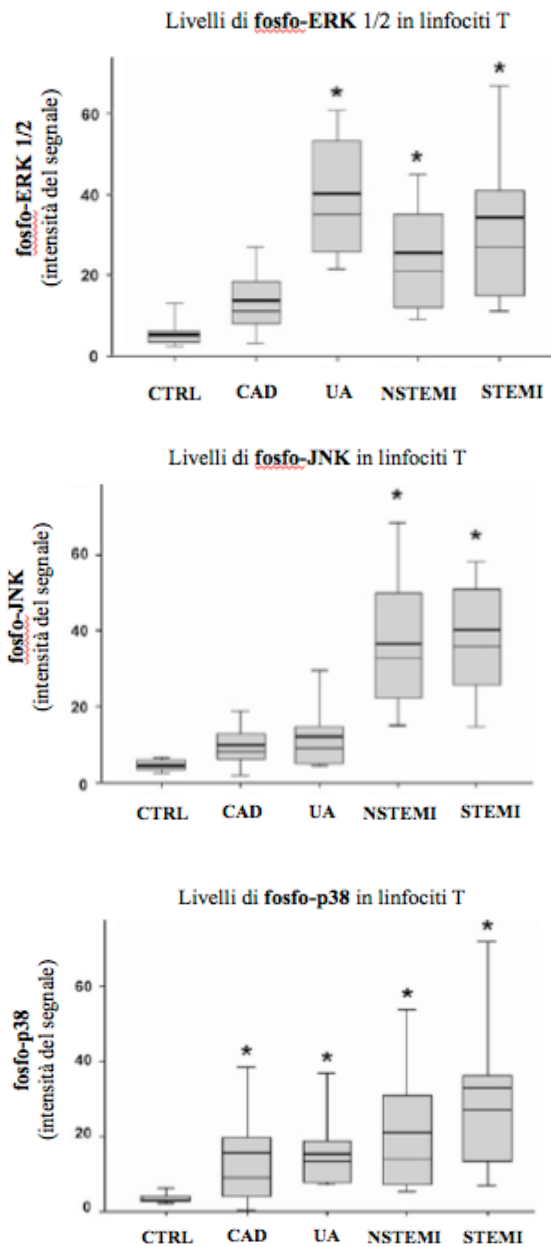


Figura 3 Attivazione di ERK 1/2, JNK e p38 in linfociti T di pazienti con SCA. L'intensità di fluorescenza di fosfo-ERK 1/2 è stata significativamente più elevata in pazienti con angina instabile, NSTEMI e STEMI ma non in pazienti con angina stabile, rispetto ai controlli (* $p < 0.05$ vs. CTRL). E' stato osservato un incremento statisticamente significativo nell'intensità di fluorescenza di fosfo-JNK solo in pazienti con SCA associate a necrosi miocardica ($p < 0.05$ vs. CTRL), laddove i livelli di fosfo-JNK nei pazienti con angina instabile non erano significativamente aumentati rispetto ai pazienti con cardiopatia ischemica cronica ed ai controlli. Un aumento statisticamente significativo di intensità di fluorescenza di fosfo-p38 è stata rilevata in tutti i pazienti con aterosclerosi coronarica (pazienti acuti e stabili) rispetto ai soggetti di controllo (* $p < 0.05$ vs. CTRL).

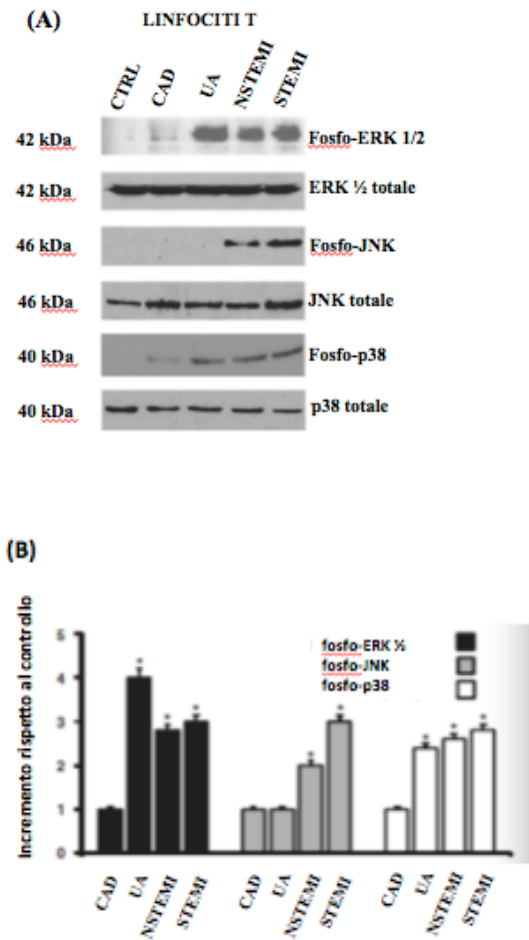


Figura 4 l'analisi di immunoblotting conferma l'attivazione differenziale delle MAP-chinasi in linfociti T di pazienti con SCA. (A) Analisi western blot rappresentativa, che mostra la fosforilazione di ERK1/2 ed i livelli di MAPK in pazienti con SCA. (UA, N=6; NSTEMI, N=6; STEMI, N=6), angina stabile (CAD, N=5) e soggetti di controllo (CTRL, N=5). (B) Analisi densitometrica delle forme attivate di ERK 1/2, JNK e p38 (* $p < 0.05$ vs. angina stabile).

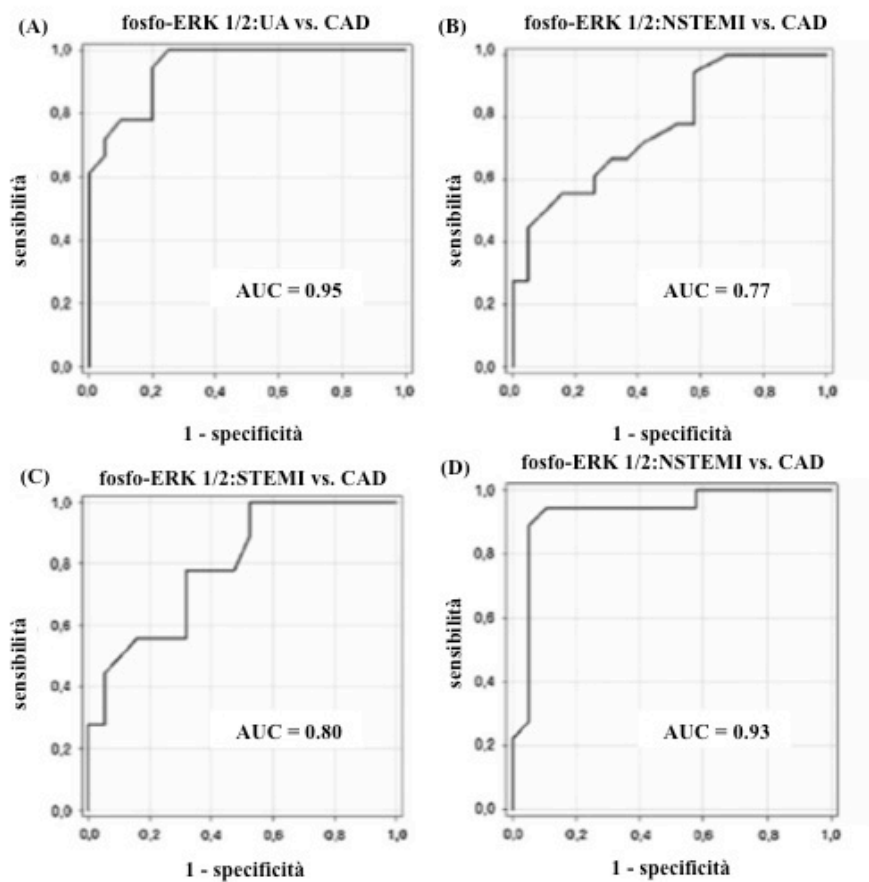


Figura 5 Dati di Sensibilità e Specificità ottenuti con le curve ROC. Curve ROC di fosfo-ERK 1/2 e fosfo-JNK per la diagnosi di SCA (a-c) ed NSTEMI (d) in pazienti consecutivi sottoposti a coronarografia. La frazione dei veri-positivi (sensibilità sull'asse y) è stata tracciata contro la frazione dei falsi-positivi (1 – specificità sull'asse x).

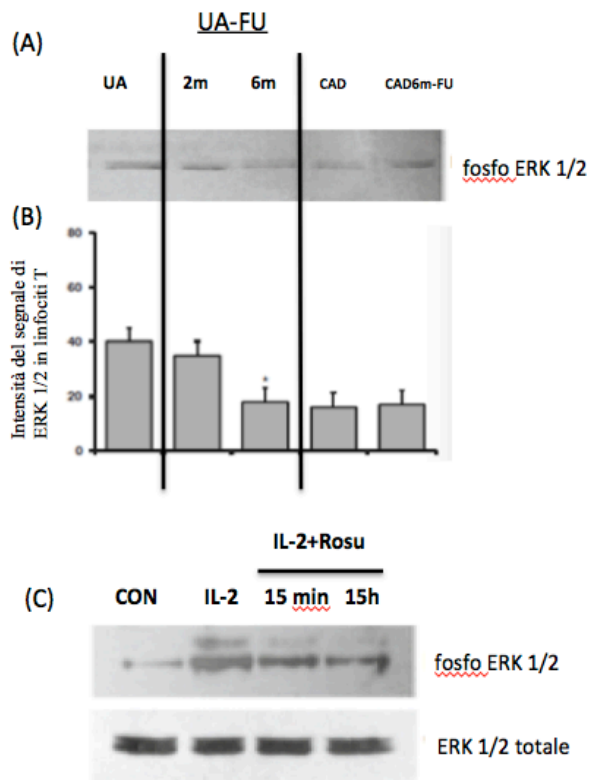


Figura 6 Attivazione transiente delle MAP-chinasi in linfociti T in vivo e in vitro. (A) Immunoblot rappresentativo che confronta fosfo-ERK 1/2 nell'angina instabile (UA) e nella cardiopatia ischemica cronica (CAD), entrambe con le rispettive valutazioni al follow-up. (B) La barra dei grafici mostra l'intensità di fluorescenza di fosfo-ERK 1/2 nei linfociti T di 22 pazienti al momento del ricovero per angina instabile e dopo 2 e 6 mesi (40 ± 18 ; 35 ± 11 ; 16 ± 8 , rispettivamente, $p < 0.05$). Nessuna variazione significativa dei livelli di fosfo-ERK 1/2 è stata osservata nella popolazione con CAD. (C) I linfociti T sono stati raccolti da soggetti sani e messi in coltura in assenza (CON) o in presenza di 1.000 UI/ml di interleuchina-2 (IL-2); l'attivazione di ERK 1/2 è stata valutata dopo 15 minuti e 15 ore dalla somministrazione di Rosuvastatina (Rosu).