

# Biomarcatori di infiammazione nella patologia aterosclerotica

I. Dato, G. Liuzzo

Istituto di Medicina Cardiovascolare, Università Cattolica del Sacro Cuore,  
Policlinico Agostino Gemelli, Roma

## Riassunto

I meccanismi infiammatori svolgono un ruolo cruciale nello sviluppo del processo aterosclerotico in tutti i suoi vari stadi. Alla base di tale processo ci sono delle complesse interazioni tra macrofagi, linfociti T e cellule muscolari lisce (CML), mediate da numerose citochine. Un crescente numero di evidenze sperimentali suggerisce che l'infiammazione sia direttamente coinvolta nella patogenesi delle sindromi coronariche acute (SCA) e ne condizioni l'evoluzione clinica. Infatti in pazienti affetti da SCA è possibile riscontrare degli infiltrati infiammatori particolarmente pronunciati a livello delle placche aterosclerotiche coronariche. Inoltre in questi pazienti sono rilevabili segni sistemici della reazione infiammatoria: la presenza di cellule infiammatorie circolanti in uno stato attivato (neutrofili, monociti e linfociti) e il riscontro di elevati livelli ematici di citochine pro-infiammatorie, tra cui interleuchina (IL)-1 e 6, e di proteine di fase acuta, in particolare la proteina C-reattiva (PCR). Quest'ultima si è rivelata come un importante predittore indipendente di eventi cardiaci avversi e morte sia in pazienti con SCA sia in pazienti con cardiopatia ischemica in fase di stabilità e in soggetti apparentemente sani. Inoltre, costituisce un indice prognostico importante nei pazienti sottoposti a procedure interventistiche coronariche percutanee (PCI), a breve e lungo termine. Infine, studi più recenti hanno ipotizzato un possibile ruolo della mieloperossidasi nella patogenesi dell'aterosclerosi e dell'instabilità della placca aterosclerotica.

## Summary

### Biomarkers of inflammation in atherosclerosis

Inflammatory mechanisms play a pivotal role in the atherosclerotic process. At the base of atherogenesis there are complex interactions between macrophages, T lymphocytes and smooth muscle cells. A growing body of experimental evidence suggests that inflammation is involved in the pathogenesis of acute coronary syndromes (ACS) and influences their clinical evolution. In fact, in patients with ACS, coronary atherosclerotic plaques are characterized by an abundant inflammatory infiltrate. Moreover, in these patients we can find systemic signs of inflammatory reaction: activated circulating inflammatory cells (neutrophil, monocytes and lymphocytes) and increased concentrations of pro-inflammatory cytokines, such as interleukin (IL)-1 and 6, and of acute phase reactants, in particular C-reactive protein (CRP). Recent data demonstrate that CRP is a strong independent predictor of adverse cardiac events and death in patients with ACS, but also in patients with stable ischemic heart disease and in apparently healthy men and women. Furthermore, CRP is an important prognostic index, for early and late outcome, in patients undergoing percutaneous coronary interventions. Finally, recent studies have supposed a possible role of myeloperoxidase in pathogenesis of atherosclerosis and plaque instability. *Key-words:* inflammation; cytokines; C-reactive protein; atherosclerosis; acute coronary syndromes; prognostic stratification.

## Introduzione

Evidenze sperimentali sempre più solide suggeriscono che, in associazione ai fattori di rischio cardiovascolare "classici", i fenomeni infiammatori ricoprono una posizione di rilievo nella dinamica del processo aterosclerotico coronarico e delle Sindromi Coronariche Acute (SCA). Pertanto i markers sistemici di infiammazione stanno assu-

mendo un ruolo sempre più importante nella stratificazione prognostica e nella gestione terapeutica dei pazienti con SCA<sup>1</sup>.

## Infiammazione e aterosclerosi

Le moderne teorie sull'aterogenesi indicano che i meccanismi infiammatori svolgono un ruolo cruciale nello svi-

luppo del processo aterosclerotico, per cui l'aterosclerosi deve essere considerata a tutti gli effetti una patologia di tipo infiammatorio e non più come un semplice fenomeno secondario all'accumulo di lipidi a livello della parete arteriosa. La crescita e il destino della placca aterosclerotica sono influenzati fin dall'inizio dall'infiammazione, a livello locale e sistemico. La lesione aterosclerotica primitiva è costituita dalla "stria lipidica"; l'evoluzione successiva passa attraverso lo stadio intermedio della "placca fibro-lipidica" fino a giungere alla "placca fibrosa matura". Quest'ultima rappresenta lo stadio più importante in quanto, essendo rilevata, è in grado di determinare una stenosi significativa limitante il flusso intravasale; inoltre può evolvere in uno stadio "complicato" (fissurazione, trombosi, emorragia). Gli elementi cellulari costitutivi della placca fibrosa sono cellule muscolari lisce (CML), macrofagi e linfociti T; in essa è possibile rilevare due componenti: il cappuccio fibroso, costituito da fibre collagene e CML, e il "core" lipidico, ricco di "foam cells", macrofagi, e detriti cellulari necrotici<sup>2</sup>. Nello sviluppo di entrambe le componenti sembra essere coinvolto un meccanismo infiammatorio ed immunomediato che vede come principale elemento effettore il monocita-macrofago. In base alla teoria della "response to injury", l'aterogenesi rappresenta la reazione della parete arteriosa ad un danno, e per tale motivo può essere considerata un processo "infiammatorio"<sup>1</sup>. Gli steps fondamentali di tale processo possono essere così schematizzati:

1. *danno endoteliale*: inteso non solo come danno meccanico (denudamento dell'endotelio), ma soprattutto come "disfunzione" ed "attivazione" endoteliale (aumentata permeabilità, disregolazione dei sistemi di controllo locale con acquisizione di proprietà protrombotiche e vasocostrittrici). Gli stimoli flogogeni in grado di innescare questa disfunzione endoteliale iniziale possono essere numerosi: ossidativi (LDL ossidate [OxLDL], derivanti dalla ossidazione endoteliale delle LDL plasmatiche); meccanici (shear stress; ipertensione arteriosa); infettivi (virus; batteri); immunologici (autoimmunità); tossici (fumo); metabolici (iperlipidemia; diabete; iperomocitemia)<sup>3</sup>.
2. *reclutamento dei monociti*: l'espressione delle molecole di adesione (ICAM-1, VCAM-1, E-selectina) sulla superficie endoteliale e la successiva diapedesi transendoteliale dei monociti, rappresentano gli eventi più precoci dell'aterogenesi. Nell'intima, i monociti vanno incontro ad attivazione trasformandosi in macrofagi<sup>4</sup>.
3. *formazione della placca aterosclerotica*: si fonda sull'interazione tra macrofagi, linfociti T, CML<sup>4</sup>. Il macrofago è attivato da numerosi stimoli: OxLDL; IL-1 e tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  prodotti dall'endotelio attivato; interferon (IFN)- $\gamma$  derivante dai linfociti T, ed elabora tutta una serie di citochine (IL-6, IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-18) in grado di amplificare e perpetuare il processo infiammatorio a livello della placca potenziando ulteriormente l'attivazione delle cellule endoteliali, dei linfociti e dei macrofagi stessi. L'IL-6 agendo a livello epatico, stimola la sintesi di proteine di fase acuta, prima fra tutte la Proteina C Reattiva (PCR); tale proteina potrebbe quindi costituire un marker sierologico sistemico dell'attività infiammatoria locale, a livello della placca aterosclerotica.

ca. Mediante l'esposizione del recettore "scavenger" alcuni macrofagi attivati incorporano le OxLDL, trasformandosi in "foam cells". Infine i macrofagi sono in grado di produrre il fattore di crescita di derivazione piastrinica (PDGF) ed il fattore di crescita per i fibroblasti (FGF), capaci di indurre la migrazione delle CML nell'intima e la loro proliferazione<sup>4</sup>.

I linfociti raggiungono l'intima mediante interazione con le molecole di adesione esposte dall'endotelio e sostengono il processo infiammatorio. I linfociti riscontrati nelle placche aterosclerotiche si trovano in uno stato attivato; circa il 64% sono cellule della memoria (CD 45 R+) ed espongono l'antigene HLA-DR $\alpha$  (segno di recente attivazione); la citochina principale da essi prodotta è l'IFN- $\gamma$ <sup>5</sup>.

Le CML, normalmente situate nella media, transmigrano nell'intima sotto l'azione chemiotattica del PDGF, dove proliferano e sintetizzano le proteine della matrice extracellulare della placca aterosclerotica (collagene I e III; elastina; proteoglicani), responsabili della produzione del cappuccio fibroso<sup>3</sup>. L'integrità e la resistenza del cappuccio fibroso sono strettamente correlate alla funzionalità delle CML e conseguono ad un equilibrio tra l'azione delle CML che producono proteine di matrice (collagene; elastina), e quella dei macrofagi, che producono le metalloproteinasi. Un ruolo di rilievo nella destabilizzazione della placca è svolto dai linfociti T: essi producono IFN- $\gamma$ , citochina in grado di agire su entrambi i tipi cellulari (CML e macrofagi) il cui equilibrio condiziona la resistenza del cappuccio fibroso. Infatti l'IFN- $\gamma$  da un lato inibisce la proliferazione delle CML e la loro sintesi delle proteine di matrice, dall'altro stimola la produzione macrofagica di metalloproteinasi; il risultato è appunto un indebolimento della placca<sup>3</sup>.

### Markers sistemici di infiammazione

*Attivazione di cellule infiammatorie*: diversi lavori hanno dimostrato che i neutrofili, i linfociti ed i monociti dei pazienti con SCA sono in uno stato attivato. Il nostro gruppo ha confermato la presenza di neutrofili attivati in pazienti affetti da infarto miocardico ed angina instabile, rilevando una riduzione dell'indice di mieloperossidasi intracellulare (enzima la cui concentrazione intracitoplasmatica risulta inversamente correlata al grado di attivazione del neutrofilo); tale attivazione non è secondaria ad uno stimolo ischemico ma è un evento primario, presente in condizioni basali<sup>5</sup>. Inoltre recentemente abbiamo dimostrato che nei pazienti con angina instabile i neutrofili si attivano dopo il passaggio attraverso il letto vascolare coronarico, e che tale attivazione avviene in tutti e tre i principali rami coronarici, a prescindere dalla localizzazione della "culprit lesion"<sup>6</sup>. Neri Sernerì et al. hanno dimostrato un'attivazione dei linfociti e monociti nei pazienti con angina instabile, limitata alla fase acuta di instabilità, per cui è stata proposta l'ipotesi che l'angina instabile potrebbe essere associata ad un transitorio ed acuto "burst" di infiammazione, scatenato dall'attivazione di linfociti e monociti da parte di fattori sconosciuti<sup>7</sup>. La presenza di linfociti attivati nei pazienti con angina instabile implica una stimolazione antigenica, ma la natura di tali antigene/i deve essere ancora investigata. Diversi autoantigeni, tra cui OxLDL ed "heat shock proteins", presenti nella placca aterosclerotica, sono in grado di innescare una risposta immunitaria. Agenti infettivi quali

*Chlamydia pneumoniae*, Cytomegalovirus ed *Helicobacter pylori* sono stati associati al processo aterosclerotico e alla cardiopatia ischemica in diversi studi sieroepidemiologici e istopatologici; tali microrganismi potrebbero costituire uno stimolo per l'attivazione linfo-monocitaria all'interno della placca<sup>8</sup>. Recentemente Liuzzo et al. hanno riscontrato che i pazienti con angina instabile si caratterizzano inoltre per un'espansione del sottogruppo linfocitario T CD4+CD28null, dotato di un' aumentata capacità citolitica e responsabile della produzione di IFN- $\gamma$ <sup>9</sup>. Il cronico aumento di IFN- $\gamma$  nei pazienti con angina instabile potrebbe portare ad una conseguente attivazione dei monociti-macrofagi circolanti e tissutali. Dato che il deficit di espressione del CD28 potrebbe risultare da una cronica esposizione antigenica, l'espansione del sottogruppo CD4+CD28 potrebbe riflettere una persistente risposta immunitaria a microrganismi o autoantigeni contenuti nelle placche aterosclerotiche. Il motivo della localizzazione di tali linfociti nei vasi coronarici è sconosciuto, ma potrebbe essere correlato alla presenza di epitopi antigenici.

**Markers sierologici:** i markers sierologici di infiammazione hanno assunto un ruolo ben definito nell'ambito delle SCA solo negli ultimi anni, con l'accumularsi di dati sempre più numerosi sulla PCR, il prototipo di proteina di fase acuta. Il nostro gruppo ha dimostrato che in circa il 70% dei pazienti con angina instabile severa (Braunwald class IIIB) è riscontrabile un'aumento dei livelli di PCR ed IL-6 (principale stimolo induttore della sintesi epatica di PCR) all'ingresso, nel 50% alla dimissione e nel 45% a 6 mesi di follow-up; tale aumento si associa ad un incremento del rischio di instabilità ricorrente e di infarto del miocardio<sup>10,11</sup>. La risposta di fase acuta osservata in tali pazienti risulta non correlata alla necrosi miocardica o allo stimolo ischemico; essa pertanto non dovrebbe essere considerata un evento secondario al danno ischemico miocardico o alla formazione del trombo, ma un indice di un'attivazione infiammatoria basale preesistente<sup>12</sup>. Inoltre la PCR è stata identificata come un forte predittore di eventi cardiaci avversi e morte in soggetti sani e in pazienti con angina cronica stabile<sup>13</sup>.

Un valore di PCR >3 mg/L all'ingresso nei pazienti con angina instabile ha una sensibilità del 90% e una specificità dell'82% nel predire complicanze intraospedaliere (morte cardiaca, infarto miocardico, rivascolarizzazione urgente); la sensibilità aumenta fino al 100% nei pazienti con PCR >10 mg/L all'ingresso<sup>14</sup>.

Nello studio FRISC livelli di PCR >10 mg/L nei pazienti con angina instabile o infarto miocardico non-Q si associano a un aumento significativo del rischio di morte a un follow-up di quattro anni<sup>15</sup>. Il nostro gruppo ha dimostrato che, nei pazienti con angina instabile, livelli elevati di PCR (>3 mg/L) alla dimissione costituiscono un predittore indipendente di morte, infarto miocardico e ricorrenza della sintomatologia anginosa a un anno di follow-up<sup>16</sup>.

Elevati livelli circolanti di diverse citochine (es: IL-6, IL-1Ra, IL-2R, IFN-gamma, IL-18, TNF-alfa) sono associate con il rischio di morte, infarto miocardico e eventi coronarici ricorrenti<sup>17</sup>. A causa della breve emivita, dei ridotti livelli circolanti e della presenza di test non standardizzati, dispendiosi in termini economici e di tempo, l'uso delle citochine a scopo clinico è al momento scarsamente appli-

cabile, in particolare per la prognosi a lungo termine, sebbene possano rappresentare uno strumento importante negli studi fisiopatologici.

## Conclusioni

Sebbene i meccanismi patogenetici delle SCA rimangono ancora oscuri sotto diversi aspetti, i dati attualmente disponibili suggeriscono che tali sindromi non possono essere meramente considerate come il risultato della crescita e fissurazione di una placca aterosclerotica coronarica. Di certo il processo infiammatorio ricopre un ruolo determinante nella destabilizzazione delle sindromi ischemiche. Anche se le cause dello stato infiammatorio basale sistemico rilevabile nei pazienti con SCA non sono ancora ben chiare, la sua probabile chiave interpretativa potrebbe essere rappresentata da un'aumentata risposta del sistema immune-infiammatorio nei riguardi di stimoli aspecifici di svariata natura (infettivi; non infettivi: OxLDL, etc.); questi assumerebbero un ruolo importante elettivamente in pazienti geneticamente predisposti (suscettibilità individuale). Comunque, al di là delle considerazioni patogenetiche, bisogna prendere atto che i markers sierologici di infiammazione, in particolare la PCR, rivestono indubbiamente un'utilità clinica importante sia come indici per la stratificazione prognostica sia come orientamento negli snodi decisionali diagnostico-terapeutici nei quali ci si imbatte quotidianamente nell'ambito della gestione clinica del paziente con SCA, nell'ottica di una terapia mirata e individualizzata ("tailored therapy") e di una razionalizzazione delle risorse sanitarie.

## Bibliografia

1. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 2002; 105:1135-43.
2. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993; 362: 801-8.
3. Sary HC, Chlander AB, Glagov S, Guyton JR, Insull WJr, Rosenfeld ME, et al. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arterioscler Thromb* 1994; 14:840-56.
4. Jonasson L, Holm J, Skalli O, Bondjers G, Hansson GK. Regional accumulation of T cells, macrophages and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque. *Arteriosclerosis* 1986; 6:131-8.
5. Biasucci LM, D'Onofrio G, Liuzzo G, Zini G, Monaco C, Caligiuri G, et al. Intracellular neutrophil myeloperoxidase is reduced in unstable angina and myocardial infarction, but its reduction is not related to ischemia. *J Am Coll Cardiol* 1996; 27:611-6.
6. Buffon A, Biasucci LM, Liuzzo G, D'Onofrio G, Crea F, Maseri A. Widespread coronary inflammation in unstable angina. *N Engl J Med* 2002; 347:5-12.
7. Neri Serneri GG, Abbate R, Gori AM, Attanasio M, Martini F, Giusti B, et al. Transient intermittent lymphocyte activation is responsible for the instability of angina. *Circulation* 1992; 86:790-7.
8. Kol A, Bourcier T, Lichtman AH, Libby P. Chlamydial and human heat shock protein 60s activate human vascular endothelium, smooth muscle cells, and macrophages. *J Clin Invest* 1999; 103:571-7.
9. Liuzzo G, Goronzy JJ, Yang H, Kopecky SL, Holmes DR,

- Frye RL, et al. Monoclonal T-cell proliferation and plaque instability in acute coronary syndromes. *Circulation* 2000; 102:2883-8.
10. Liuzzo G, Biasucci LM, Gallimore JR, Grillo R, Rebuffi AG, Pepys MB, et al. The prognostic value of C-reactive protein and serum amyloid A protein in severe unstable angina. *N Engl J Med* 1994; 331:417-24.
  11. Biasucci LM, Vitelli A, Liuzzo G, Altamura S, Caligiuri G, Monaco C, et al. Elevated levels of interleukin-6 in unstable angina. *Circulation* 1996; 94:874-7.
  12. Liuzzo G, Biasucci LM, Rebuffi AG, Gallimore JR, Caligiuri G, Lanza GA, et al. Plasma protein acute phase response in unstable angina is not induced by ischemic injury. *Circulation* 1996; 94:2374-80.
  13. Haverkate F, Thompson SG, Pyke SDM, Gallimore JR, Pepys MB. Production of C-reactive protein and risk of coronary events in stable and unstable angina. *Lancet* 1997; 349:462-6.
  14. Biasucci LM, Meo A, Buffon A, Narducci ML, Pelliccioni S, Santamaria M, et al. Independent prognostic value of CRP levels for in-hospital death and myocardial infarction in unstable angina. *Circulation* 2000; 102:499.
  15. Toss H, Lindahl B, Siegbahn A, Wallentin L. Prognostic influence of increased fibrinogen and C-reactive protein levels in unstable coronary artery disease. FRISC study Group. *Fragmin during Instability in Coronary Artery Disease*. *Circulation* 1997; 96:4204-10.
  16. Biasucci LM, Liuzzo G, Grillo RL, Caligiuri G, Rebuffi AG, Buffon A, et al. Elevated levels of C-reactive protein at discharge in patients with unstable angina predict recurrent instability. *Circulation* 1999; 99:855-60.
  17. Ridker PM, Rifai N, Pfeffer M, Sacks F, Lepage S, Braunwald E. Elevation of tumor necrosis factor-alpha and increased risk of recurrent coronary events after myocardial infarction. *Circulation* 2000; 101:2149-53.