



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA

Dottorato di Ricerca in Farmacologia e Tossicologia  
Sperimentali

XXII ciclo

Cellule endoteliali e Aterosclerosi:  
*studi in vitro e in vivo.*

Tesi di Dottorato di:

COSTA SARA

Coordinatore:

Ch.ma Prof.ssa Elisabetta Barocelli

Relatore:

Ch.mo Prof. Franco Bernini

Triennio Accademico 2007-2009

## **Introduzione**

<b><u>ATEROSCLEROSI</u></b>	<b>1</b>
▪ <i>Patogenesi</i>	2
▪ Processo ossidativo	5
▪ Formazione della placca	6
▪ Adesione	6
▪ Foam cells	8
▪ Meccanismi infiammatori dell'aterosclerosi	12
▪ Formazione della capsula e del cuore necrotico	14
▪ <i>Trombosi associata ad aterosclerosi</i>	15
<b><u>IL RUOLO DELLE CITOCINE NELL'ATEROSCLEROSI</u></b>	<b>16</b>
○ <i>TNF-alpha</i>	17
○ <i>IL-1</i>	17
○ <i>IL-2</i>	17
○ <i>IL-6</i>	17
○ <i>IL-12</i>	18
○ <i>IL-18</i>	18
○ <i>IFN-gamma</i>	19
<b><u>RUOLO DELL'ENDOTELIO NELL'ATEROSCLEROSI</u></b>	<b>20</b>
○ <i>Monossido di azoto</i>	23
○ <i>L'eccesso ossidativo</i>	24
○ <i>Endotelina-1</i>	25
○ <i>Valutazione della funzione endoteliale</i>	26
○ <i>Trattamento della disfunzione endoteliale</i>	28

## **I Parte**

<b><u>I CALCIOANTAGONISTI</u></b>	<b>31</b>
I Calcioantagonisti nel trattamento della disfunzione endoteliale	33
La Manidipina	36

## **Scopo della Ricerca**

### **Materiali e Metodi** 38

- Caratteri generali 41
- Isolamento e coltura delle cellule endoteliali umane isolate da cordone ombelicale (HUVEC) 41
- Cultura monociti umani THP-1 44
- Modificazione delle Lipoproteine LDL 44
- Stimolazione e trattamento con Manidipina 44
- Test di vitalità' (MTT test) 45
- Determinazione del contenuto proteico 46
- Valutazione della secrezione di IL-6 47
- Analisi statistiche 48

### **Risultati**

- Vitalità cellulare 50
- Secrezione di IL-6 da cellule endoteliali, HUVEC, trattate con lipoproteine modificate 52
- Secrezione di IL-6 e di IL-8 da cellule endoteliali, HUVEC, stimulate con TNF- $\alpha$  54
- Secrezione di IL-6 da cellule THP-1, indotta da diversi stimoli pro infiammatori 56
- Effetto della Manidipina sulla secrezione di IL-6, da cellule THP-1, indotta da un mix di citochine 57

### **Discussione** 61

## **II Parte**

### **HDL e Aterosclerosi** 67

- HDL nel trasporto inverso del colesterolo (*RCT*) 67
  - Maturazione e rimodellamento intravascolare delle particelle 72

○ Maturazione e rimodellamento intravascolare delle particelle HDL, mediante esterificazione, scambio lipidico e modificazioni lipolitiche.	72
<b><u>SR-BI</u></b>	73
<b><u>RUOLO DELLE HDL E DI SR-BI NEL PROMUOVERE IL RIPARO ENDOTELIALE</u></b>	76
Ruolo delle HDL nella regolazione dell'apoptosi, proliferazione e migrazione delle cellule endoteliali	78
○ <i>Apoptosi</i>	78
○ Proliferazione e Migrazione cellulari	79
<b><u>Scopo della Ricerca</u></b>	81
<b><u>Materiali e Metodi</u></b>	
○ Generazione dei modelli animali utilizzati	83
○ Isolamento di cellule endoteliali da aorta di topo	84
○ Citofluorimetria a Flusso	89
○ Purificazione e quantificazione RNA	91
○ Valutazione dell'espressione di SR-BI	91
○ Curva di sopravvivenza	92
○ Valutazione dell'espressione genica delle cellule endoteliali isolate da aorta di topo (PCR Array)	92
○ Disegni sperimentali	96
<b><u>Risultati e Discussione</u></b>	
○ Messa a punto del protocollo per l'isolamento delle cellule endoteliali da aorta di topo.	98
○ Caratterizzazione delle cellule endoteliali	99
○ Validazione del metodo.	102
○ Mortalità indotta da LPS	104
○ Profilo di espressione genica delle cellule endoteliali isolate da aorta di topo.	106
<b><u>Bibliografia</u></b>	110

