

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO

Facoltà di Medicina e Chirurgia

Dipartimento di Morfologia Umana e Scienze Biomediche "Città Studi"

Scuola di dottorato in Scienze Morfologiche - XXIV ciclo



**VARIAZIONE MORFOLOGICA E STRUTTURALE LUNGO IL DECORSO  
DELLA PARETE AORTICA UMANA E DI RATTO, CON PARTICOLARE  
RIFERIMENTO ALLA COMPONENTE PROTEOGLICANICA  
ALTAMENTE SOLFORATA DELLA MATRICE EXTRACELLULARE**

Coordinatore: Chiar.ma Prof.ssa Laura VIZZOTTO

Tutor: Chiar.ma Prof.ssa Nicoletta GAGLIANO

Tesi di dottorato di:

Gabriele BERTONI

Matr. n° R08120

Anno Accademico 2010-2011



# INDICE

Riassunto	p. 1
Introduzione	p. 4
Caratteristiche generali delle arterie	p. 5
Aneurisma aortico	p. 6
La matrice extracellulare	p. 9
Note storiche	p. 9
Componenti e funzioni	p. 9
Fibre Collagene	p. 10
Fibre Elastiche	p. 12
Glicoproteine	p. 13
Glicosaminoglicani e Proteoglicani	p. 13
Note storiche	p. 13
Struttura	p. 14
Classificazione	p. 15
Biosintesi e turnover	p. 19
Interazione GAG-lipoproteine	p. 21
Ruolo dei GAG nell'intrappolamento di LPL	p. 22
Scopo dello studio	p. 26
Materiali e metodi	p. 28
Modello sperimentale	p. 29
Allestimento del preparato istologico	p. 30
Fissazione	p. 31
Disidratazione e chiarificazione	p. 32
Infiltrazione	p. 32
Inclusione	p. 33
Taglio	p. 34

Colorazione	p. 35
Colorazione con ematossilina-eosina	p. 35
Colorazione con rosso Sirius	p. 36
Colorazione con orceina	p. 37
Colorazione con Alcian blue	p. 37
Montaggio	p. 38
Osservazione al microscopio ottico	p. 39
Risultati	p. 40
Discussione	p. 48
Conclusioni	p. 55
Bibliografia	p. 57



# **RIASSUNTO**

## RIASSUNTO

Le malattie cardiovascolari sono la principale causa di mortalità nella società occidentale. Tra queste, l'*aneurisma dell'aorta addominale* (AAA) costituisce la 13<sup>a</sup> causa di morte negli USA. Alla base della sua formazione vi è spesso l'aterosclerosi, che porta alla degenerazione delle fibre della matrice extracellulare (ME) e alla distruzione dell'integrità strutturale della parete vasale.

L'aneurisma aortico è una circoscritta e permanente dilatazione dell'aorta per oltre il doppio del suo diametro di origine e presenta una marcata eterogeneità nella suscettibilità individuale ed arteriosa, interessando con frequenza molto maggiore il tratto addominale sottorenale. Questa localizzazione preferenziale era stata attribuita a fattori emodinamici, ma gli studi più recenti hanno riconosciuto l'importanza di fattori anatomici intrinseci della parete arteriosa, dimostrando che l'aorta sopra e sotto diaframmatica differiscono per struttura, composizione e proprietà meccaniche, biochimiche e metaboliche.

Il nostro studio rappresenta il tentativo di verificare se differenze nella composizione della ME della parete vasale giochino un ruolo nel determinare la diversa suscettibilità dei vari distretti aortici allo sviluppo di aneurisma. A tale scopo, campioni di aorta umana non patologica sono stati prelevati a livello di cinque distinti tratti (aorta ascendente, toracica discendente, sopraceliaca, infraceliaca, addominale sottorenale) e sottoposti ad analisi morfologica. Le stesse valutazioni sono state effettuate su aorte di ratto al fine di validare un modello animale che offra campioni di più facile reperibilità, su cui realizzare le ricerche future.

I campioni sono stati fissati in formalina al 4%, disidratati con scale crescenti di alcool, chiarificati in xilolo e inclusi in paraffina. Si è quindi proceduto al taglio delle sezioni al microtomo, poi colorate con ematossilina-eosina, rosso Sirius, orceina ed Alcian blue a pH 2,5, a pH 1 e a pH 0,2, ed osservate al microscopio ottico.

Le specifiche colorazioni hanno rivelato come la parete aortica vari lungo le diverse regioni: nei tratti prossimali contiene una maggiore quantità di cellule e fibre elastiche e collagene ben distribuite ed organizzate, mentre nel tratto sottorenale accoglie un minor numero di cellule e fibre disposte disordinatamente. A livello addominale i risultati ottenuti confermano i dati presenti in letteratura, evidenziando un aumento del collagene e una diminuzione dell'elastina nella tonaca media; abbiamo osservato, inoltre, un netto incremento della frazione di proteoglicani (PGs) altamente solforati rispetto alla totalità dei PGs. I risultati ottenuti dall'analisi delle sezioni di aorta ratto hanno confermato i dati ottenuti precedentemente nell'uomo.

Sono comunque necessari ulteriori studi per poter stabilire se le differenze inerenti all'organizzazione e al contenuto delle componenti fondamentali della ME giochino effettivamente un ruolo nella formazione di aneurismi dell'aorta.

# **INTRODUZIONE**

# INTRODUZIONE

## Caratteri generali e struttura delle arterie

Le arterie sono organi dinamici, capaci di contrarsi e dilatarsi in risposta alle necessità dell'organismo. Le caratteristiche intrinseche della parete variano in base alla loro dimensione, localizzazione e funzione. In base alle caratteristiche strutturali, le arterie possono essere classificate in *arterie di grosso calibro (o elastiche)*, *arterie di medio calibro (o muscolari)* e *arterie di piccolo calibro (o arteriole)*. Esistono graduali passaggi da un tipo di arteria all'altro e si possono così individuare anche arterie di tipo misto, con caratteristiche intermedie tra le differenti tipologie vasali (1).

La parete delle arterie è costituita da tre strati concentrici sovrapposti (*tonache*) denominati, procedendo dal lume verso l'esterno: *tonaca intima*, *tonaca media*, e *tonaca avventizia*. La **tonaca intima** include il rivestimento endoteliale che delimita il lume, formato da un unico strato di cellule appiattite di contorno variabile e il sottile strato di connettivo sottoendoteliale, contenente una quota variabile di fibre elastiche. Funge da rivestimento protettivo e assicura la regolazione del trasporto di materiale tra il sangue e i tessuti. La **tonaca media**, in genere la più spessa e variabile, caratterizza il tipo strutturale e il comportamento funzionale delle arterie. È costituita da fibre elastiche e fasci concentrici di muscolatura liscia immersi in una rete di tessuto connettivo lasso e connessa alle tonache adiacenti mediante fibre collagene. E' delimitata internamente ed esternamente da uno strato di lamine elastiche fenestrate: la *membrana elastica interna*, densa e spessa, la separa dall'intima e la *membrana elastica esterna*, sottile e discontinua, la separa dall'avventizia. Ha lo scopo di conferire al vaso l'adeguata elasticità (prevalente nelle arterie di grosso calibro) e contrattilità (predominante nelle arterie di piccolo e medio calibro) (1). La **tonaca avventizia** è costituita da tessuto connettivo lasso.

L'aorta è la più grande e importante arteria del nostro corpo e dà origine lungo il suo decorso a tutti i rami della circolazione sistemica, che distribuiscono il sangue ossigenato a organi e tessuti periferici. Nasce come *aorta ascendente* dal ventricolo sinistro del cuore a livello della valvola aortica, con un diametro di circa 3 cm; si ripiega poi all'indietro e verso sinistra formando l'*arco aortico*, da cui si staccano le arterie anonima, carotide comune sinistra e succlavia sinistra. Successivamente discende lungo la colonna vertebrale continuandosi nell'*aorta toracica*, e infine, dopo il passaggio attraverso lo jatus diaframmatico, prende il nome di *aorta addominale* (2).

### **Aneurisma aortico**

Si definisce "*aneurisma*" la circoscritta e permanente dilatazione di un vaso per oltre il doppio del suo diametro di origine, e la sua formazione viene attribuita alla distruzione dell'integrità strutturale della parete vasale, conseguente a rimodellamento della matrice extracellulare (ME) e assottigliamento della tonaca media, con frammentazione dell'elastina e perdita di cellule muscolari lisce (SMCs) (3-5).

L'aneurisma dell'aorta presenta una marcata eterogeneità nella suscettibilità sia individuale che arteriosa, con differenze, rispettivamente, tra individui con fattori di rischio simili e fra segmenti arteriosi dello stesso individuo. Infatti, benché un aneurisma possa svilupparsi a qualsiasi livello dell'aorta, si riscontra con frequenza molto maggiore nel tratto addominale, generalmente al di sotto delle arterie renali, mentre nel tratto toracico risulta relativamente raro (6). La causa più frequente alla base della formazione di un aneurisma è l'aterosclerosi.

L'aterosclerosi è un processo infiammatorio cronico della parete arteriosa che coinvolge la deposizione di lipidi, l'infiltrazione di cellule infiammatorie dal torrente circolatorio nell'interstizio, l'elevata produzione di collagene e la proliferazione di cellule muscolari lisce (7, 8), compromettendone la normale architettura e l'integrità strutturale (9). Lesioni

aterosclerotiche avanzate, caratterizzate da un'ampia distruzione delle fibre della ME e della struttura intimale, sono spesso associate alla formazione di aneurisma dell'aorta addominale (10).

L'aneurisma dell'aorta addominale (AAA) è generalmente asintomatico. Esso evolve espandendosi progressivamente, e può rimanere misconosciuto fino alla rottura. Questa evenienza ha un tasso di mortalità superiore all'80% (11).

La localizzazione preferenziale dell'aneurisma è stata attribuita in passato a turbolenze di flusso ed alterazioni nello stress parietale (12). Più recenti pubblicazioni hanno invece riconosciuto l'importanza di fattori anatomici intrinseci della parete arteriosa nel determinare questa differenziale predisposizione. Studi fisiopatologici hanno dimostrato, infatti, che tra l'aorta sopra e sotto diaframmatica esistono differenze nelle proprietà meccaniche, biochimiche e metaboliche, nel profilo proteolitico, nella suscettibilità alla deposizione di lipidi e nei pathways di signaling cellulare (13, 14). Questa eterogeneità tra le regioni aortiche è presente già durante l'embriogenesi (15).

La localizzazione di lesioni aterosclerotiche (e di aneurismi) nel distretto sottorenale è stata attribuita in passato a fattori emodinamici e stress di parete. Considerando l'aorta nel suo complesso, come organo, sono emerse alcune differenze anatomiche e strutturali che hanno contribuito a meglio comprendere il meccanismo di formazione degli aneurismi.

Sebbene la ricerca scientifica stia facendo progressi importanti, ancora non siamo in grado di poter identificare un elemento indispensabile allo sviluppo della placca aterosclerotica. Neppure lo studio di quei fattori ritenuti cruciali ci consente di arrivare ad una definizione di "rischio" che abbia un riscontro scientifico. La limitata abilità nel predire lo sviluppo della malattia clinica basandosi sullo studio dei fattori di rischio indica che la nostra conoscenza sulla suscettibilità individuale agli stimoli aterogenici è ancora inadeguata (16-18).

Questa suscettibilità, inoltre, differisce non solo fra individui con fattori di rischio simili (suscettibilità individuale), ma anche fra diversi intervalli arteriosi dallo stesso individuo

(susceptibilità arteriosa). Per esempio, mentre la carotide interna e le arterie coronarie dimostrano una marcata suscettibilità allo sviluppo di aterosclerosi, l'arteria toracica interna e le arterie ulnari distali sembrano marcatamente resistenti, nonostante formino di solito iperplasia intimale (19-26). Negli esseri umani, le lesioni aterosclerotiche si sviluppano in luoghi soggetti a iperplasia intimale o ispessimenti intimali, e tali lesioni sono considerate precorritrici per aterosclerosi (22, 24). Uno *shear stress* alterato distalmente ai punti di biforcazione di rami arteriosi è probabile che sia responsabile della formazione di molta dell'iperplasia intimale del sistema vascolare umano, e tali stress di parete sono una spiegazione plausibile per il caratteristico aspetto eccentrico dell'iperplasia intimale in questi siti (22, 26). Non c'è ancora comunque sufficiente chiarezza sul perché tale iperplasia intimale progredisca fino ad aterosclerosi ad alcuni siti, ma non altri, nel sistema vascolare.

# LA MATRICE EXTRACELLULARE

## **Note storiche**

La matrice extracellulare (ME) è un'entità strutturale complessa che circonda e sostiene le cellule nei tessuti. Sotto una varietà di altri nomi, precedette la scoperta delle cellule di secoli, se non migliaia di anni. Prima della "teoria cellulare", la "teoria della fibra" (ca. 1700) riteneva che tessuti ed organi fossero composti di fibre che in qualche modo erano vive e quella vita sorse da generazione spontanea. Non è prima della metà del 1800 che le osservazioni di molti istologi contribuirono a costituire la teoria cellulare. Rudolf Virchow, è forse più conosciuto per la sua teoria *Omnis cellula e cellula* ("ogni cellula origina da un'altra cellula esistente e simile") che pubblicò nel 1858. Egli affermava che cellule originano solamente da altre cellule, un concetto rivoluzionario a quel tempo, e suggeriva che sostanze intercellulari erano prodotte dalle cellule. Alla fine del XIX secolo, al microscopio ottico fu possibile vedere che lo spazio intercellulare conteneva fibre, soprattutto collagene, ma anche elastina in alcuni tessuti, ed un sfondo omogeneo a cui ci si riferiva a come "sostanza amorfa" (grundsubstanz). Fu solamente quando varie macromolecole cominciarono ad essere caratterizzate negli anni trenta da metodi chimici e fisicochimici che il termine di "matrice extracellulare" è entrata in uso.

## **COMPONENTI e FUNZIONI**

La ME determina le caratteristiche fisiche di tessuti e molti delle proprietà biologiche delle cellule immerse in essa. I componenti principali della ME sono proteine fibrose che offrono resistenza alla trazione (vari tipi di collagene ed elastina), immerse nella sostanza fondamentale contenente proteine di matrice multi-adesive (fibronectina, laminina, e tenascina) che legano le cellule ai diversi componenti della ME, e glicosaminoglicani

(GAGs) e proteoglicani (PGs) che sono largamente responsabili per il volume della ME. I GAGs e i PGs costituiscono un gel acquoso che resiste a forze compressive e permette la diffusione di piccole molecole e macromolecole tra cellule e tessuti. Fra i GAGs, un importante componente della matrice è l'acido ialuronico, un grande polisaccaride che forma un gel estremamente acquoso rendendo la matrice elastica alla compressione. Combinazioni diverse di questi componenti conferiscono forza della ME per gli scopi più diversi. La ME non dovrebbe essere vista solo in termini di forza ed appoggio fisico per tessuti ed organismi, dal momento che questa matrice esercita influenze profonde sulle cellule che vi si trovano immerse. La ME è un serbatoio per una larga serie di biomolecole come fattori di crescita, enzimi, citochine ed ormoni. Inoltre, comunica direttamente o indirettamente con le vie di segnalazione intracellulari che spingono una cellula ad eseguire specifiche funzioni. La matrice offre anche una maglia attraverso la quale possono muoversi le cellule.

## **Fibre collagene**

I collagene, ogni molecola dei quali consiste di tre catene di polipeptidi chiamati "catena  $\alpha$ ", costituiscono la famiglia di proteine che è il costituente principale di ME. Sono noti 106 geni che codificano per collagene a tripla elica (27). Ad oggi, basandosi sulla composizione di queste catene  $\alpha$ , 25 tipi di collagene sono stati differenziati. Tredici tipi di collagene sono presenti nella parete vascolare dove aiutano a mantenere l'integrità strutturale della parete, migliorandone la flessibilità, e inoltre giocando un ruolo in vari eventi cellulari incluse la differenziazione, adesione, migrazione, proliferazione, e l'apoptosi (28). Il contenuto di collagene aumenta parallelamente con la formazione della placca aterosclerotica e la sua progressione, e nelle cosiddette placche "ricche di collagene" rende conto del 60% del contenuto totale di proteine (29). Il collagene di tipo I rappresenta il 70% collagene del collagene totale, e l'analisi immunostochimica della

distribuzione dei singoli tipi di collagene all'interno della placca offre informazioni estremamente interessanti (30). Entrambi i collagene di tipo I e III, che sono fibrillari, sono distribuiti insieme in tutte le placche, mentre il collagene di tipo V mostra un aumento con la progressione della lesione. Il collagene di tipo I e III sono rispettivamente rigido ed elastico, mentre il collagene di tipo V, quando abbondante, forma fibre sottili (31). In questo caso le fibre di collagene, con il tipo I come base, alterando la proporzione di tipi III e V possono soddisfare le varie richieste funzionali. Il collagene di tipo IV, che è il costituente principale della membrana basale, aumenta parimenti con il procedere della lesione. Le cellule muscolari lisce della tonaca media e di lesioni aterosclerotiche precoci sono circondate da uno strato relativamente sottile di collagene di tipo IV, mentre in lesioni avanzate, SMCs sono circondate da uno spesso strato di collagene IV, arrivando ad uno spessore circa 10 volte maggiore di quello del corpo della cellula (29). L'ispessimento della membrana basale riflette un calo nella capacità proliferativa della cellula e può essere preso come un indice dell'invecchiamento. Questi collagene hanno un ruolo anche nella deposizione delle lipoproteine, con le LDL ossidate che legano in special modo e con grande affinità i collagene di tipo I, V, III, ed IV, in ordine decrescente (32). Il collagene di tipo VI è anche inevitabilmente presente a livello di ispessimenti intimali, insieme a molecole di adesione cellulare, legandosi a collagene di tipo VI e di tipo III e alla membrana basale, il collagene di tipo IV contribuisce all'integrità strutturale della placca. Inoltre, anche se questo collagene è degradato dalle elastasi dei neutrofili umani (33), mostra una resistenza a vari enzimi di degradazione della matrice rilasciati da cellule come le cellule muscolari lisce e macrofagi, e così gioca un ruolo vitale nel rafforzamento e nella stabilizzazione della placca.

Il collagene di tipo VIII assume una struttura di grata esagonale, e migliora l'elasticità della placca stabilizzandone la struttura e legando fibre elastiche (28). La deposizione di

ciascun tipo di collagene cambia con il progredire della lesione, riflettendo in questo il l'attività metabolica delle SMCs.

Il metabolismo del collagene da parte delle cellule muscolari lisce è regolato principalmente da fattori di crescita e citochine. Per esempio, il transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) stimola la sintesi dei tipi I, III, IV e V di collagene (34, 35), mentre, al contrario, l'interleuchina (IL)-1 (35), il fattore di necrosi tumorale (TNF)- $\alpha$  (36) e l'interferone (INF)- $\gamma$  (34) sopprimono la sintesi di collagene. Inoltre, il fattore di crescita di derivazione piastrinica (PDGF) stimola la sintesi dei tipi V e VIII di collagene, mentre inibisce quella del collagene di tipo IV (28, 37). In questo modo, ogni collagene aumenta in parallelo con l'evoluzione della lesione, mentre una abbondante degradazione di collagene avviene nel centro lipidico. L'apoptosi cellulare, e la degradazione di elastina in concerto con la deposizione di lipidi porta ad un indebolimento e alla fragilità della placca.

### **Fibre elastiche**

Le fibre elastiche sono costituite da elastina, una proteina strutturale, e da fibrillina, una proteina fibrillare. Esse sono depositate in grande numero nella placca aterosclerotica, rendendola elastica e deformabile, ma diminuiscono in parallelo con la deposizione di lipidi. Le fibre elastiche divengono il luogo della deposizione di calcio e lipidi, ove questi ultimi danno luogo ad una ridotta elasticità e all'aumento della suscettibilità di azione da parte di enzimi degradanti l'elastina. Le cellule muscolari lisce all'interno della placca producono elastina, anche se recentemente è stato riportato che i macrofagi all'interno della placca esprimono sia l'mRNA del precursore solubile dell'elastina che la proteina finita (38). Il metabolismo dell'elastina delle cellule muscolari lisce è regolato da fattori di crescita e citochine, come per esempio il TGF- $\beta$  (39) e il fattore di crescita insulino-simile (IGF)-1 (40) che promuovono la sintesi di elastina, ed il fattore di crescita epidermico (EGF) (41) che la inibisce.

## **Glicoproteine**

Oltre a glicoproteine come la laminina e l'entactina/nidogeno, che costituiscono la membrana basale nella placca, sono presenti anche la fibronectina, la trombospondina, la vitronectina, la tenascina, e l'osteopontina.

La fibronectina è una glicoproteina adesiva che possiede l'abilità di legarsi a varie altre macromolecole, incluso il collagene, l'eparina e l'eparan-solfato, e la fibrina, così come a cellule, e influenza la proliferazione, la morfologia, la migrazione e la differenziazione delle cellule muscolari lisce (42).

La trombospondina-1 è un glicoproteina prodotta da varie cellule, incluse le piastrine, cellule endoteliali, SMCs, e macrofagi. Essa promuove la proliferazione e la migrazione di cellule muscolari lisce (43), e possiede una latente azione di attivazione del TGF- $\beta$  (44).

La trombospondina-5 è localizzata intorno alle cellule muscolari lisce ed esercita una azione che ne promuove la migrazione (43).

Anche la vitronectina promuove la migrazione delle cellule muscolari lisce mediante l'interposizione delle subunità collageniche  $\alpha V\beta 3$  e  $\alpha V\beta 5$  (45). L'osteopontina ha una forte affinità per il collagene, e allo stesso modo promuove la migrazione di SMCs (46). Recentemente, è stato riportato che l'osteopontina possa accelerare la formazione di *fatty streak* in topi alimentati con una dieta ricca di colesterolo (47), suggerendo la sua importanza nella formazione della placca aterosclerotica.

## **Glicosaminoglicani e Proteoglicani**

### ***Note storiche***

Lo studio dei PGs risale al 1861, quando il condroitin solfato (CS) fu isolato dalla cartilagine. Dal 1930 al 1950, grande progresso fu fatto nell'analizzare la chimica dei polisaccaridi di queste preparazioni (note anche come "mucopolisaccaridi"), principalmente da Karl Meyer e colleghi che descrissero la struttura dell'acido ialuronico,

del dermatan solfato (DS), del keratan solfato (KS), e forme isomeriche diverse di CS. Nel 1948, Jorpes e Gardell descrissero la struttura chimica dell'eparina e del heparan solfato (HS). Questi polisaccaridi infine vennero chiamati glicosaminoglicani (GAG), ad indicare la presenza di amino zuccheri e altri zuccheri in forma polimerica. Nel 1958, Helen Muir offrì la prima evidenza di un'associazione covalente tra GAGs e proteine. Nel 1966, Rodén e Lindahl stabilirono la struttura del core proteico del GAG. Questi studi strutturali segnarono la traccia per gli studi biosintetici che seguirono.

### Struttura

I PGs sono macromolecole caratterizzate dalla presenza di una, o più, lunghe catene zuccherine non ramificate ed estremamente polianioniche chiamate GAG che sono covalentemente legate ad una proteina centrale attraverso una regione di collegamento (Figura 1).

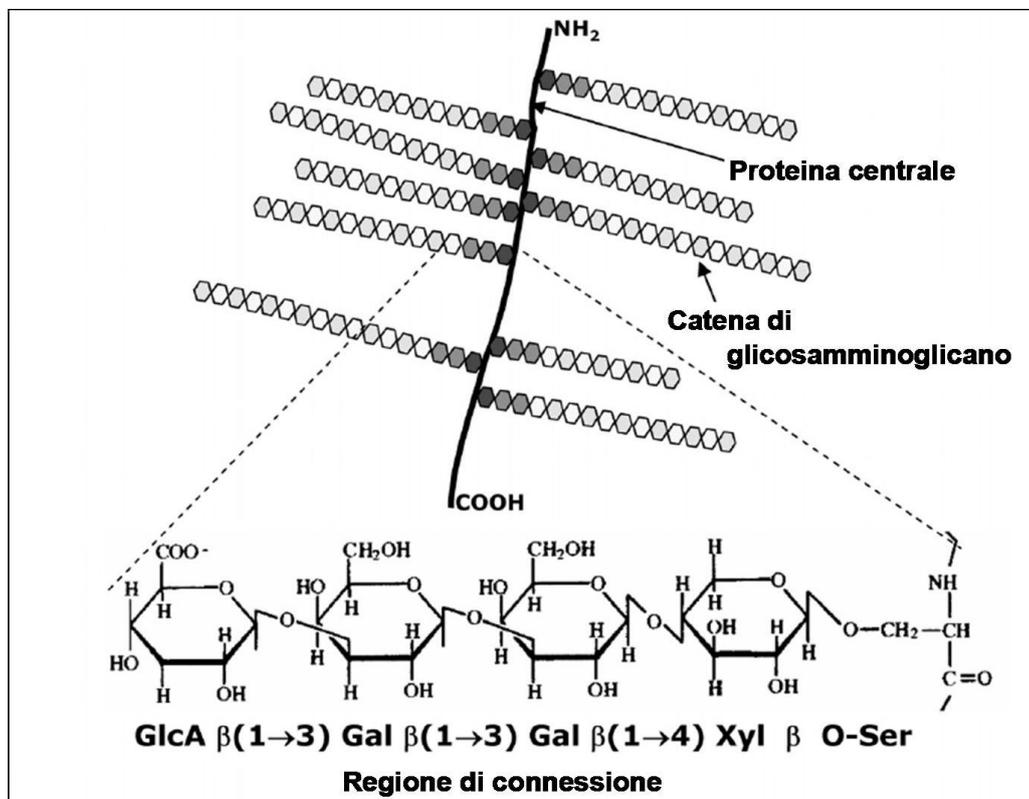


Figura 1: Modello della struttura fondamentale di un proteoglicano.

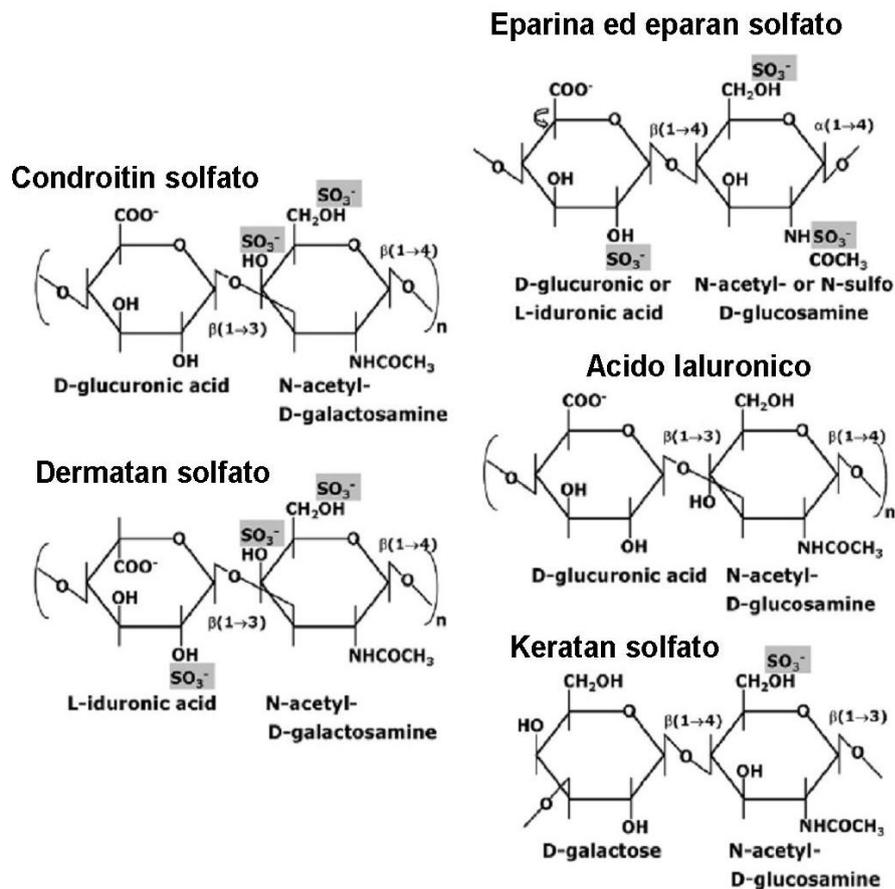
L'unità ripetitiva del GAG consiste di un amino-zucchero, o N-acetile-glucosamina (GlcNAc) oppure N-acetylgalattosamina (GalNAc); ed un acido hexuronico, o l'acido glucuronico (GlcA) oppure l'acido iduronico (IdoA). Uno o entrambi gli zuccheri nell'unità ripetitiva contiene uno o più gruppi solfato. Questa struttura di base del PG è stata ritrovata diffusamente fra vertebrati ed invertebrati, suggerendo il loro ruolo in funzioni essenziali nella fisiologia animale (48). Oltre alle catene di GAG, più proteine centrali contengono oligosaccaridi N – e/o O-collegati, simili a quelli presenti in altre glicoproteine (49, 50). Questi oligosaccaridi sono molto più corti dei GAG (una catena di GAG di 20-kD contiene ~80 residui di zucchero, mentre un tipico N-oligosaccaride binario può contenere 10–12 residui).

### ***Classificazione***

I PGs sono un gruppo molto eterogeneo di macromolecole. Anche un solo tipo di proteina centrale può variare grandemente nel numero e tipo di catene di GAG attaccate. La lunghezza delle catene è variabile e la sistemazione di residui solforati lungo le catene differisce.

Quattro classi principali di GAG sono distinte secondo la struttura dell'unità di disaccaride che ripete: 1) CS e DS; 2) HS ed eparina; 3) l'acido ialuronico; e 4) KS (Figura 2).

L'acido ialuronico è il più semplice di tutti i GAG. In contrasto con tutti gli altri, non contiene zuccheri solforati, tutte le sue unità disaccaridiche sono identiche, la lunghezza della sua catena è enorme (migliaia di monomeri di zucchero), e non è collegato covalentemente a nessuna proteina centrale (51). I KS è una catena di polilattosamine solforata identica a quelle trovate nelle glicoproteine convenzionali e nelle mucine. Il loro collegamento alla proteina centrale distingue due tipi di KS: KS I, originalmente descritto nella cornea è N-collegato a residui di asparagine nella proteina centrale, mentre KS II o cartilagineo, è O-collegato a serine o residui di treonina (52).



**Figura 2:** Struttura dei glicosamminoglicani.

I PGs possono essere classificati secondo molti parametri: (1) dalla catena di GAG (PGs che contengono CS/DS o HS), (2) dalla distribuzione topografica rispetto alla cellula (PGs extracellulari e della membrana basale, PGs associati alla cellula o intracellulari), e (3) all'omologia della proteina centrale (hyalectani, piccoli PGs ricchi di leucine (SLRPs), sindecani, glipicani e altri).

## Proteoglicani di Condroitin/Dermatan solfato

Il Versicano appartiene alla famiglia dei PGs capaci di legare l'acido ialuronico che include aggrecano, neurocano e brevicano, costituendo un famiglia chiamata collettivamente *hyalectans* (53, 54). Ogni membro di famiglia ha una distribuzione caratteristica, con

aggrecono prominente nella cartilagine, neurocano e brevicano prominenti nel sistema nervoso centrale, e versicano presente in una molteplicità di tessuti molli. Le caratteristiche amino- e carbossi-terminale del versicano, insieme ai GAG legati alla porzione media della proteina centrale, fanno di versicano una molecola estremamente interattiva e versatile, e questa è all'origine del suo nome (55).

Decorina e biglicano sono membri di una famiglia derivata da un gene separato, le SLRPs. La famiglia comprende almeno nove membri raggruppati in tre classi (I, II ed III) e sottofamiglie diverse, e sono tutti caratterizzati dalla presenza di un dominio centrale che contiene sequenze ricche di leucina che realizzano interazioni proteiche forti. Decorina e biglicano, in classe I, mostrano la più alta omologia amminoacidica della famiglia (~57%) e sono gli unici SLRPs con un propeptide. Il propeptide è estremamente conservato nelle specie e può funzionare come sequenza di riconoscimento per la xylosyltransferasi, il primo enzima coinvolto nella sintesi della catena di GAG. Questi due SLRPs contengono catene laterali di CS legato al dominio amino-terminale della proteina centrale (uno nella decorina e due nel biglicano) che sono caratterizzati da epimerizzazione di alcuni dei residui glucuronici a gruppi idronilici (56).

Versicano, decorina e biglicano sono i PGs CS/DS più rappresentati nella matrice della parete arteriosa dei mammiferi (57). La proteina centrale del Versicano V0 (370 kDa) è circa 10 volte quella di decorina (36 kDa) o biglicano (38 kDa). Le catene laterali mostrano una ampia serie di dimensioni, ma generalmente la media si aggira sui 40-90 kDa ciascuno.

## **Proteoglicani di Heparan solfato**

Cinque classi distinte di HSPGs rendono conto nei mammiferi per almeno il 95% dei HS di superficie cellulare, membrane basali ed ME. I HSPGs cellula-associati includono quattro sindecani integrati nella membrana e sei glicoproteine ancorate a glycosyl-phosphatidylinositoli

(GPI). I tre HSPGs pericellulari includono perlecano, agrin ed l'ibrido HSPG/collagene tipo XVIII. Anche se non collegati direttamente con la membrana plasmatica, questi PGs sono chiamati pericellulari piuttosto che extracellulari a causa della loro stretta associazione con la membrana plasmatica via integrine (58).

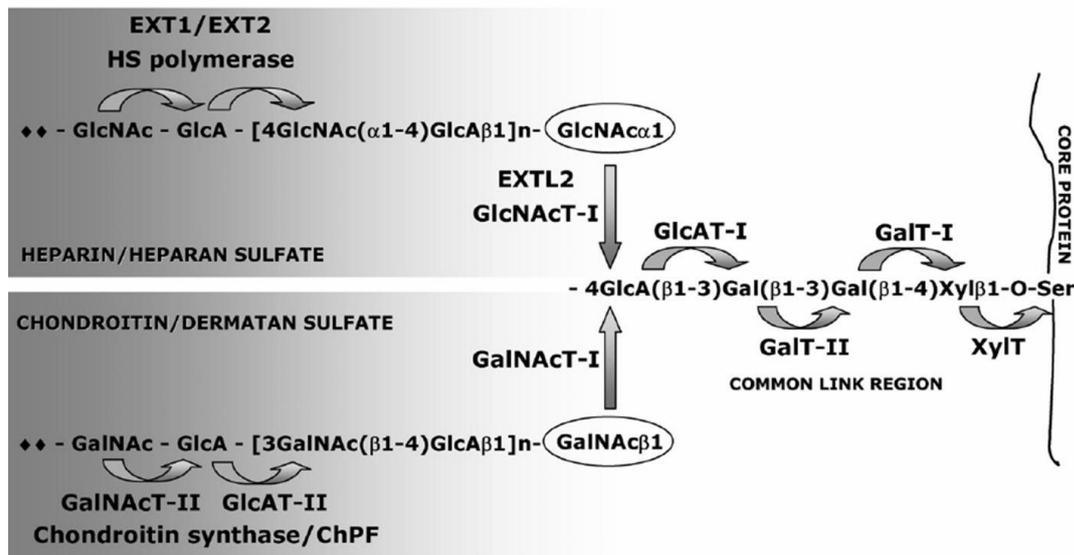
I sindecani sono una famiglia di PGs che consiste di una proteina centrale transmembrane di tipo I che tiene le catene di HS distanti dalla membrana plasmatica, e a volte le catene di CS vicino la membrana. Tutte le cellule nucleate esprimono uno o più membri di questa famiglia. Il Sindecano-1 è il sindecano più rappresentato a livello di cellule epiteliali incluso l'endotelio vascolare, sindecano-2 è soprattutto presente nelle cellule mesenchimali, neuronali e cellule muscolari lisce (SMCs), sindecano-3 è il sindecano maggiormente espresso nel sistema nervoso, mentre sindecano-4 è ubiquitario, ma a livelli più bassi degli altri sindecani. Ogni sindecano ha un dominio citoplasmatico corto, un dominio transmembrana (TM), ed un dominio extracellulare con siti di legame per tre - cinque catene di GAG. Le proteine centrali variano in dimensioni da 20 a 45 kDa. Anche se i loro domini extracellulari sono estremamente differenti a parte per le regioni che legano i GAG, il TM è estremamente conservato e ha un ruolo cruciale nella oligomerizzazione (59, 60). Il perlecano è un HSPG modulare che è espresso in quasi tutte membrane basali così come organi mesenchimali e tessuti connettivi, ed è uno dei più grandi polipeptidi a singola catena trovato nei vertebrati ed invertebrati. I cinque moduli di perlecano e le sue catene di HS possono prendere parte in un gran numero di interazioni molecolari come con il fattore di crescita dei fibroblasti (FGF)-2, il fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF), il fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF), e altre proteine di matrice. La proteina centrale del perlecano umano è ~470 kDa e, insieme con numerosi oligosaccaridi O-linked e fino a quattro catene di HS (tre nel dominio I e potenzialmente una catena nel dominio V), può giungere ad un peso molecolare di più di 800 kDa (61, 62).

## Biosintesi e turnover

La cellula incamera i costituenti fondamentali per la sintesi di GAG, monosaccaridi e gruppi solfato, attraverso trasportatori specializzati nella membrana plasmatica. Zuccheri e solfato sono attivati poi attraverso il consumo di un nucleotide nel citosol per formare uridindifosfato (UDP)-zuccheri e 3'-fosfoadenosina 5'-fosfosolfato (PAPS), rispettivamente, che vengono quindi traslocati nel reticolo endoplasmatico (ER) ed apparato di Golgi da specifici trasportatori (63, 64).

I GAGs sono costruiti sulla cosiddetta regione tetrasaccaridica di collegamento,  $\text{GlcA}\beta\text{1-3Gal}\beta\text{1-3Gal}\beta\text{1-4Xyl}\beta\text{1-O -}$ , attaccato agli specifici residui di serina delle proteine centrali mentre queste aderiscono alla superficie interna delle vescicole del ER/Golgi. La sintesi di questa regione è iniziata dalla somma di xylosio (Xyl) a serina nell'ER, seguito dalla somma di due residui di galattosio (Gal) ed il primo residuo di GlcA dallo specifico enzima glycosyl-transferasi nelle prime regioni cis/mediali del Golgi. La prima hexosamina trasferita (cioè sul quinto residuo) è critica nel determinare se catene di CS/DS o di eparina/HS saranno assemblate in modo specifico. Il condroitin/dermatan solfato si sintetizza quando GalNAc è trasferito alla regione di collegamento comune, mentre eparina/HS è formato se è aggiunto GlcNAc (Figura 3) (63, 64).

La solforilazione del polimero di condroitina ad opera della specifica sulfotransferasi avviene via via che il polimero è formato. Condroitin 6-sulfotransferase (C6ST) (65, 66) e condroitin 4-sulfotransferase (C4ST) (67) catalizzano la solforilazione in posizione 6 e 4 dei residui di GalNAc di condroitina.



**Figura 3:** Biosintesi della catena di GAG (adattata da (64)).

Proteinasi extracellulari di diverse famiglie, principalmente il metallo -, serine -, e cisteine - proteinasi possono degradare la proteina centrale dei PGs. Le metalloproteinasi della matrice (MMPs) sono attive a pH neutro e possono catalizzare perciò il normale turnover delle macromolecole di ME come il collagene interstiziale e della membrana basale, proteine accessorie della ME come fibronectina, e proteoglicani (68). MMP-1, -2, -3, -7 e -9 sono coinvolte nello smantellamento di versicano (69-71) . MMP-2, -3 e -7 clivano la decorina e MMP-3 e -13 il perlecano (72). Le attività proteolitiche delle MMPs sono accuratamente controllate durante l'attivazione dai loro precursori e sono inibite da inibitori endogeni, i *tissue inhibitors of metalloproteinases* (TIMPs) (73).

La famiglia delle MMP include l'ADAMTS extracellulare (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motif) (68). Un'importante differenza tra ADAMTSs e MMPs è l'abilità di molti ADAMTSs, ad esempio ADAMTS-1, -4 e -9, di legarsi all'ME (74).

ADAMTS-1, -4 -5 e -9 sono possono clivare il versicano nativo o substrati di di versicano (75-78). Così come le MMPs, i membri di ADAMTS possono essere inibiti da TIMPs. La

plasmina è stato dimostrato in vitro di poter degradare versicano (79), e perlecan prodotto dalla cellula endoteliale (80). Anche le catepsine sono coinvolte nella degradazione di PGs (81-84).

Oltre al clivaggio proteolitico della proteina centrale, le catene di GAG possono anche essere digerite enzimaticamente. Endoglicosidasi generalmente iniziano il processo di degradazione dei GAG. Gli oligosaccaridi rilasciati, lunghi 10–20 residui di zucchero, sono poi il substrato per le solfatasi che rimuovono i gruppi solfato, che è essenziale per il substrato delle esoglicosidasi (85). La regione di collegamento della proteina centrale dei GAG può essere degradata anche da endo- $\beta$ -xylosidase ed endo- $\beta$ -galactosidase. Una sola eparinasi mammifera sembra essere responsabile della digestione delle catene di HS (86-89). L'eparinasi è soprattutto un enzima intracellulare lisosomiale, responsabile per la degradazione di HSPGs cellulari interiorizzati (90).

## **Interazione GAG-lipoproteine**

Anche se la proteina centrale dei PG può essa stessa esporre siti vincolanti per uno specifico ligando, la struttura chimica e raffinata di GAG definisce la maggior parte delle proprietà di legame dei PG, che sono molto diverse, conducendo ad uno specifico riconoscimento di ligando. Inoltre, molti GAGs all'interno di una sola molecola di PG determinano un gran numero di siti di legame ad alta-capacità e bassa-affinità, trasformando i PGs in serbatoi extracellulari dei loro ligandi. Gruppi solfato e carbossilici conferiscono alle catene di GAG una carica estremamente negativa. I GAGs sono le più molecole più anioniche prodotte dalla cellula animale. Questa proprietà permette loro di interagire con le varie regioni caricate positivamente in molte molecole proteiche, come componenti della cascata della coagulazione, fattori di crescita, enzimi, citochine ed apolipoproteine che mettono in mostra sequenze positive nella loro superficie (91-95).

## **Ruolo dei CSPG nell'intrappolamento di LPL**

Molte ipotesi sono state proposte per giustificare l'inizio dell'aterosclerosi negli ultimi 150 anni. La “*response-to-injury hypothesis*” (96), affermava che la lesione endoteliale conduce ad una risposta infiammatoria come parte di un processo di guarigione della parete arteriosa. I primi dati sperimentali che mettevano in correlazione la riparazione arteriosa e l'aterosclerosi dopo una lesione meccanica fu riportata da Bondjers e Bjorkerud (97-103).

La “*response-to-oxidation hypothesis*” (104) propone nell'ossidazione di lipoproteine il fattore di collegamento con l'aterosclerosi. Il lavoro pionieristico di Mogen Faber (105) nel 1949 dimostrò che l'interazione tra lipoproteine ricche in colesterolo e i mucopolisaccaridi di CS si associavano allo sviluppo di lesioni nelle arterie umane. Gero *et al.* (106) and Hollander *et al.* (107) aggiunsero evidenza sperimentale in favore dell'importanza dei mucopolisaccaridi dell'intima come quegli agenti che contribuiscono a trattenere lipoproteine a bassa densità (LDL) e a sviluppare la lesione. Nel 1980, Camejo e Lalaguna (108) identificarono il principali PG contenenti CS che contribuiscono alla formazione di complessi nelle arterie umane. Questo iniziale lavoro fu estesamente ampliato nel 1982 (109).

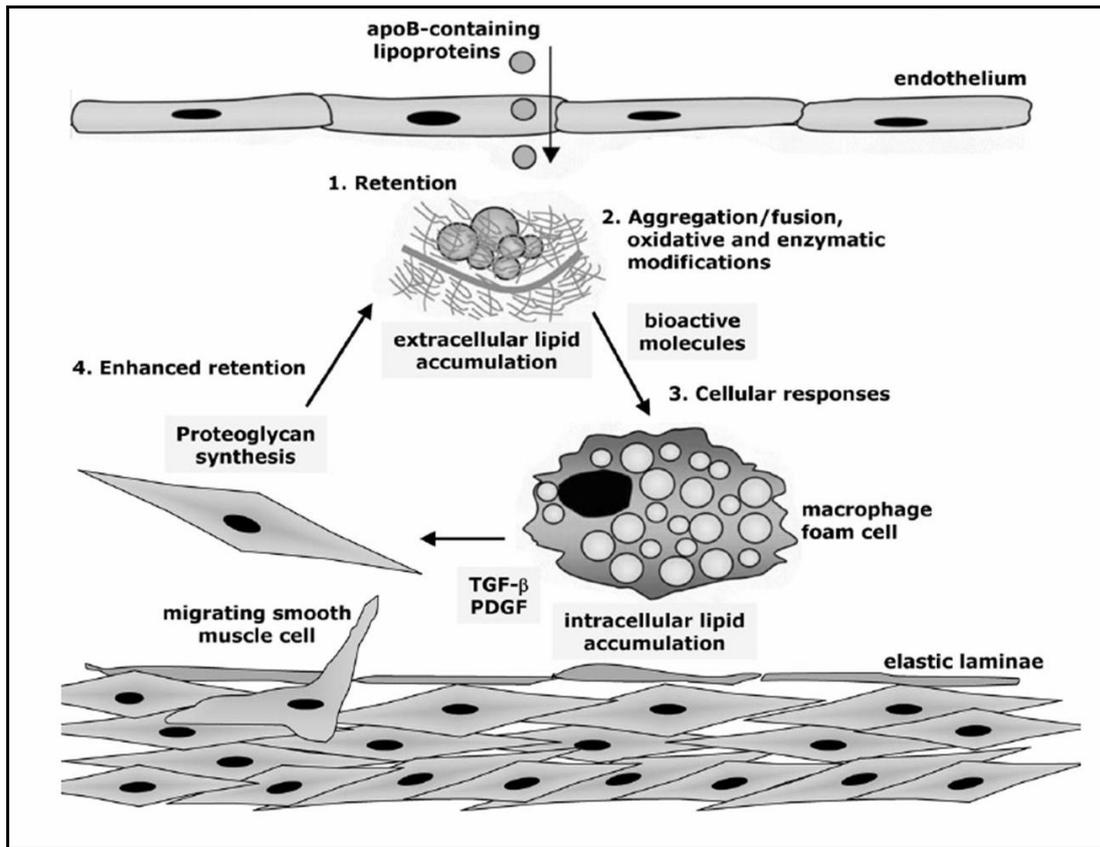
Nel 1995, Williams e Tabas (110) suggerirono che l'intrappolamento subendoteliale di lipoproteine ricche di colesterolo all'interno della parete arteriosa è il primo passo dell'aterogenesi, che conduce all'ossidazione, infiammazione, e disfunzione endoteliale, in sintonia con le ipotesi precedenti (96, 104). Questi concetti sono noti con il nome di “*response-to-retention hypothesis*”. L'ipotesi si indirizza sul meccanismo che collega i lipidi circolanti nel sangue e la malattia trovate nel 1913 da Anitschkow e Chalator nel loro modello di aterosclerosi di coniglio con dieta arricchita di colesterolo (111).

Le lipoproteine fluiscono normalmente attraverso la parete arteriosa. La ritenuta di lipoproteine da parte di CSPGs nello spazio dell'intima determina la concentrazione di

lipoproteine nella parete arteriosa. L'interazione tra lipoproteine e PGs comporta un'interazione ionica tra aminoacidi basici dell'apoB100 ed i gruppi di solfato sulle catene di GAG carichi negativamente (91, 112). Prima della comparsa delle lesioni, le regioni arteriose prone a sviluppare lesioni mostrano un aumento della ritenzione di lipoproteina (113, 114), e CSPGs purificati da questi siti dimostrano una aumentata affinità di legame per lipoproteine aterogeniche (115). Diverse caratteristiche dei CSPGs sono state associate in vitro con una maggiore affinità di legame per LDL come catene laterali più lunghe (116), e la maggiore estensione di solforilazione (117-119). Rapporti aumentati di dermatan contro condroitin solfato (118, 120) e di condroitin 6-solfato (C6S) a condroitin 4-solfato (C4S) (115, 117, 119-121) sono stati associati con una aumentata affinità per LDL in vitro. Studi di legame in vitro indicano che LDL ha un'affinità più alta per versicano che per decorina o biglicano (122), in parte dovuto al grande numero di catene laterali su ogni molecola di versicano. Questo effetto potrebbe essere amplificato in vivo dall'organizzazione macromolecolare di versicano con acido ialuronico che crea complessi che contengono centinaia di catene laterali di CS. Inoltre, a causa del suo alto contenuto all'interno della parete arteriosa prelesionata e lesionata (123), versicano sembra avere un più grande numero di siti di legame per LDL. Anche il biglicano, che possiede due catene laterali se comparato con decorina, è stato associato con la ritenzione di lipoproteine nella parete arteriosa (124). La decorina, anche se implicata come una partecipante nel legame con lipoproteina in vitro (125), sembra avere una minor partecipazione diretta, con un'affinità bassa per lipoproteine in assenza di LPL in vitro ed una colocalizzazione meno costante con l'accumulo di lipidi in vivo. Una volta trattenute, le lipoproteine aterogeniche subiscono diverse modifiche con importanti conseguenze di patofisiologiche. La prima modifica è l'aggregazione lipoproteica (126, 127). L'aggregazione può avvenire quando aggregazione quando le LDL trattenute sono ossidato in modo esteso (128, 129) o digerite da molti enzimi che si sa essere presenti all'interno della parete arteriosa, inclusa la

fosfolipasi secretiva A2 (130-132), la sfingomielinasi (133, 134), le catepsine (135), e le chimasi prodotte dalle mast-cellule (136).

Mentre l'ossidazione di particelle contenenti apoB100 legate ai PG innesca la loro liberazione ed assunzione da parte dei macrofagi, le modifiche non-ossidative aumentano la forza di legame della particella ai PGs (137). Inoltre, tali particelle modificate non-ossidativamente tendono ad aggregarsi e fondersi, permettendo l'accumulo extracellulare progressivo di lipidi di lipoproteine. Sia questi aggregati che gli altri tipi di lipoproteine modificate sono inglobate avidamente da macrofagi, portando alla formazione di cellule schiumose e l'accumulo di lipidi intracellulari. Quindi, la modifica locale di lipoproteine contenenti apoB100 conduce all'accumulo extra e intracellulare di lipidi nell'intima delle arterie. Il processo può auto-amplificarsi, dal momento che l'aggregazione di LDL aumenta in modo sostanziale il loro legame ai PGs, a causa della creazione di un ligandi multimerici con una migliore esposizione di residui positivi chiave su apoB (138). Inoltre, modifiche ossidative ed enzimatiche di lipoproteine portano alla generazione di molecole biologicamente attive, come lisofosfatidil-colina e ceramide che si sono stati mostrati in grado in vitro di provocare espressione da parte di cellule endoteliali di molecole di adesione cellulare, la chemotassi dei monociti, e la proliferazione di SMCs che, in risposta, aumentano la loro sintesi di PG. Altri lipidi derivati dalle lipoproteine come l'acido lisofosfatidico e il fattore di attivazione piastrinico, bloccano la conversione dei monociti in cellule migratorie e favoriscono la loro ritenzione nel subendotelio (139). La figura 4 illustra gli eventi che succedono nell'intima arteriosa dopo la ritenzione di lipoproteine contenenti apoB.



**Figura 4:** Figura rappresentativa del meccanismo di ritenzione subendoteliale di lipoproteine pro-aterogene all'interno della parete arteriosa (adattata da (137)).

# **SCOPO dello STUDIO**

## **SCOPO dello STUDIO**

Questo studio nasce dalla volontà di rispondere al perché esista una così marcata variabilità nella suscettibilità allo sviluppo della malattia aterosclerotica, ed aneurismatica in particolare, in siti diversi dell'albero vascolare umano. Dati in letteratura suggeriscono che differenze nella struttura e nell'organizzazione dei componenti della ME della parete aortica, in particolare per quanto riguarda i proteoglicani depositati nell'iperplasia intimale, giochino un ruolo centrale nello sviluppo e progressione dell'aterosclerosi. Abbiamo quindi ipotizzato che le differenze nella composizione di proteoglicani extracellulari intimali fosse almeno parzialmente responsabile per la marcata variabilità nella suscettibilità a sviluppare aterosclerosi fra porzioni diverse dell'aorta.

Al fine di caratterizzare la struttura e la composizione dell'aorta nei diversi segmenti di interesse, sezioni di aorta umana non patologica sono state sottoposte ad analisi morfologica qualitativa dopo colorazioni in grado di mettere in evidenza i diversi componenti della ME nella parete dell'aorta.

La stessa analisi morfologica è stata condotta anche su aorta di ratto, in modo da stabilire se esista comparabilità tra le due specie e per valutare se l'animale da laboratorio, i cui campioni sono di più facile reperibilità, possa essere usato come modello sperimentale.

# **MATERIALI e METODI**

## **MATERIALI E METODI**

### **Modello sperimentale**

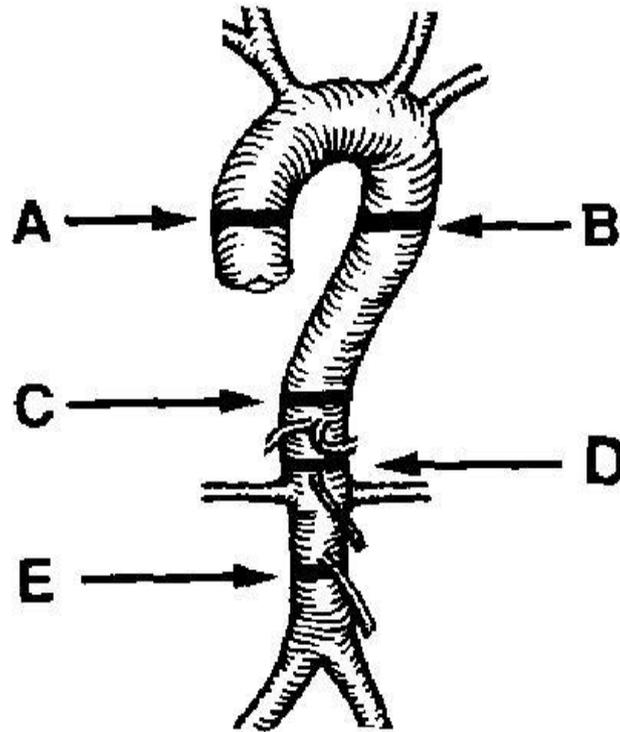
Cinque segmenti di aorta sono stati ottenuti da 8 individui di sesso maschile di età compresa tra i 20 e i 35 anni durante autopsie eseguite presso l'Istituto di Medicina Legale dell'Università degli Studi di Milano. Tutti gli individui arruolati in questo studio erano deceduti in seguito a incidenti del traffico o strangolamento. I criteri di esclusione sono stati: storia di ipercolesterolemia familiare, iperomocisteinemia, tumori liquidi o tumori della parete aortica, sepsi, grossolane placche aterosclerotiche che coinvolgessero uno dei segmenti aortici.

Altrettanti segmenti di aorta di ratto sono stati prelevati con le stesse modalità da 4 ratti Sprague-Dawley sacrificati presso il laboratorio di Neurofisiologia dei sistemi sensoriali e Neuro-fisiopatologia del dolore del CNR – Istituto di Bioimmagini e Fisiologia Molecolare (per gentile concessione del professor G. Biella), dopo l'iniezione intraperitoneale di una dose letale di barbiturici.

Il medesimo protocollo procedurale ed analitico utilizzato per l'aorta umana è stato applicato nello studio dell'aorta di ratto. E' stato così possibile confrontare i risultati ottenuti con quelli derivati dallo studio della parete aortica umana.

Al termine dell'atto necroscopico, segmenti aortici spessore di circa 1,5 cm sono stati prelevati in cinque distinti livelli: aorta ascendente nel tratto intrapericardico, aorta toracica discendente tra la 3° e la 4° coppia di arterie intercostali, aorta sopraceliaca a livello dello iato aortico del diaframma, aorta infraceliaca tra l'emergenza del tripode celiaco e quella della mesenterica superiore, aorta sottorenale a livello dell'emergenza della 2° coppia di arterie lombari al di sotto dell'origine delle arterie renali. Anche per i campioni di aorta di ratto i frammenti di tessuto sono stati prelevati a cinque diversi livelli aortici: ascendente,

discendente, celiaca, renale e addominale, conservando quanto più possibile la relazione con i segmenti aortici umani (Figura 5) .



**Figura 5:** Schema esemplificativo della sede di prelievo dei segmenti aortici nell'aorta umana.

I frammenti di aorta opportunamente ridotti sono stati fissati in formalina tamponata al 4% per essere sottoposti ad analisi morfologica.

Tutti i prelievi sono stati eseguiti dallo stesso operatore dopo aver ottenuto, nel caso di prelievi autoptici, il non-dissenso da parte dei familiari e l'autorizzazione del Procuratore della Repubblica di Milano.

## **Allestimento del preparato istologico**

Il protocollo per l'allestimento del preparato istologico prevede passaggi di fissazione, disidratazione, chiarificazione e infiltrazione, inclusione, taglio e colorazione

## **Fissazione**

Al fine di ridurre al minimo i processi di degradazione che seguono inevitabilmente alla morte del tessuto, i frammenti di aorta sono stati fissati il più velocemente possibile.

La fissazione è un trattamento volto ad impedire l'avanzamento dei processi putrefattivi nei campioni biologici, mantenendo inalterate le caratteristiche strutturali dei componenti tissutali e preservandone la morfologia originale, mediante blocco dei processi cellulari ed inattivazione degli enzimi autolisanti. Inoltre, formando legami crociati che stabilizzano le proteine e rendendo insolubili gli altri costituenti cellulari, conferisce ai tessuti la resistenza e le caratteristiche adatte a consentirne un'adeguata processazione.

Per questo studio è stata effettuata una fissazione chimica impiegando un fissativo aldeidico denaturante, la *formalina*, in una soluzione al 4% in PBS (Phosphate Buffer Saline). La formalina agisce formando legami tra il suo gruppo aldeidico e i gruppi amminici dei residui di Arg e Lys delle proteine. E' il fissativo più usato, poiché ha un elevato potere di penetrazione, preserva una buona morfologia, prevenendo l'eccessivo indurimento dei tessuti, ha elevata stabilità nel tempo e consente la realizzazione dei più comuni metodi di colorazione.

I campioni di aorta sono stati quindi immersi in fissativo (soluzione di formalina 4%, saccarosio 2% in PBS), da un minimo di 4 ore ad un massimo di una notte a 4°C. Il tempo di penetrazione del fissativo è proporzionale alle dimensioni del pezzo e il volume di formalina deve essere adeguato alla dimensione di quest'ultimo, nella proporzione di 1:20. La soluzione è stata preparata diluendo la paraformaldeide al 37% in PBS 0,1 M pH 7.4, in modo che non ci sia diversità di pH fra il tessuto e la soluzione fissativa, e per evitare artefatti dovuti a differenze di osmolarità.

Al termine del periodo di fissazione sono stati effettuati 3 lavaggi da 30 minuti ciascuno in agitazione con PBS, allo scopo di eliminare l'eccesso di fissativo.

## **Disidratazione e chiarificazione**

La disidratazione è il passaggio che consente di allontanare lentamente e progressivamente l'acqua dal tessuto, permettendone la sostituzione con il solvente del mezzo d'inclusione idrofobo. Si effettua con qualsiasi agente chimico anidro in grado di sostituire l'acqua presente nei tessuti, affinché non provochi eccessive coartazioni e sia solubile e miscibile con i solventi intermedi utilizzati prima dell'infiltrazione in paraffina. Un agente chimico anidro con queste caratteristiche è l'alcool etilico. Esso viene impiegato a concentrazioni crescenti (70%, 95%, 100%), secondo il seguente protocollo:

- immersione in etanolo 70% per 1 ora in agitazione, se a temperatura ambiente, o fino a una settimana, se mantenuto a 4°C
- 3 lavaggi da 30 minuti ciascuno, in agitazione, con etanolo 96% a temperatura ambiente
- 3 lavaggi da 30 minuti ciascuno, in agitazione, con etanolo 100% a temperatura ambiente

Dopo l'ultimo passaggio in alcool assoluto si effettuano 3 lavaggi da 30 minuti ciascuno, in agitazione a temperatura ambiente con xilolo, ben miscibile con l'alcool 100% e solvente specifico della paraffina. Questo passaggio ha la funzione di aumentare l'idrofobicità del campione e prepararlo per la successiva penetrazione del mezzo includente.

## **Infiltrazione**

Questo processo consiste nella sostituzione graduale dello xilolo con il mezzo di inclusione in forma liquida, la paraffina, che penetra uniformemente nei tessuti.

La paraffina ha punto di fusione intorno a 54-60°C e solidifica a temperatura ambiente. I frammenti di aorta sono stati quindi immersi in un volume idoneo di paraffina liquida e

mantenuti per 1 ora in stufa. Successivamente, la paraffina è stata sostituita e i campioni sono stati nuovamente posti in stufa, overnight.

## **Inclusione**

Poiché la maggioranza dei tessuti biologici sono molli, l'inclusione serve a rendere il frammento di tessuto sufficientemente duro ed omogeneo da consentirne successivamente il taglio in sezioni molto sottili. A tale scopo si utilizza la paraffina, che consiste in una miscela di idrocarburi alifatici rispondenti alla formula generale  $C_nH_{2n+2}$  (con n compreso tra 21 e 34), e che a temperatura ambiente si presenta allo stato solido, di colore bianco traslucido. Per questo passaggio si utilizza l'*inclusore*, uno strumento che permette l'erogazione di paraffina liquida ed è dotato di una piastra calda e di una piastra fredda che consentono, rispettivamente, di mantenere la paraffina allo stato liquido e di permetterne il rapido indurimento.

Al termine dell'infiltrazione i campioni sono stati trasferiti in vaschette di metallo appoggiate sulla piastra calda e riempite con paraffina fusa. Aiutandosi con delle pinze, i frammenti di aorta sono stati posizionati al centro della vaschetta nell'orientamento desiderato. La vaschetta è stata, quindi, rapidamente trasferita sulla superficie fredda per far sì che la paraffina inizi a solidificare, mantenendo il campione nella posizione voluta. Sulle vaschette sono stati successivamente posizionati dei supporti in plastica ed è stata aggiunta altra paraffina fusa, in modo da coprirle completamente. I blocchetti così ottenuti sono stati lasciati raffreddare a temperatura ambiente e poi conservati in camera fredda, per permettere alla paraffina di solidificarsi completamente. A questo punto la vaschetta metallica è stata rimossa e si è ottenuto un cubetto solido pronto per essere tagliato.

## Taglio

Perché un tessuto possa essere osservato al microscopio ottico, deve essere sufficientemente sottile da permettere al fascio di luce di attraversarlo. I campioni inclusi in paraffina devono, quindi, essere tagliati in sezioni dello spessore di 4-8  $\mu\text{m}$  e lo strumento che è stato utilizzato per raggiungere tale scopo è il microtomo a rotazione.

Per procedere al taglio delle sezioni, il blocchetto freddo di paraffina è stato sagomato con una lametta in modo da formare un trapezio con il campione al centro, dopodiché è stato sistemato sul supporto del microtomo con la base minore del trapezio rivolta verso l'alto, disposto verticalmente rispetto alla lama, inclinata di  $5^\circ$ . Tramite una manovella si fa oscillare il blocchetto, in modo continuo e regolare, sulla lama fissa così da ottenere nastri continui di sezioni dello spessore precedentemente impostato.

Si inizia con una prima fase di "sgrossatura", che consente di rimuovere lo strato esterno di paraffina e portare in superficie il pezzo incluso all'interno del blocchetto, in modo che sia a contatto con la superficie di taglio e possa essere esaminato in ogni suo punto. In questa fase il taglio viene eseguito usando spessori di sezione maggiori (da 10 a 40  $\mu\text{m}$ ).

Una volta raggiunto il piano di sezione, si procede con il taglio delle sezioni definitive allo spessore desiderato. Si possono scegliere sezioni seriate, tagliando tutte le sezioni una successiva all'altra senza scarto di materiale intermedio o sezioni non seriate, tagliando solo alcune sezioni e scartando il materiale intermedio. Le sezioni ottenute vengono successivamente staccate con un pennello dalla lama e appoggiate delicatamente in un bagnetto termostato a  $41-45^\circ\text{C}$ . L'acqua calda consente di distendere le fettine e di facilitarne l'adesione al vetrino, inoltre, sullo sfondo nero del bagnetto la qualità della sezione viene più facilmente apprezzata. Le sezioni distese vengono poi raccolte su vetrini portaoggetti polilisinati, lasciate scolare e poste in stufa a  $37^\circ\text{C}$  over night per ottenere la definitiva adesione. Le sezioni, di 4  $\mu\text{m}$  ciascuna, sono a questo punto pronte per la colorazione.

## **Colorazione**

La colorazione è un passaggio fondamentale per permettere lo studio dei tessuti al microscopio. I tessuti animali, infatti, sono normalmente quasi incolori, poiché costituiti in gran parte d'acqua, privi di contrasto e trasparenti alla luce. Per renderli visibili al microscopio si possono utilizzare, anche in combinazione, vari coloranti istologici, che si legano selettivamente ad alcune strutture cellulari o tissutali, aumentandone il contrasto. Consentendo di colorare in modo differenziale i diversi componenti di un tessuto, li rendono quindi distinguibili e ne favoriscono l'identificazione. Poiché i coloranti sono generalmente in soluzione acquosa, è necessario, prima di procedere con la colorazione, allontanare la paraffina mediante xilolo, e poi reidratare il tessuto, mediante passaggi in una serie di soluzioni di acqua deionizzata e alcool a concentrazione decrescente fino all'acqua.

Dopo aver disposto i vetrini portaoggetti con le fettine incluse in paraffina negli appositi rack portavetrini, sono stati eseguiti i seguenti passaggi:

- prima sparaffinatura in xilolo1 per 10 minuti
- seconda sparaffinatura in xilolo2 per 10 minuti
- alcool 100% per 5 minuti
- alcool 96% per 5 minuti
- alcool 75% per 5 minuti
- alcool 50% per 5 minuti
- lavaggio in acqua distillata per 5 minuti

A questo punto si è proceduto con le specifiche colorazioni.

### **a) Colorazione con ematossilina-eosina**

La colorazione con ematossilina-eosina permette di valutare la struttura generale del tessuto di interesse. L'*ematossilina*, basica, colora in blu scuro i nuclei e altri componenti

cellulari carichi negativamente (come acidi nucleici, ribosomi, proteine di membrana e membrane cellulari, elastina), mentre l'*eosina*, acida, colora in varie gradazioni di rosa-arancio i citoplasmi e gli elementi cellulari carichi positivamente (come molte proteine cellulari, le proteine mitocondriali, le fibre collagene).

Dopo reidratazione e lavaggio dei vetrini in H<sub>2</sub>O è stato utilizzato il seguente protocollo:

- immersione in ematossilina di Harris (Bio-Optica) per 1 minuto
- lavaggio in acqua corrente per 5 minuti
- immersione in eosina per 4 minuti
- passaggi veloci (5-10 secondi) in alcool 75%, 96%, 100%
- 2 passaggi in xilolo per 5 minuti ciascuno
- montaggio dei vetrini con Neo Entellan

#### **b) Colorazione con rosso Sirius**

Il *rosso Sirius* è un particolare tipo di colorante, basato sul principio dell'impregnazione del tessuto. E' utilizzato principalmente per evidenziare le fibre collagene. All'osservazione al microscopio il collagene appare colorato in rosso brillante su uno sfondo giallo pallido, mentre i nuclei vengono colorati in blu-nero, ma possono essere spesso anche grigi o marroni.

Terminata la disidratazione ed effettuato il lavaggio in H<sub>2</sub>O, il protocollo utilizzato è il seguente:

- incubazione in una soluzione di rosso Sirius 0.1% in acido picrico saturato in acqua per 30 minuti
- risciacquo in acqua corrente per 30 minuti
- passaggi veloci (5-10 secondi) in alcool 75%, 96%, 100%
- 2 passaggi in xilolo per 5 minuti ciascuno
- montaggio dei vetrini con Neo Entellan

### **c) Colorazione con orceina**

L'orceina appartiene ai coloranti di ossazina ed è particolarmente indicata per la colorazione delle fibre elastiche; viene anche utilizzata per la colorazione della cromatina sessuale, per la colorazione dei nuclei e per l'individuazione di inclusioni epatiche, in particolare di antigeni dell'epatite B. Le fibre elastiche per l'azione dell'orceina appaiono di tonalità rosso-bruna intensa e spiccano su un fondo pressoché incolore, salvo colorazione di contrasto.

La soluzione di lavoro è stata preparata miscelando l'orceina in polvere con alcool etilico al 70% e acido cloridrico assoluto.

Effettuata la reidratazione, i vetrini vengono trattati con il seguente protocollo:

- lavaggio in H<sub>2</sub>O distillata per 1 minuto
- immersione in Orceina per 30 minuti
- rapido passaggio in alcool 70% (10 secondi)
- due passaggi in alcool 96% per 1 minuto ciascuno, tenendo i vetrini in costante movimento
- due passaggi in alcol 100% per 1 minuto ciascuno
- 2 passaggi in xilolo per 5 minuti ciascuno
- montaggio dei vetrini con Neo Entellan

### **d) Colorazione con Alcian blue a pH 0.2, pH 1.0, pH 2.5**

La colorazione con Alcian blue permette di mettere in evidenza la componente non fibrillare della matrice extracellulare. L'*Alcian blue* è un colorante cationico in grado di legarsi ai polianioni dei mucopolisaccaridi e dei proteoglicani acidi, in particolare a residui solforici, carbossilici e ialuronici. Permette, quindi, di identificare in modo selettivo i GAGs presenti all'interno di un tessuto, colorandoli in gradazioni di azzurro-blu. Variando il pH della soluzione di Alcian blue si può raggiungere un differente grado di selettività riguardo

al tipo di GAG costituenti il tessuto. A pH 2.5, infatti, vengono colorate in blu la maggior parte delle mucine acide, a pH 1.0 risultano colorate solo le mucine da debolmente ad altamente solforate, a pH 0.2 vengono rilevati solo i GAGs altamente solforati (condroitin e cheratan solfato), mentre le restanti mucine non vengono colorate (144).

La soluzione di Alcian blue a pH 2.5 è stata preparata sciogliendo il colorante in polvere (Alcian blue 8GX 1% BDH) in una soluzione di acido acetico al 3% diluito in acqua distillata. La soluzione a pH 1.0 è stata preparata con Alcian blue 8GX 1% in HCl 0.1N. La soluzione a pH 0.2 è stata preparata con Alcian 8GX 1% in acido solforico al 10%.

Dopo reidratazione e lavaggio dei vetrini in H<sub>2</sub>O, è stato utilizzato il seguente protocollo:

- immersione in Alcian blue per 15 minuti
- per l'Alcian blue a pH 2.5 lavaggio in acqua corrente per 5 minuti, per le soluzioni a pH 1.0 e 0.2 scolatura e asciugatura all'aria
- disidratazione rapida in alcool 75%, 96%, 100%
- 2 passaggi in xilolo per 5 minuti ciascuno
- montaggio dei vetrini con Neo Entellan

## **Montaggio**

Il montaggio si effettua ponendo sul vetrino portaoggetti (su cui si trova la sezione colorata) una goccia di fluido per montaggio e, successivamente, ricoprendo il tutto con un vetrino coprioggetto, facendo attenzione a non lasciare bolle d'aria in prossimità o sopra il tessuto stesso. La caratteristica del fluido impiegato per il montaggio è quella di cristallizzare rapidamente e di impedire l'interposizione d'aria tra i due vetrini, consentendo così una visione ottimale al microscopio. Il montaggio ha lo scopo di rendere permanente il preparato, cioè renderlo inattaccabile dagli agenti atmosferici, e consentirne quindi una conservazione pressoché illimitata nel tempo.

## **Osservazione al microscopio ottico**

Il microscopio ottico (MO) utilizza le lunghezze d'onda della luce visibile e il suo principio di funzionamento si basa sull'attraversamento del preparato istologico da parte del fascio di luce. Perché ciò avvenga in modo efficiente, lo spessore del campione deve essere di 4-10  $\mu\text{m}$ . L'ingrandimento tipico dei MO è fino a 1500x, con un limite di risoluzione di circa 0,2  $\mu\text{m}$ . Lo strumento è costituito da una base meccanica di sostegno, da dispositivi di regolazione della distanza dell'apparecchio dall'oggetto e di messa a fuoco, da un apparato di illuminazione e da un sistema di lenti che comprende condensatore, obiettivo e oculare. Il condensatore collima il fascio di luce sul campione; l'obiettivo è in prossimità del campione da osservare e permette un ingrandimento generalmente compreso tra 4 e 100x; l'oculare è usato per osservare e consente l'ulteriore ingrandimento (da 5 a 15x) dell'immagine prodotta dall'obiettivo.

In questo studio, per l'analisi morfologica delle sezioni istologiche colorate ci siamo avvalsi del microscopio Nikon Eclipse E600, dotato di apparecchiatura fotografica digitale dedicata (Nikon DS-5M), che consente l'acquisizione di microfotografie delle sezioni desiderate. I vetrini sono stati osservati ad un ingrandimento di 10x e 20x.

# **RISULTATI**

## RISULTATI

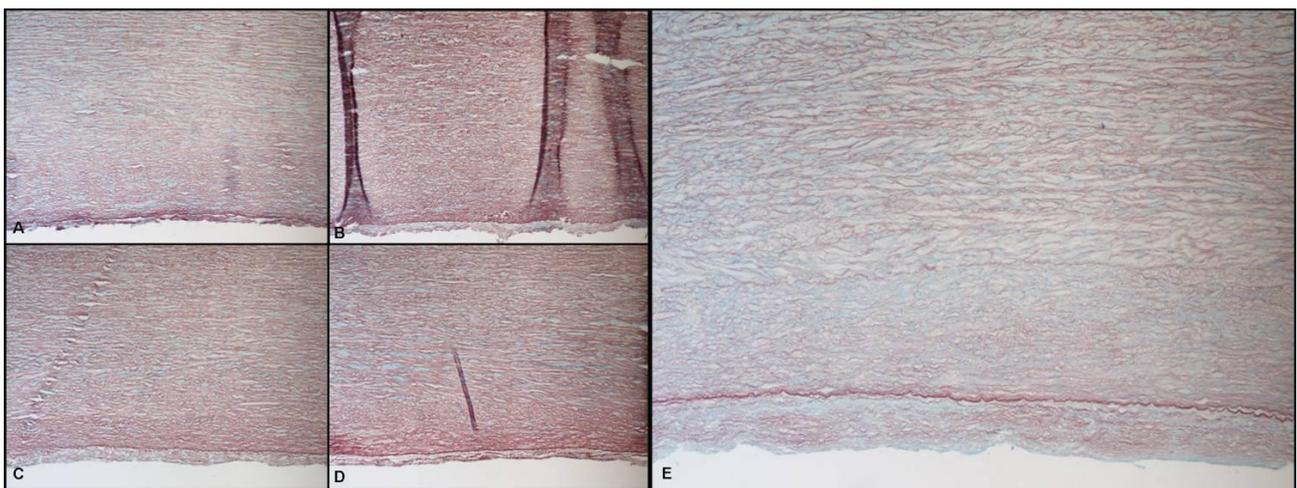
In questo studio sono state effettuate due valutazioni indipendenti. La prima è stata eseguita sull'aorta di otto soggetti sani, deceduti per cause traumatiche, e si proponeva di individuare nell'aorta umana le possibili differenze strutturali che distinguessero e caratterizzassero i diversi tratti di aorta. La seconda valutazione è stata compiuta su campioni derivanti da quattro ratti Spague Dawley, per caratterizzare la struttura dell'aorta ed evidenziare possibili differenze nei diversi tratti e, quindi, individuare un possibile modello animale su cui proseguire le ricerche in futuro. I soggetti inclusi in questo studio sono tutti confrontabili tra loro per quanto attiene ai rilievi morfometrici e demografici.

All'osservazione al microscopio ottico della parete aortica umana, la tonaca intima può essere identificata da uno strato endoteliale e da un sottile spazio subendoteliale delimitato dalla lamina elastica interna. Questa circonda la tonaca intima, ove appaiono significativi gli ispessimenti intimali diffusi (Diffuse Intimal Thickening – DIT), mentre è ben riconoscibile la separazione tra la tonaca media interna ed esterna ad opera della lamina elastica esterna. Nei campioni esaminati lo spessore della tonaca intima appare maggiore a livello sottorenale, ove si possono osservare lamelle discontinue di elastina intercalate a fibrille collagene. In particolare, la tonaca intima si presenta costituita da una sottile trama di cellule endoteliali e una scarsa ME a livello dell'aorta ascendente, mentre appare più spessa a livello toracico ed addominale, assumendo un notevole spessore a livello sottorenale rispetto al livello ascendente.

La tonaca media rappresenta la maggior parte della parete del vaso e consiste di lamelle elastiche concentriche fra le quali sono ospitate cellule muscolari lisce e fasci di collagene. La tonaca media appare maggiormente rappresentata a livello dell'aorta ascendente, dove la componente elastica è prevalente su quella collagenica. A questo livello, le fibre

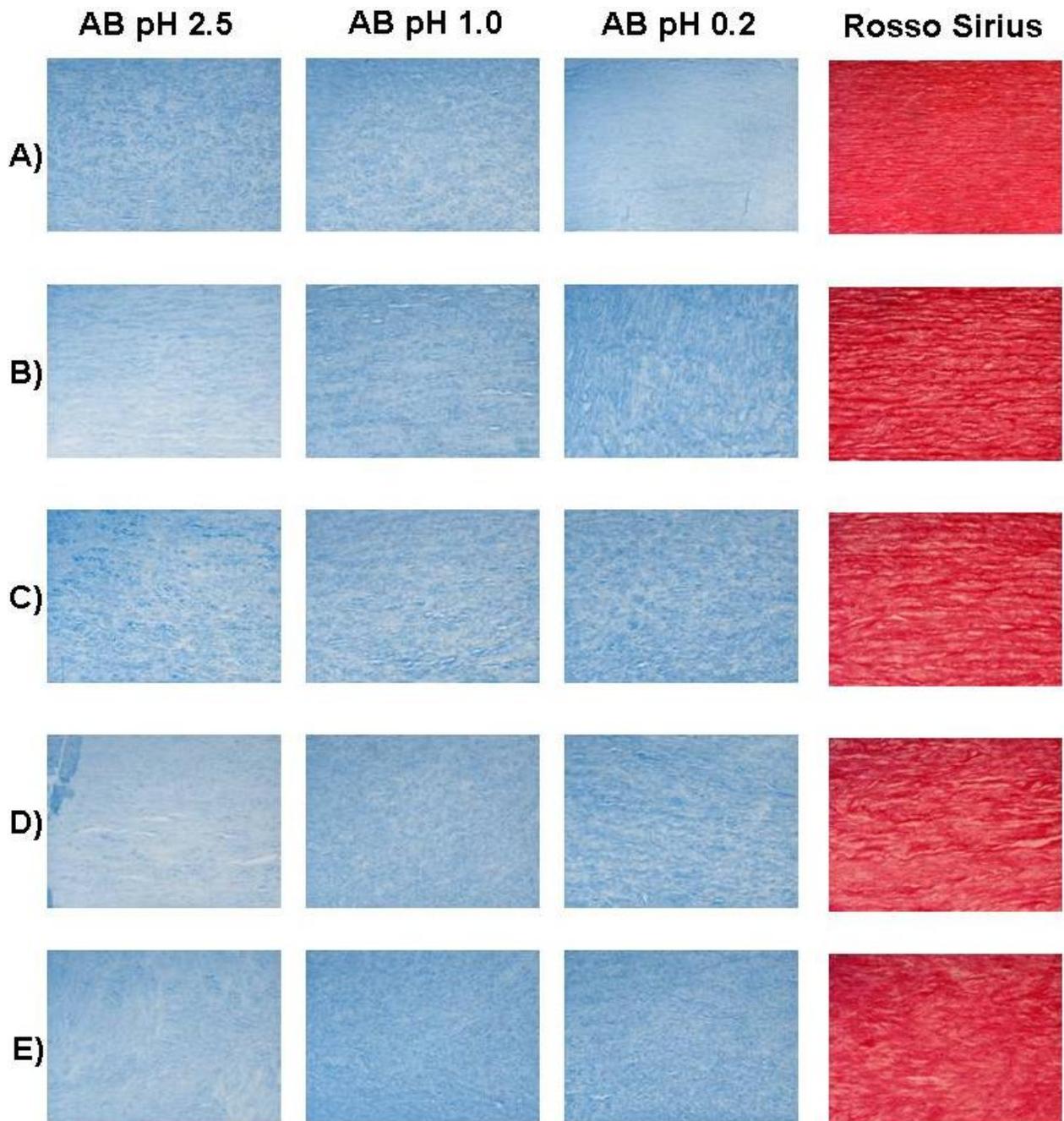
elastiche appaiono ordinate in modo uniforme e lasciano poco spazio ad una più scarsa componente amorfa. Al contrario, a livello dell'aorta toracica discendente ed addominale, la componente elastica lascia spazio ad una matrice amorfa più rappresentata, e la componente fibrillare è rappresentata principalmente da collagene. Nell'avventizia, elementi cellulari (principalmente fibroblasti) sono avvolti in una ME particolarmente ricca in collagene.

Alcune sezioni di aorta umana già colorate con ematossilina ed orceina sono state colorate anche con Alcian blue a pH 0.2 per evidenziare sulle stesse sezioni istologiche la presenza di GAGs e PGs altamente solforati. Le sezioni di aorta umana sono risultate colorate intensamente, indicando la presenza di GAGs e PGs altamente solforati all'interno delle tonache che costituiscono la parete del vaso. In particolare, un aumento dell'intensità della colorazione era evidente soprattutto a livello della parte interna della tonaca media e della tonaca intima. Una decisa tendenza all'aumento dell'intensità della colorazione si può notare in corrispondenza dei DIT, soprattutto a livello sottorenale (Figura 6).



**Figura 6:** Aorta umana. Microfotografie di sezioni trasversali di aorta umana normale ascendente (A), discendente (B), celiaca (C), renale (D) e addominale sottorenale (E), in soggetto di 27 anni. Colorazione con orceina, Alcian blue pH 0,2 ed ematossilina. Ingrandimento 20x

Le colorazioni delle sezioni di aorta con solo Alcian blue a diversi pH hanno permesso di confermare i dati ottenuti dalle prime indagini, in particolare per quanto attiene la componente altamente solforata (Figura 7).



**Figura 7:** Aorta umana. Microfotografie al microscopio ottico di sezioni trasversali di aorta ascendente (A), discendente (B), celiaca (C), renale (D) e addominale (E) umana colorate con Alcian blue a pH 2,5, a pH 1 e a pH 0,2, e con rosso Sirius. Ingrandimento 20x

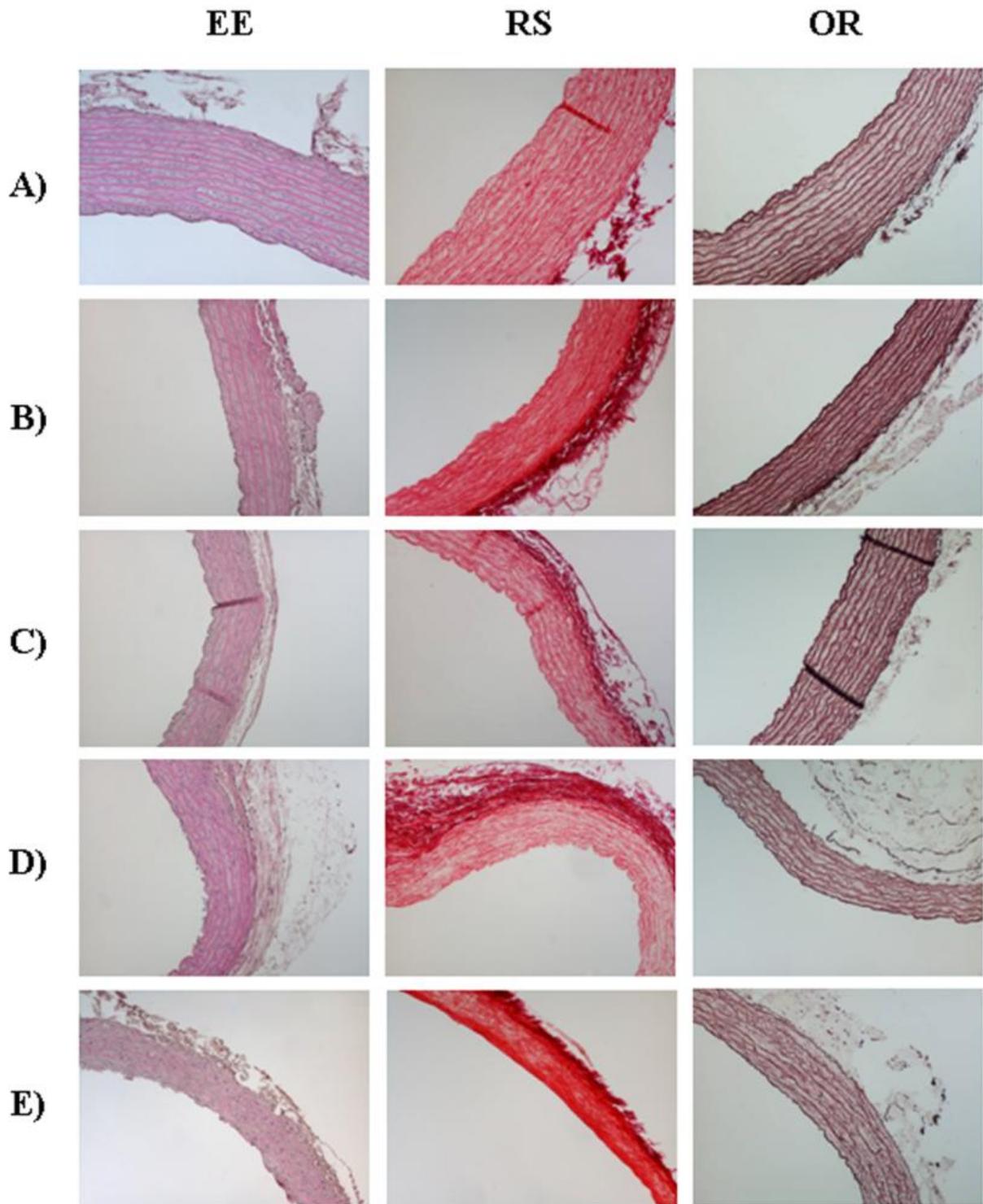
Si può infatti notare come la componente glicanica si mantenga pressoché costante per quanto riguarda le mucine acide e quelle modestamente solforate, identificate in modo selettivo dalle colorazioni rispettivamente a pH 2.5 e pH 1.0, mentre ci sia una variazione per quanto riguarda la componente altamente solforata, che si colora selettivamente con l'Alcian blue a pH 0.2.

La colorazione con rosso Sirius colora in modo specifico le fibre collagene, che risultano colorate in rosso. Con questa colorazione abbiamo confermato i dati già presenti in letteratura per quanto attiene alla componente collagenica dei diversi tratti aortici. In particolare, abbiamo osservato come le fibre collagene presentino un'organizzazione più densa a livello sottorenale rispetto a quanto sia osservato a livello dell'aorta ascendente, ove risulta per lo più intercalato a fibre elastiche ben organizzate (Figura 7).

Lo studio della parete aortica umana ha inoltre fatto rilevare come il contenuto di PG altamente solforati aumenti in senso cranio-caudale.

Per quanto attiene allo studio sull'aorta di ratto, i risultati ottenuti sono sovrapponibili a quelli ottenuti dallo studio dell'aorta umana.

Dopo colorazione con ematossilina-eosina (Figura 8) si può apprezzare che la parete dell'aorta sovradiaframmatica presenta una maggiore quantità di cellule e un'organizzazione strutturale lamellare, con fibre ben distribuite ed organizzate, che decorrono parallelamente tra loro. Nei segmenti più distali l'organizzazione della componente fibrosa si modifica e questo è particolarmente evidente nell'aorta addominale. La sua parete mostra, infatti, un numero minore di cellule e le fibre elastiche appaiono rilassate e disposte in modo disordinato ed irregolare, prive di un netto orientamento riconoscibile. Viene anche confermata la tendenza, già riportata in letteratura, alla graduale diminuzione dello spessore della tonaca media e al progressivo aumento dello spessore dell'avventizia, passando dall'aorta ascendente verso quella addominale.

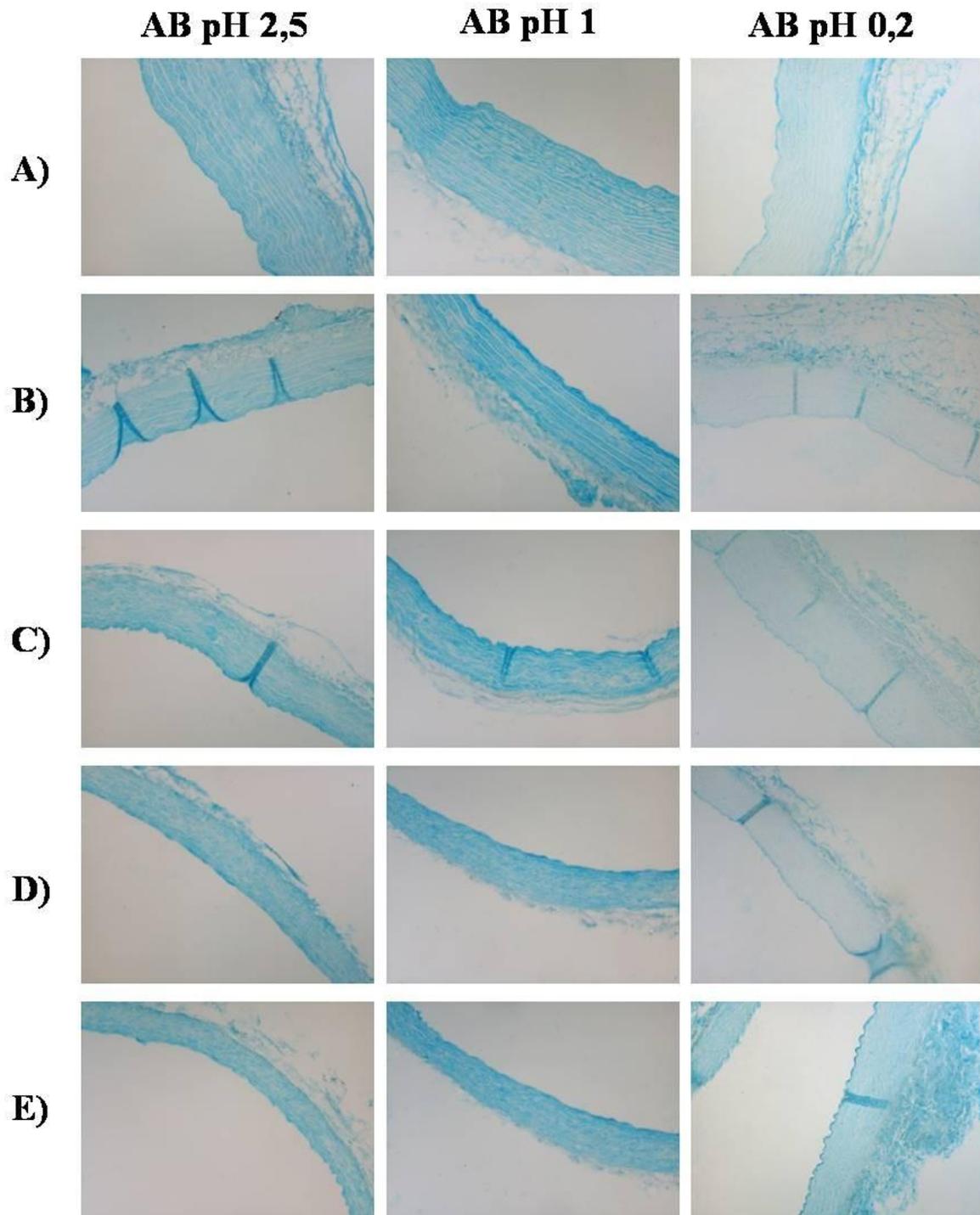


**Figura 8:** Aorta di ratto. Microfotografie al microscopio ottico di sezioni trasversali di aorta ascendente (A), discendente (B), celiaca (C), renale (D) e addominale (E) di ratto colorate con ematossilina-eosina (EE), rosso Sirius (RS) e orceina (OR). Ingrandimento 20x.

La colorazione con rosso Sirius (Figura 8) colora in gradazioni di rosso le fibre collagene, ma in modo aspecifico anche le fibre elastiche, e permette di apprezzare la variazione del rapporto elastina-collagene lungo i diversi segmenti aortici. La componente fibrillare, disposta ordinatamente nel tratto prossimale, assume un andamento irregolare più distalmente e la quantità di collagene nella tonaca media aumenta progressivamente, in particolare nel tratto addominale. Quest'ultimo risulta, infatti, più intensamente colorato e le fibre che lo compongono appaiono disorganizzate e prive di andamento preciso.

La colorazione con orceina (Figura 8), colorando specificamente le fibre elastiche in tonalità di marrone, permette di riconoscere come le lamine di elastina della tonaca media mantengano una disposizione ordinata a livello prossimale e vadano incontro ad una progressiva degradazione e disorganizzazione nei segmenti più distali. Questo andamento è evidente soprattutto nella parete dell'aorta sottorenale, dove si può apprezzare una riduzione dell'intensità del colore e una maggiore irregolarità delle fibre. Se le colorazioni precedentemente descritte hanno confermato dati attesi e già presenti in letteratura, risultati interessanti sono stati osservati dopo colorazione con Alcian blue, che permette di mettere in evidenza i GAGs e i PGs presenti all'interno del tessuto (Figura 9). In seguito a colorazione con Alcian blue a pH 2,5 e a pH 1 (Figura 9), che colorano, rispettivamente, la gran parte dei GAGs e i GAGs da debolmente a modestamente solforati, abbiamo osservato che i cinque segmenti aortici mostrano una comparabile intensità di colorazione azzurra, ad indicare che il contenuto totale di PGs nella parete aortica si mantiene costante tra il distretto sopra-diaframmatico e sotto-diaframmatico.

Con la colorazione a pH 0,2 (Figura 9), selettiva per i GAGs altamente solforati, abbiamo invece apprezzato come la sezione addominale si colora molto più intensamente delle altre, dimostrando che il contenuto di PGs altamente solforati nella parete aortica aumenta progressivamente dal tratto prossimale verso quello distale.



**Figura 9:** Aorta di ratto. Microfotografie al microscopio ottico di sezioni trasversali di aorta ascendente (A), discendente (B), celiaca (C), renale (D) e addominale (E) di ratto colorate con Alcian blue a pH 2,5, a pH 1 e a pH 0,2. Ingrandimento 20x.

# **DISCUSSIONE**

## DISCUSSIONE

La localizzazione di lesioni aterosclerotiche (e di aneurismi) nel distretto sottorenale è stata attribuita in passato a fattori emodinamici e stress di parete. Considerando l'aorta nel suo complesso, come organo, sono emerse alcune differenze anatomiche e strutturali che hanno contribuito a meglio comprendere il meccanismo di formazione degli aneurismi (23). Agli inizi degli anni Novanta, si cominciò a studiare la composizione della parete aortica focalizzando l'attenzione sulle componenti strutturali più eclatanti, il collagene e l'elastina, ed il loro metabolismo (26). La scoperta del coinvolgimento delle metalloproteinasi della matrice (MMP) nel rimodellamento della parete aortica fu, per oltre dieci anni, l'argomento scientifico più dibattuto nelle riviste specializzate. Approfondendo le prime intuizioni, si è giunti ad affermare che molte, se non tutte, le MMP coinvolte nel rimodellamento aortico sono prodotte da cellule che non risiedono normalmente nella parete aortica, come i macrofagi (68). Al contrario, queste cellule vengono reclutate dal torrente circolatorio e spinte a produrre MMP e altri enzimi sotto l'influsso di diverse citochine e numerosi fattori di stimolazione. Progredendo con la ricerca scientifica in questa direzione, si è giunti ben presto a capire che la degradazione di collagene ad opera delle MMP non era che uno dei passaggi responsabili del rimodellamento della parete aortica. Rimaneva da capire il motivo per cui cellule *scavenger* del sistema immunitario venissero richiamate nella parete aortica. Inizialmente fu pensato che la formazione di "*foam cells*" o cellule schiumose fosse alla base dello sviluppo di lesioni aterosclerotiche più mature. In realtà, i macrofagi non risiedono normalmente nella tonaca media né tanto meno nell'intima della parete aortica. Tutt'al più, qualche macrofago è ritrovabile nella porzione della tonaca media al passaggio con l'avventizia (112, 140). I monociti vengono richiamati dal torrente circolatorio attraverso specifiche molecole di adesione (ICAM, VCAM e selectine) espresse sulla superficie delle cellule endoteliali. Percorrendo a ritroso gli avvenimenti che

portano al reclutamento dei monociti, si è arrivati a capire che è necessaria una adeguata stimolazione per accendere il sistema infiammatorio al di sotto della membrana basale endoteliale. Dal momento che la componente “schiumosa” delle *foam cells* era principalmente costituita di materiale lipidico, è sembrato logico ricercare nel metabolismo dei lipidi, e del colesterolo in particolare, il fattore indispensabile che mancava alla comprensione dello sviluppo dell'aterosclerosi. Ultimamente si è arrivati a comprendere che l'accumulo e il metabolismo enzimatico di LDL nella matrice extracellulare della tonaca intima sono in grado di creare un stimolo infiammatorio locale che, avvertito dalle cellule endoteliali, è in grado di innescare il meccanismo sopra descritto (140).

La “*response to retention hypothesis*” propone che il trattenimento delle lipoproteine da parte dei proteoglicani della matrice, più prominentemente condroitin (CS)/dermatan (DS) solfati, sia un passo critico nell'inizio dell'aterogenesi (110). Il legame delle lipoproteine a queste molecole porta al loro intrappolamento e, in ultimo, alla fagocitosi da parte dei macrofagi e altre cellule. Comprendere, quindi, il preciso meccanismo mediante il quale i lipidi siano intrappolati e trattenuti nel contesto dei vasi sanguigni è un passo critico per capire l'aterogenesi, e può costituire l'obiettivo per nuove terapie volte a ridurre la formazione di placche direttamente a livello della parete vascolare.

Un studio riportato su *Nature* dal Laboratorio di Boren a Gothenburg nel 2002 non solo supportò la “*response to retention hypothesis*” ma anche specificamente il ruolo dei proteoglicani nell'intrappolamento delle lipoproteine (112). Questo studio presenta evidenze dirette che il legame delle LDL ai proteoglicani nella parete dei vasi sanguigni è un passo di chiave nell'aterogenesi. Gli autori concludono “Quindi, l'aterosclerosi è iniziata dalla ritenzione a livello sub-endoteliale di lipoproteine aterogeniche”.

Il fatto che la patologia aortica possa essere correlata a differenze anatomiche e fisiche nelle regioni prossimali e distali non è un concetto nuovo. Wolinsky e Glagov studiarono l'aorta toracica e infrarenale umana e di altri mammiferi, scoprendo che, mentre l'aorta

toracica è molto simile tra le specie, l'aorta addominale umana contiene un numero inferiore di lamelle di elastina nella tonaca media rispetto alle altre specie (141) .

In questo studio abbiamo verificato l'esistenza di una correlazione tra la differente suscettibilità dimostrata dai diversi tratti aortici nello sviluppare aneurismi e le possibili differenze strutturali intrinseche della struttura del vaso, mediante analisi morfologica. Le colorazioni utilizzate hanno permesso di evidenziare e caratterizzare i diversi componenti della ME della parete aortica nei 5 segmenti di aorta di interesse.

### **Struttura dell'aorta**

La colorazione con ematossilina-eosina ha permesso di evidenziare alcune differenze strutturali fra i diversi segmenti di aorta analizzati, sia umani che di ratto. Le evidenze più rilevanti suggeriscono, infatti, che la parete dell'aorta sovradiaphragmatica presenti una maggiore quantità di cellule e un'organizzazione strutturale con fibre ben distribuite ed organizzate. Al contrario, nei segmenti più distali l'organizzazione della componente fibrosa si modifica, in particolare nell'aorta addominale, in cui si osservano un numero minore di cellule e le fibre elastiche appaiono rilassate e disposte in modo disordinato ed irregolare, prive di un netto orientamento riconoscibile. In direzione cranio-caudale appare evidente anche una graduale diminuzione dello spessore della tonaca media. Tali dati confermano quanto precedentemente descritto in letteratura (142, 143).

### **Componente fibrosa della parete aortica**

La colorazione con Rosso Sirius, che colora in gradazioni di rosso le fibre collagene, ha permesso di evidenziare come questa componente della ME della parete aortica si presenti disposta ordinatamente nel tratto prossimale, mentre assume un andamento irregolare procedendo distalmente. Tale riscontro è accompagnato dall'osservazione che

la quantità di collagene nella tonaca media aumenta progressivamente, in particolare nel tratto addominale, associandosi ad un progressivo diradamento delle fibre elastiche.

L'analisi al microscopio dei campioni colorati con orceina, colorazione specifica per le fibre elastiche, suggerisce che le fibre elastiche della tonaca media mantengono una disposizione ordinata a livello prossimale, mentre vanno incontro ad un progressiva degradazione e disorganizzazione nei segmenti più distali, ed in particolare nella parete dell'aorta sottorenale. Questa osservazione si associa a quanto precedentemente osservato per le fibre collagene, che a livello sottorenale appaiono sostituire quasi interamente la componente elastica. I dati ottenuti dall'osservazione delle sezioni di aorta umana sono risultati paragonabili a quelli forniti dall'analisi delle sezioni di aorta di ratto, suggerendo che il modello animale possa essere utilizzato per futuri studi in questo campo.

### **Proteoglicani della parete aortica**

Considerato l'importante ruolo dei PG nell'aterogenesi, abbiamo caratterizzato la loro distribuzione nella ME della tonaca media dei 5 segmenti di aorta umana di interesse.

Con il primo esperimento abbiamo voluto meglio indagare la diversa natura dei proteoglicani presenti nella sostanza fondamentale della parete aortica umana ai vari livelli, utilizzando una colorazione con Alcian blue a pH 2,5 e a pH 1, che colora, rispettivamente, la maggior parte dei GAGs acidi e i GAGs da debolmente a modestamente solforati (144). I risultati ottenuti, che evidenziano una comparabile intensità di colorazione azzurra nei cinque segmenti aortici analizzati, sono suggestivi di un contenuto totale sovrapponibile e costante di PGs nella parete aortica nel distretto sopra-diaframmatico e sotto-diaframmatico.

In un secondo esperimento, le sezioni di aorta umana sono state colorate con Alcian Blue a pH 0.2, in modo da evidenziare la presenza di GAG e proteoglicani altamente solforati

all'interno delle tonache che costituiscono il vaso. I risultati evidenziano un aumento dell'intensità della colorazione è soprattutto a livello della parte interna della tonaca media e dell'intima del tratto addominale dell'aorta, dimostrando che il contenuto di proteoglicani altamente solforati nella parete aortica aumenta progressivamente dal tratto prossimale verso quello distale.

Sebbene nell'aorta dei soggetti arruolati in questo studio non si siano osservate lesioni aterosclerotiche evidenti, ispessimenti intimali non patologici sono presenti nei tratti distali dell'aorta. Una decisa tendenza all'accumulo di segnale si può notare in corrispondenza di questi ispessimenti intimali diffusi (Diffuse Intimal Thickening – DIT), presenti soprattutto a livello delle porzioni addominali dell'aorta.

Infine, la colorazione con Alcian blue ai tre diversi pH è stata ripetuta sulle sezioni di aorta di ratto per verificare la "traslabilità" dei risultati ottenuti nell'uomo su un possibile modello animale. In particolare, abbiamo potuto notare come le stesse variazioni di contenuto di GAG e PG che si osservano all'interno della parete aortica umana nei diversi segmenti analizzati si ripetano parimenti nella parete aortica del ratto. Questo dato risulta particolarmente interessante, anche alla luce dei risultati forniti dall'analisi delle sezioni colorate con ematossilina-eosina, rosso Sirius, e orceina, che confermano come anche l'aorta di ratto, nel suo complesso, si presenti strutturalmente differente nei vari distretti esaminati.

L'analisi qualitativa della quantità di PG nei diversi distretti arteriosi oggetto di studio, suggerisce come il contenuto medio vari in modo uniforme solo per la componente altamente solforata, mentre si mantenga pressoché costante da prossimale a distale, per i PG della famiglia dell'eparan solfato e dell'acido ialuronico. Inoltre, la prevalenza di PG altamente solforati sembra differire in modo significativo tra il tratto di aorta prossimale e quello distale. L'aumento della quantità di GAG solforati si associa ad una diminuzione del

contenuto di elastina e all'aumento di collagene, dato peraltro già ampiamente verificato in letteratura (142) .

Considerati nel loro insieme, questi cambiamenti strutturali differenziano l'aorta infrarenale dal resto dell'aorta e suggeriscono che la differente rappresentazione relativa dei diversi componenti fondamentali della ME possa giocare un ruolo determinante nella predisposizione allo sviluppo della patologia aterosclerotica a questo livello.

# **CONCLUSIONI**

## CONCLUSIONI

Una delle principali limitazioni di questo studio è certamente rappresentato dall'esiguo numero di soggetti arruolati. Inoltre, tutti i soggetti arruolati sono di sesso maschile, e questo non ci permette di esprimere giudizi di carattere generale sulla popolazione. Consapevoli di queste limitazioni sin dall'inizio, abbiamo deciso comunque di portare avanti l'analisi dei campioni raccolti sin ora al fine di offrire uno spunto per ricerche future.

Sebbene partendo da una popolazione esigua, abbiamo osservato che il contenuto di proteoglicani altamente solforati, sembra variare notevolmente all'interno di segmenti aortici differenti. Il contenuto di PG nell'aorta sottorenale è superiore rispetto a quello dell'aorta toracica, mentre vi è una certa differenza individuale nelle regioni toraciche.

Confermando quanto osservato nell'uomo, anche nel ratto il contenuto di proteoglicani altamente solforati varia notevolmente all'interno di segmenti aortici differenti. Il contenuto di PG altamente solforati nell'aorta infrarenale è superiore in modo significativo rispetto a quello dell'aorta toracica, mentre vi è una certa differenza individuale nelle regioni toraciche. Questa osservazione si correla con l'evidenza clinica della localizzazione di aneurismi preferenzialmente in questa sede.

L'aumento della quantità di GAGs e PGs solforati a livello addominale si associa alla diminuzione del contenuto di elastina e all'aumento di collagene, dato peraltro già ampiamente verificato in letteratura. Questi cambiamenti suggeriscono che la differente rappresentazione relativa dei costituenti della matrice extracellulare della parete aortica sottorenale possano almeno in parte spiegare la predisposizione allo sviluppo di aterosclerosi ed aneurisma a questo livello.

L'approfondimento di queste ricerche con tecniche di immunoistochimica potrebbe portare a definire meglio le differenze inerenti all'organizzazione e al contenuto delle componenti fondamentali della matrice extracellulare e la loro relazione con l'inizio dei processi aneurismatici.

# **BIBLIOGRAFIA**

## BIBLIOGRAFIA

1. Bairati A, Anatomia umana, IV edizione, Minerva medica; 1997
2. Wassef M, Baxter BT, Chisholm RL, Dalman RL, Fillinger MF, Heinecke J.. Pathogenesis of abdominal aortic aneurysm: a multidisciplinary research program supported by the National Heart, Lung, and Blood Institute. *J Vasc Surg.* 2001; 34: 730-738
3. Rehm JP, Grange JJ, Baxter BT. The formation of aneurysm. *Semin Vasc Surg.* 1998; 11: 193-202
4. Kuhlencordt PJ, Gyurko R, Han F, Scherrer-Crosbie M, Aretz TH, Hajjar R, Picard MH, Huang PL. Accelerated atherosclerosis, aortic aneurysm formation and ischemic heart disease in apolipoprotein E/endothelial nitric oxide synthase double-knockout mice. *Circulation.* 2001; 104: 448-454
5. Baxter BT, Davis VA, Minion DJ, Wang YP, Lynch TG, McManus BM. Abdominal aortic aneurysms are associated with altered matrix proteins of the nonaneurysmal aortic segments. *J Vasc Surg.* 1994; 19: 797-802
6. Fan J, Watanabe T. Inflammatory reactions in the pathogenesis of atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb.* 2003; 10: 63-71
7. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a prospective for the 1990s. *Nature.* 1993; 362: 801-809

8. Agmon Y, Khandheria BK, Meissner I, Schwartz GL, Sicks JRD, Fought AJ, O'Fallon WM, Wiebers DO, Tajik AJ. Is aortic dilatation an atherosclerosis-related process? *J Am Coll Cardiol.* 2003; 42: 1076-1083
9. Dobrin PB, Baker WH, Gley WC. Elastolytic and collagenolytic studies of arteries: implication for the mechanical properties of aneurysms. *Arch Surg* 1984; 119: 405-409
10. Metcalfe D, Holte PJE, Thompson MM. The management of abdominal aortic aneurysms. *BMJ.* 2011; 342: 644-649
11. Zarins CK, Runyon-Hass A, Zatina MA, Lu CT, Glagov S. Increased collagenase activity in early aneurysmal dilatation. *J Vasc. Surg.* 1986; 3: 238-248
12. Ruddy JM, Jeffrey AJ, Spinale FG, Ikonomidis JS. Regional heterogeneity within the aorta: relevance to aneurysm disease. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2008; 136: 1123-1130
13. Jongstra-Bilen J, Haidari M, Zhu SN, Chen M, Guha D, Cybulsky MI. Low-grade chronic inflammation in regions of the normal mouse arterial intima predisposed to atherosclerosis. *JEM.* 2006; 2073-2083
14. Gadson PF Jr, Dalton ML, Patterson E, Svoboda DD, Hutchinson L, Schram D, Rosenquist TH. Differential response of mesoderm and neural crest derived smooth muscle to TGF-beta 1: regulation of c-myb and alpha 1 (I) procollagen genes. *Exp Cell Res.* 1997; 230: 169-180
15. Martini, Timmons, Tallitsch. Anatomia umana, IV edizione, Edises; 2010

16. Wang X, Ishimori N, Korstanje R, Rollins J, Paigen B. Identifying novel genes for atherosclerosis through mouse-human comparative genetics. *Am J Hum Genet* 2005; 77: 1–15
17. Wald NJ, Law MR. A strategy to reduce cardiovascular disease by more than 80%. *BMJ* 2003; 326: 1419 –1424
18. Law MR, Wald NJ, Morris JK. The performance of blood pressure and other cardiovascular risk factors as screening tests for ischaemic heart disease and stroke. *J Med Screen* 2004; 11: 3–7
19. Ruengsakulrach P, Sinclair R, Komeda M, Raman J, Gordon I, Buxton B. Comparative histopathology of radial artery versus internal thoracic artery and risk factors for development of intimal hyperplasia and atherosclerosis. *Circulation* 1999; 100: II–139–II–144
20. Fishbein MC, Hartman G. Pathology of internal mammary arteries used as bypass grafts. *Cardiovasc Pathol* 1997; 6: 31–33
21. Stone JR. Intimal hyperplasia in the distal ulnar artery: influence of gender and implications for the hypothenar hammer syndrome. *Cardiovasc Pathol* 2004; 13: 20–25
22. Schwartz SM, deBlois D, O'Brien ERM. The intima: soil for atherosclerosis and restenosis. *Circ Res* 1995; 77: 445–465
23. Stary HC, Blankenhorn DH, Chandler AB, Glagov S, Insull W, Richardson M, Rosenfeld ME, Schaffer SA, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW. A definition of

- the intima of human arteries and of its atherosclerosis-prone regions. *Circulation* 1992; 85: 391–405
24. Davies PF. Flow-mediated endothelial mechanotransduction. *Physiol Rev* 1995; 75: 519–560
25. Garcia-Cardena G, Comander J, Anderson KR, Blackman BR, Gimbrone MA. Biomechanical activation of vascular endothelium as a determinant of its functional phenotype. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 4478–4485
26. Traub O, Berk BC. Laminar shear stress: Mechanisms by which endothelial cells transduce an atheroprotective force. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18: 677–685
27. International Human Genome Sequencing Consortium: Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001; 409: 860–921
28. Plenz G A M, Deng M C, Robenek H, and Volker W: Vascular collagens: spotlight on the role of type VIII collagen in atherogenesis. *Atherosclerosis* 2003; 166: 1–11
29. Stary HC, Chandler B, Dinsmore RE, Fuster V, Glasgow S, Insull W, Rosenfeld ME, Schwartz CJ, Wagner WD, and Wissler RW: A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. *Circulation* 1995; 92: 1355–1374
30. Katsuda S, Okada Y, Minamoto T, Oda Y, Matsui Y, and Nakanishi I: Collagens in human atherosclerosis. Immunohistochemical analysis using collagen type-specific antibodies. *Arterioscler Thromb* 1992; 12: 494–502

31. Linsenmayer TF, Gibney E, Igoe F, Gordon MK, Fitch JM, Fessler LI, and Birk DE: Type V collagen: Molecular structure and fibrillar organization of the chicken  $\alpha 1$  (v) NH<sub>2</sub>-terminal domain, a putative regulator of corneal fibrillogenesis. *J Cell Biol* 1993; 121: 1181–1189
32. Greibergen J: In vitro interactions of oxidatively modified LDL with type I, II, III, IV and V collagen, laminin, fibronectin, and poly-D-lysine. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 2721–2728
33. Kielty CM, Lees M, Shuttleworth A, and Woolley D: Catabolism of intact type VI collagen microfibrils: Susceptibility to degradation by serine proteinases. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 191: 1230–1236
34. Amento EP, Ehsani N, Palmer H, and Libby P: Cytokines and growth factors positively and negatively regulate interstitial collagen gene expression in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb* 1991; 11: 1223–1230
35. Okada Y, Katsuda S, Watanabe H, and Nakanishi I: Collagen synthesis of human arterial smooth muscle cells: effects of platelet-derived growth factor, transforming growth factor- $\beta 1$  and interleukin-1. *Acta Pathol Jpn*, 43: 160–167, 1993
36. Hiraga S, Kaji T, Ueda Y, Zisaki F, Iwata K, Koizumi F, Okada Y, Katsuda S, and Nakanishi I: Modulation of collagen synthesis by tumor necrosis factor alpha in cultured vascular smooth muscle cells. *Life Sci* 2000; 66: 235–244
37. Okada Y, Katsuda S, Matui Y, and Nakanishi I: The modulation of collagen synthesis in cultured arterial smooth muscle cells by platelet-derived growth factor. *Cell Biol Int Rep* 1992; 16: 1015–1022

38. Krettek A, Sukhova GK, and Libby P: Elastogenesis in human arterial disease-A role for macrophages in disordered elastin synthesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 582–587
39. Liu J and Davidson JM: The elastogenic effect of recombinant transforming growth factor beta on porcine aortic smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 154: 895–901
40. Badesch DB, Lee PDK, Parks WC, and Stenmark KR: Insulin-like growth factor 1 stimulates elastin synthesis by bovine pulmonary arterial smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 160: 382–387
41. Tokimitsu I, Tajima S, and Nishikawa T: Preferential inhibition of elastin synthesis by epidermal growth factor in chick aortic smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 168: 850–856
42. Wight TN: The extracellular matrix and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 1995; 6: 326–334
43. Riessen R, Fenchel M, Chen H, Axel DI, Karsch KR, and Lawler J: Cartilage oligomeric matrix protein (thrombospondin-5) is expressed by human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21: 47–54
44. Crawford SE, Stellmach V, Murphy-Ullrich JE, Ribeiro SMF, Lawler J, Hynes RO, Boivin GP, and Bouck N: Thrombospondin-1 is a major activator of TGF- $\beta$ 1 in vivo. *Cell* 1998; 93: 1159–1170

45. Dufourcq P, Couffinhal T, Alzieu P, Daret D, Moreau C, Dupl a C, and Bonnet J: Vitronectin is up-regulated after vascular injury and vitronectin blockade prevents neointima formation. *Cardiovasc Res* 2002; 53: 952–962
46. Isoda K, Nishikawa K, Kamezawa Y, Yoshida M, Kusuhara M, Moroi M, Tada N, and Ohsuzu F: Osteopontin plays an important role in the development of medial thickening and neointimal formation. *Circ Res* 2002; 91: 77–82
47. Isoda K, Kamezawa Y, Ayaori M, Kusuhara M, Tada N, and Ohsuzu F: Osteopontin transgenic mice fed a high-cholesterol diet develop early fatty-streak lesions. *Circulation* 2003; 107: 679–681
48. Cassaro CM, Dietrich CP. Distribution of sulphated mucopolysaccharides in invertebrates. *J Biol Chem.* 1977; 252: 2254-2261
49. Lohmander LS, De Luca S, Nilsson B, Hascall VC, Caputo CB, Kimura JH, Heinegard D. Oligosaccharides on proteoglycans from the swarm rat chondrosarcoma. *J Biol Chem.* 1980; 255: 6084-6091
50. Nilsson B, De Luca S, Lohmander S, Hascall VC. Structures of N-linked and O-linked oligosaccharides on proteoglycan monomer isolated from the Swarm rat chondrosarcoma. *J Biol Chem.* 1982; 257: 10920-10927
51. Laurent TC, Fraser JR. Hyaluronan. *Faseb J.* 1992; 6: 2397-2404
52. Funderburgh JL. MINI REVIEW Keratan sulfate: structure, biosynthesis, and function. *Glycobiology.* 2000; 10: 951-958

53. Margolis RU, Margolis RK. Aggrecan-versican-neurocan family proteoglycans. *Methods Enzymol.* 1994; 245: 105-126
54. Zimmermann DR. Versican. In: Iozzo RV, ed. *Proteoglycans- Structure, Biology and Molecular Interactions*. N. Y.: Marcel Dekker; 2000.
55. Zimmermann DR, Ruoslahti E. Multiple domains of the large fibroblast proteoglycan, versican. *Embo J.* 1989; 8: 2975-2981
56. Iozzo RV. The Biology of the Small Leucine-rich Proteoglycans. Functional network of interactive proteins. *J. Biol. Chem.* 1999; 274: 18843-18846
57. Järveläinen H, Wight TN. Vascular proteoglycans. In: Garg H, Roughly P, Hales P, eds. *Proteoglycans in lung disease*. N. Y.: Marcel Dekker; 2002
58. Whitelock JM, Iozzo RV. Heparan sulfate: a complex polymer charged with biological activity. *Chem Rev.* 2005; 105: 2745-2764
59. Alexopoulou AN, Multhaupt HAB, Couchman JR. Syndecans in wound healing, inflammation and vascular biology. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* 2007; 39: 505-528
60. Yi JY, Han I, Oh ES. Transmembrane domain-dependent functional oligomerization of syndecans. *ScientificWorldJournal.* 2006; 6: 457-459
61. Iozzo RV. Perlecan: a gem of a proteoglycan. *Matrix Biol.* 1994; 14: 203-208
62. Knox SM, Whitelock JM. Perlecan: how does one molecule do so many things? *Cell Mol Life Sci.* 2006; 63: 2435-2445

63. Prydz K, Dalen KT. Synthesis and sorting of proteoglycans. *J Cell Sci.* 2000; 113: 193-205
64. Sugahara K, Kitagawa H. Recent advances in the study of the biosynthesis and functions of sulfated glycosaminoglycans. *Curr Opin Struct Biol.* 2000; 10: 518-527
65. Fukuta M, Kobayashi Y, Uchimura K, Kimata K, Habuchi O. Molecular cloning and expression of human chondroitin 6-sulfotransferase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression.* 1998; 1399: 57-61
66. Tsutsumi K, Shimakawa H, Kitagawa H, Sugahara K. Functional expression and genomic structure of human chondroitin 6-sulfotransferase. *FEBS Letters.* 1998; 441: 235-241
67. Okuda T, Mita S, Yamauchi S, Matsubara T, Yagi F, Yamamori D, Fukuta M, Kuroiwa A, Matsuda Y, Habuchi O. Molecular cloning, expression, and chromosomal mapping of human chondroitin 4-sulfotransferase, whose expression pattern in human tissues is different from that of chondroitin 6-sulfotransferase. *J Biochem (Tokyo).* 2000; 128: 763-770
68. Malesmud CJ. Matrix metalloproteinases (MMPs) in health and disease: an overview. *Front Biosci.* 2006; 11: 1696-1701
69. Perides G, Asher RA, Lark MW, Lane WS, Robinson RA, Bignami A. Glial hyaluronate-binding protein: a product of metalloproteinase digestion of versican? *Biochem J.* 1995; 312: 377-384

70. Passi A, Negrini D, Albertini R, Miserocchi G, De Luca G. The sensitivity of versican from rabbit lung to gelatinase A (MMP-2) and B (MMP-9) and its involvement in the development of hydraulic lung edema. *FEBS Lett.* 1999; 456: 93-96
71. Halpert I, Sires UI, Roby JD, Potter-Perigo S, Wight TN, Shapiro SD, Welgus HG, Wickline SA, Parks WC. Matrilysin is expressed by lipidladen macrophages at sites of potential rupture in atherosclerotic lesions and localizes to areas of versican deposition, a proteoglycan substrate for the enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996; 93: 9748-9753
72. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res.* 2003; 92: 827-839
73. Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res.* 2006; 69: 562-573
74. Porter S, Clark IM, Kevorkian L, Edwards DR. The ADAMTS metalloproteinases. *Biochem J.* 2005; 386: 15-27
75. Sandy JD, Westling J, Kenagy RD, Iruela-Arispe ML, Verscharen C, Rodriguez-Mazaneque JC, Zimmermann DR, Lemire JM, Fischer JW, Wight TN, Clowes AW. Versican V1 proteolysis in human aorta in vivo occurs at the Glu441-Ala442 bond, a site that is cleaved by recombinant ADAMTS-1 and ADAMTS-4. *J Biol Chem.* 2001; 276: 13372-13378

76. Jonsson-Rylander AC, Nilsson T, Fritsche-Danielson R, Hammarstrom A, Behrendt M, Andersson JO, Lindgren K, Andersson AK, Wallbrandt P, Rosengren B, Brodin P, Thelin A, Westin A, Hurt-Camejo E, Lee-Sogaard CH. Role of ADAMTS-1 in atherosclerosis: remodeling of carotid artery, immunohistochemistry, and proteolysis of versican. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005; 25: 180-185
77. Cross NA, Chandrasekharan S, Jokonya N, Fowles A, Hamdy FC, Buttle DJ, Eaton CL. The expression and regulation of ADAMTS-1, -4, -5, -9, and -15, and TIMP-3 by TGFbeta1 in prostate cells: relevance to the accumulation of versican. *Prostate.* 2005; 63: 269-275
78. Somerville RP, Longpre JM, Jungers KA, Engle JM, Ross M, Evanko S, Wight TN, Leduc R, Apte SS. Characterization of ADAMTS-9 and ADAMTS-20 as a distinct ADAMTS subfamily related to *Caenorhabditis elegans* GON-1. *J Biol Chem.* 2003; 278: 9503-9513
79. Kenagy RD, Fischer JW, Davies MG, Berceli SA, Hawkins SM, Wight TN, Clowes AW. Increased plasmin and serine proteinase activity during flow-induced intimal atrophy in baboon PTFE grafts. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002; 22: 400-404
80. Whitelock JM, Murdoch AD, Iozzo RV, Underwood PA. The degradation of human endothelial cell-derived perlecan and release of bound basic fibroblast growth factor by stromelysin, collagenase, plasmin, and heparanases. *J Biol Chem.* 1996; 271: 10079-10086
81. McDonnell J, Lobner JM, Knight WB, Lark MW, Green B, Poe M, Moore VL. Comparison of the proteoglycanolytic activities of human leukocyte elastase and human cathepsin G in vitro and in vivo. *Connect Tissue Res.* 1993; 30: 1-9

82. Mort JS, Magny MC, Lee ER. Cathepsin B: an alternative protease for the generation of an aggrecan 'metalloproteinase' cleavage neoepitope. *Biochem J.* 1998; 335: 491-494
83. Handley CJ, Mok MT, Ilic MZ, Adcocks C, Buttle DJ, Robinson HC. Cathepsin D cleaves aggrecan at unique sites within the interglobular domain and chondroitin sulfate attachment regions that are also cleaved when cartilage is maintained at acid pH. *Matrix Biol.* 2001; 20: 543-553
84. Hou WS, Li Z, Buttner FH, Bartnik E, Bromme D. Cleavage site specificity of cathepsin K toward cartilage proteoglycans and protease complex formation. *Biol Chem.* 2003; 384: 891-897
85. Kowalewski R, Sobolewski K, Malkowski A, Wolanska M, Gacko M. Evaluation of enzymes involved in proteoglycan degradation in the wall of abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Res.* 2006; 43: 95-100
86. Vlodavsky I, Friedmann Y, Elkin M, Aingorn H, Atzmon R, Ishai-Michaeli R, Bitan M, Pappo O, Peretz T, Michal I, Spector L, Pecker I. Mammalian heparanase: gene cloning, expression and function in tumor progression and metastasis. *Nat Med.* 1999; 5: 793-802
87. Hulett MD, Freeman C, Hamdorf BJ, Baker RT, Harris MJ, Parish CR. Cloning of mammalian heparanase, an important enzyme in tumor invasion and metastasis. *Nat Med.* 1999; 5: 803-809

88. Kussie PH, Hulmes JD, Ludwig DL, Patel S, Navarro EC, Seddon AP, Giorgio NA, Bohlen P. Cloning and functional expression of a human heparanase gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999; 261: 183-187
89. Toyoshima M, Nakajima M. Human heparanase. Purification, characterization, cloning, and expression. *J Biol Chem.* 1999; 274: 24153-24160
90. Vreys V, David G. Mammalian heparanase: what is the message? *J Cell Mol Med.* 2007; 11: 427-452
91. Camejo G, Olofsson SO, Lopez F, Carlsson P, Bondjers G. Identification of Apo B-100 segments mediating the interaction of low density lipoproteins with arterial proteoglycans. *Arteriosclerosis.* 1988; 8: 368-377
92. Camejo G, Linden T, Olsson U, Wiklund O, Lopez F, Bondjers G. Binding parameters and concentration modulate formation of complexes between LDL and arterial proteoglycans in serum. *Atherosclerosis.* 1989; 79: 121-128
93. Olsson U, Camejo G, Olofsson SO, Bondjers G. Molecular parameters that control the association of low density lipoprotein apo B-100 with chondroitin sulphate. *Biochim Biophys Acta.* 1991; 1097: 37-44
94. Olsson U, Camejo G, Hurt-Camejo E, Elfsber K, Wiklund O, Bondjers G. Possible functional interactions of apolipoprotein B-100 segments that associate with cell proteoglycans and the ApoB/E receptor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997; 17: 149-155

95. Hurt-Camejo E, Olsson U, Wiklund O, Bondjers G, Camejo G. Cellular consequences of the association of apoB lipoproteins with proteoglycans. Potential contribution to atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997; 17: 1011-1017
96. Ross R, Glomset J, Harker L. Response to injury and atherogenesis. *Am J Pathol.* 1977; 86: 675-684
97. Bondjers G, Bjornheden T. Experimental atherosclerosis induced by mechanical trauma in rats. *Atherosclerosis.* 1970; 12: 301-306. 83
98. Bjorkerud S, Bondjers G. Arterial repair and atherosclerosis after mechanical injury. I. Permeability and light microscopic characteristics of endothelium in non-atherosclerotic and atherosclerotic lesions. *Atherosclerosis.* 1971; 13: 355-363
99. Bondjers G, Bjorkerud S. Arterial repair and atherosclerosis after mechanical injury. 4. Uptake and composition of cholesteryl ester in morphologically defined regions of atherosclerotic lesions. *Atherosclerosis.* 1972; 15: 273-284
100. Bondjers G, Bjorkerud S. Arterial repair and atherosclerosis after mechanical injury. 3. Cholesterol accumulation and removal in morphologically defined regions of aortic atherosclerotic lesions in the rabbit. *Atherosclerosis.* 1973; 17: 85-94
101. Bjorkerud S, Bondjers G. Arterial repair and atherosclerosis after mechanical injury. 5. Tissue response after induction of a large superficial transverse injury. *Atherosclerosis.* 1973; 18: 235-255

102. Bondjers G, Bjorkerud S. Arterial repair and atherosclerosis after mechanical injury. VI. Cholesterol elimination in vitro from experimental atherosclerotic lesions. *Exp Mol Pathol.* 1977; 26: 341-349
103. Bjorkerud S, Bondjers G. The effect of hypercholesterolemia on the response patterns after different types of defined mechanical injury. *Adv Exp Med Biol.* 1977; 82: 321-323
104. Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL. Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med.* 1989; 320: 915-924
105. Faber M. The human aorta: sulfate-containing polyuronides and the deposition of cholesterol. *Arch Pathol.* 1949; 48: 342-350
106. Gero S, Gergely J, Devenyi T, Jakab L, Szekely J, Virag S. Role of mucoid substances of the aorta in the deposition of lipids. *Nature.* 1960; 187: 152-153
107. Hollander W. Unified concept on the role of acid mucopolysaccharides and connective tissue proteins in the accumulation of lipids, lipoproteins, and calcium in the atherosclerotic plaque. *Exp Mol Pathol.* 1976; 25: 106-120
108. Camejo G, Lalaguna F, Lopez F, Starosta R. Characterization and properties of a lipoprotein-complexing proteoglycan from human aorta. *Atherosclerosis.* 1980; 35: 307-320
109. Camejo G. The interaction of lipids and lipoproteins with the intercellular matrix of arterial tissue: its possible role in atherogenesis. *Adv Lipid Res.* 1982; 19: 1-53

110. Williams KJ, Tabas I. The response-to-retention hypothesis of early atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995; 15: 551-561
111. Anitschkow NN, Chalator S. Ueber experimentelle Choleserinsteatose und ihre Bedeutung fur die Entstehung einiger pathologischer Prozesse. *Zentralbl. Allg. Pathol.* 1913; 24: 1-9
112. Skalen K, Gustafsson M, Rydberg EK, Hulten LM, Wiklund O, Innerarity TL, Boren J. Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis. *Nature.* 2002; 417: 750-754
113. Schwenke DC, Carew TE. Initiation of atherosclerotic lesions in cholesterol-fed rabbits. I. Focal increases in arterial LDL concentration precede development of fatty streak lesions. *Arteriosclerosis.* 1989; 9: 895-907
114. Schwenke DC, Carew TE. Initiation of atherosclerotic lesions in cholesterol-fed rabbits. II. Selective retention of LDL vs. selective increases in LDL permeability in susceptible sites of arteries. *Arteriosclerosis.* 1989; 9: 908-918
115. Cardoso LE, Mourao PA. Glycosaminoglycan fractions from human arteries presenting diverse susceptibilities to atherosclerosis have different binding affinities to plasma LDL. *Arterioscler Thromb.* 1994; 14: 115-124
116. Camejo G, Fager G, Rosengren B, Hurt-Camejo E, Bondjers G. Binding of low density lipoproteins by proteoglycans synthesized by proliferating and quiescent human arterial smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 1993; 268: 14131-14137

117. Mourao PA, Pillai S, Di Ferrante N. The binding of chondroitin 6-sulfate to plasma low density lipoprotein. *Biochim Biophys Acta*. 1981; 674: 178-187
118. Sambandam T, Baker JR, Christner JE, Ekborg SL. Specificity of the low density lipoprotein-glycosaminoglycan interaction. *Arterioscler Thromb*. 1991; 11: 561-568
119. Srinivasan SR, Xu JH, Vijayagopal P, Radhakrishnamurthy B, Berenson GS. Low-density lipoprotein binding affinity of arterial chondroitin sulfate proteoglycan variants modulates cholesteryl ester accumulation in macrophages. *Biochim Biophys Acta*. 1995; 1272: 61-67
120. Christner JE, Baker JR. A competitive assay of lipoprotein: proteoglycan interaction using a 96-well microtitration plate. *Anal Biochem*. 1990; 184: 388-394
121. Edwards IJ, Wagner WD. Distinct synthetic and structural characteristics of proteoglycans produced by cultured artery smooth muscle cells of atherosclerosis-susceptible pigeons. *J Biol Chem*. 1988; 263: 9612-9620
122. Chang MY, Potter-Perigo S, Tsoi C, Chait A, Wight TN. Oxidized low density lipoproteins regulate synthesis of monkey aortic smooth muscle cell proteoglycans that have enhanced native low density lipoprotein binding properties. *J Biol Chem*. 2000; 275: 4766-4773
123. O'Brien KD, Olin KL, Alpers CE, Chiu W, Ferguson M, Hudkins K, Wight TN, Chait A. Comparison of apolipoprotein and proteoglycan deposits in human coronary atherosclerotic plaques: colocalization of biglycan with apolipoproteins. *Circulation*. 1998; 98: 519-527

124. Nakashima Y, Fujii H, Sumiyoshi S, Wight TN, Sueishi K. Early human atherosclerosis: accumulation of lipid and proteoglycans in intimal thickenings followed by macrophage infiltration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007; 27: 1159-1165
125. Kovanen PT, Pentikainen MO. Decorin links low-density lipoproteins (LDL) to collagen: a novel mechanism for retention of LDL in the atherosclerotic plaque. *Trends Cardiovasc Med.* 1999; 9: 86-91
126. Hoff HF, Morton RE. Lipoproteins containing apo B extracted from human aortas. Structure and function. *Ann N Y Acad Sci.* 1985; 454: 183-194
127. Guyton JR, Klemp KF. Development of the lipid-rich core in human atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1996; 16: 4-11
128. Hurt-Camejo E, Camejo G, Rosengren B, Lopez F, Ahlstrom C, Fager G, Bondjers G. Effect of arterial proteoglycans and glycosaminoglycans on low density lipoprotein oxidation and its uptake by human macrophages and arterial smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb.* 1992; 12: 569-583
129. Pentikainen MO, Lehtonen EM, Kovanen PT. Aggregation and fusion of modified low density lipoprotein. *J Lipid Res.* 1996; 37: 2638-2649
130. Hurt-Camejo E, Camejo G, Peilot H, Oorni K, Kovanen P. Phospholipase A(2) in vascular disease. *Circ Res.* 2001; 89: 298-304
131. Rosengren B, Peilot H, Umaerus M, Jonsson-Rylander AC, Mattsson- Hulten L, Hallberg C, Cronet P, Rodriguez-Lee M, Hurt-Camejo E. Secretory phospholipase

- A2 group V: lesion distribution, activation by arterial proteoglycans, and induction in aorta by a Western diet. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006; 26: 1579-1585
132. Bostrom MA, Boyanovsky BB, Jordan CT, Wadsworth MP, Taatjes DJ, de Beer FC, Webb NR. Group v secretory phospholipase A2 promotes atherosclerosis: evidence from genetically altered mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007; 27: 600-606
133. Schissel SL, Tweedie-Hardman J, Rapp JH, Graham G, Williams KJ, Tabas I. Rabbit aorta and human atherosclerotic lesions hydrolyze the sphingomyelin of retained low-density lipoprotein. Proposed role for arterial-wall sphingomyelinase in subendothelial retention and aggregation of atherogenic lipoproteins. *J Clin Invest.* 1996; 98: 1455-1464
134. Oorni K, Hakala JK, Annala A, Ala-Korpela M, Kovanen PT. Sphingomyelinase induces aggregation and fusion, but phospholipase A2 only aggregation, of low density lipoprotein (LDL) particles. Two distinct mechanisms leading to increased binding strength of LDL to human aortic proteoglycans. *J Biol Chem.* 1998; 273: 29127-29134
135. Oorni K, Kovanen PT. Enhanced extracellular lipid accumulation in acidic environments. *Curr Opin Lipidol.* 2006; 17: 534-540
136. Kokkonen JO, Lindstedt KA, Kovanen PT. Metabolism of LDL in mast cells recovering from degranulation. Description of a novel intracellular pathway leading to proteolytic modification of the lipoprotein. *Arterioscler Thromb.* 1993; 13: 276-285

137. Oorni K, Pentikainen MO, Ala-Korpela M, Kovanen PT. Aggregation, fusion, and vesicle formation of modified low density lipoprotein particles: molecular mechanisms and effects on matrix interactions. *J Lipid Res.* 2000; 41: 1703-1714
138. Paananen K, Saarinen J, Annala A, Kovanen PT. Proteolysis and fusion of low density lipoprotein particles strengthen their binding to human aortic proteoglycans. *J Biol Chem.* 1995; 270: 12257-12262
139. Llodra J, Angeli V, Liu J, Trogan E, Fisher EA, Randolph GJ. Emigration of monocyte-derived cells from atherosclerotic lesions characterizes regressive, but not progressive, plaques. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; 101: 11779-11784.
140. Aldons JL: Atherosclerosis. *Nature* 2000; 407: 233-241
141. Wolinsky H and Glagov S. Comparison of abdominal and thoracic aortic medial structure in mammals. *Circ Res* XXV 1969; 677-691
142. Halloran BG, Davis VA, McManus BM, Lynch TG, Baxter BT Localization of aortic disease is associated with intrinsic differences in aortic structure. *J Surg Res* 1995; 59: 17-22
143. Westaby S, Bertoni GB, Clelland C, Nishinaka T, Frazier OH Circulatory support with attenuated pulse pressure alters human aortic wall morphology *J Thorac Cardiovasc Surg* 2007; 133: 575-576
144. Lev R, Spicer SS. Specific staining of sulfate groups with alcian blue at low pH. *J Hist Cytochem* 1964; 12: 309