

IL TRATTAMENTO CON TOPIRAMATO PROTEGGE I TOPI APOE-KO DALL'INSORGENZA DI DANNO RENALE SENZA MODIFICARE I LIVELLI DEI LIPIDI PLASMATICI

M. Busnelli¹, S. Manzini¹, C. Parolini¹, L. Minoli^{2,3}, A. Ossoli⁴, S. Simonelli⁴, E. Brambilla¹, E. Lekka⁵, A. Persidis⁵, E. Scanziani^{2,3}, G. Chiesa¹

¹Department of Pharmacological and Biomolecular Sciences, Università degli Studi di Milano; ²Department of Veterinary Medicine, Università degli Studi di Milano; ³Mouse & Animal Pathology Laboratory (MAPLab), Fondazione UniMi, Milano; ⁴Center E. Grossi Paoletti, Department of Pharmacological and Biomolecular Sciences, Università degli Studi di Milano; ⁵Biovista, Ellinikon, Athens, Greece

Il topiramato è un farmaco impiegato nel trattamento dell'epilessia e prescritto anche nella profilassi dell'emigrania che si caratterizza per i molteplici meccanismi d'azione. Diversi studi indicano che il trattamento con topiramato promuove la riduzione del peso corporeo e riduce moderatamente i livelli dei lipidi plasmatici e la glicemia. In considerazione di questi effetti metabolici positivi si è deciso di valutare se il trattamento con topiramato potesse modulare lo sviluppo di aterosclerosi e al tempo stesso avere effetti protettivi sugli organi bersaglio di condizioni dismetaboliche.

Trenta topi apoE-KO sono stati distribuiti in tre gruppi sperimentali e alimentati per 12 settimane con una dieta ad elevato contenuto lipidico (controllo), oppure con la stessa dieta addizionata con topiramato allo 0.125% o allo 0.25%. Il peso corporeo e il consumo di cibo e acqua sono stati monitorati durante tutto lo studio. È stata inoltre misurata la concentrazione dei lipidi plasmatici e la glicemia, ed è stato effettuato un test di tolleranza al glucosio. Lo sviluppo di aterosclerosi è stato valutato nell'intera aorta e nel seno aortico. Sono state inoltre condotte indagini istologiche su fegato, rene e tessuto adiposo.

Il trattamento con topiramato non ha influenzato l'aumento di peso corporeo o il consumo di cibo. La tolleranza al glucosio e la concentrazione lipidica plasmatica sono risultati comparabili tra i gruppi, così come lo sviluppo di aterosclerosi. Il trattamento non ha inoltre alterato l'istologia del fegato e del tessuto adiposo. A livello renale, il trattamento con topiramato ha invece ridotto l'insorgenza di lipidosi glomerulare in modo dose-dipendente, riducendo l'accumulo di cellule schiumose e l'espressione di marcatori di infiammazione. Inoltre, anche i livelli plasmatici di urea sono risultati ridotti in seguito al trattamento.

In conclusione, i risultati ottenuti indicano che il trattamento con topiramato non influenza lo sviluppo di aterosclerosi, ma preserva struttura e funzionalità renale. Il topiramato potrebbe pertanto essere preso in considerazione in studi di riposizionamento farmacologico per il trattamento della lipidosi glomerulare.

IL RECETTORE DELLE LDL SVOLGE UN RUOLO FONDAMENTALE NELL'ATTIVAZIONE DEI LINFOCITI CD8+

A. Moregola¹, F. Bonacina¹, D. Coe², A.L. Catapano^{1,3}, F. Marelli-Berg², G. D. Norata¹

¹Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano; Harvey Research Institute, Barts and The London School of Medicine & Dentistry, Queen Mary University, Londra, UK; ³IRCCS Multimedica, Milano

Scopo. Data l'importanza che ha il colesterolo per la corretta funzionalità e proliferazione delle cellule immunitarie, scopo di questo studio è stato quello di valutare il ruolo del recettore delle LDL nei linfociti T, che giocano un ruolo importante nel mantenimento della risposta cronica che caratterizza la patologia aterosclerotica.

Metodi. Valutazione della risposta dei linfociti T dopo attivazione *in vitro* (stimolazione anti-CD3/anti-CD28, reazione mista linfocitaria) e *in vivo* (proliferazione omeostatica e mediata da recettore). Valutazione di produzione di citochine e marker di attivazione tramite citofluorimetria, espressione genica e western blot.

Risultati. L'espressione del recettore delle LDL aumenta in modo significativo dopo attivazione *in vitro* nei linfociti CD8+. Usando topi LDLR KO abbiamo evidenziato difetti nella proliferazione dei linfociti T CD8+ sia dopo attivazione *in vitro* con anti-CD3/anti-CD28, che dopo stimolazione con splenociti allogeneici (numero cellule proliferate: 1764±38 WT, 1144± LDLR KO, p<0.01). Inoltre, risulta essere ridotta la produzione di IFN γ (13.9±1% WT, 8.4±0.6% LDLR KO p<0.01). In un modello *in vivo* di risposta antigene-specifica (vaccinazione con ovalbumina), abbiamo osservato gli stessi difetti nella proliferazione e nella produzione di citochine (\downarrow IFN γ p<0.001, \downarrow IL13 p<0.01, \downarrow perforina p<0.05) dei linfociti CD8+ dei topi LDLR KO. L'esperimento di proliferazione omeostatica dei linfociti, non guidata da antigene, non hanno evidenziato differenze nei due modelli animali. I difetti osservati potrebbero essere dovuti ad un alterato signaling legato al TCR, infatti nelle cellule T CD8+ prive di recettore delle LDL sono risultate ridotte, dopo stimolazione con antiCD3/antiCD28, la fosforilazione di Akt (p<0.01) e l'espressione di CD69 (WT 61.6±6.1%, LDLR KO 41.8±8.5%, p<0.01), marker di rapida attivazione. Il difetto nel segnale potrebbe derivare da una non corretta formazione dei lipid rafts, porzioni di membrana ricche di colesterolo necessarie per un corretto signaling, infatti abbiamo osservato una lieve riduzione della positività al Ctxb, marker di lipid raft, e significativa riduzione di lipidi neutri (MFI nile red WT 12520±2071, MFI LDLR KO 9639.7±272.5, p<0.05) nelle CD8+ degli LDLR KO dopo stimolazione *in vitro*.

Conclusioni. Il recettore delle LDL svolge un ruolo importante nelle risposte immunometaboliche dei linfociti CD8+, in particolare permettendo una corretta proliferazione e attivazione in risposta a stimoli che inducono una rapida attivazione, come possono essere gli antigeni non-self presenti nella placca aterosclerotica. Il recettore delle LDL nei linfociti potrebbe quindi funzionare da asse di collegamento tra risposta immunitaria, infiammazione ed aterosclerosi.