

**Effetto modulatorio dell'acido scichimico sull'interleuchina 6  
e sull'interleuchina 8, citochine coinvolte nel processo  
aterosclerotico**

## **INTRODUZIONE**

La tradizione popolare ha sempre associato al consumo del vino un effetto salutare, ma per trovare un riscontro scientifico a questa ipotesi è necessario arrivare agli inizi degli anni '90, quando su "Lancet" appare un articolo che parla per la prima volta del "Paradosso Francese".

Renaud e de Lorgeril conducono infatti uno studio epidemiologico per dimostrare che la mortalità per malattia coronarica è correlata alla quantità di grassi d'origine casearia che vengono assorbiti nella dieta (Renaud e de Lorgeril 1992).

Paradossalmente in Francia si ha un forte consumo di grassi ma una scarsa mortalità per malattie coronariche e, se si fa entrare come regressore il consumo del vino, il paradosso scompare.

L'attenzione di molti ricercatori si rivolge quindi verso i composti biologicamente attivi contenuti nel vino, ed in particolare ne mettono in evidenza le attività terapeutiche: antiossidante, antiaggregante piastrinica, inibente la formazione della lesione aterosclerotica, favorente l'aumento dei livelli plasmatici dell'HDL, antinfiammatoria ed antineoplastica.

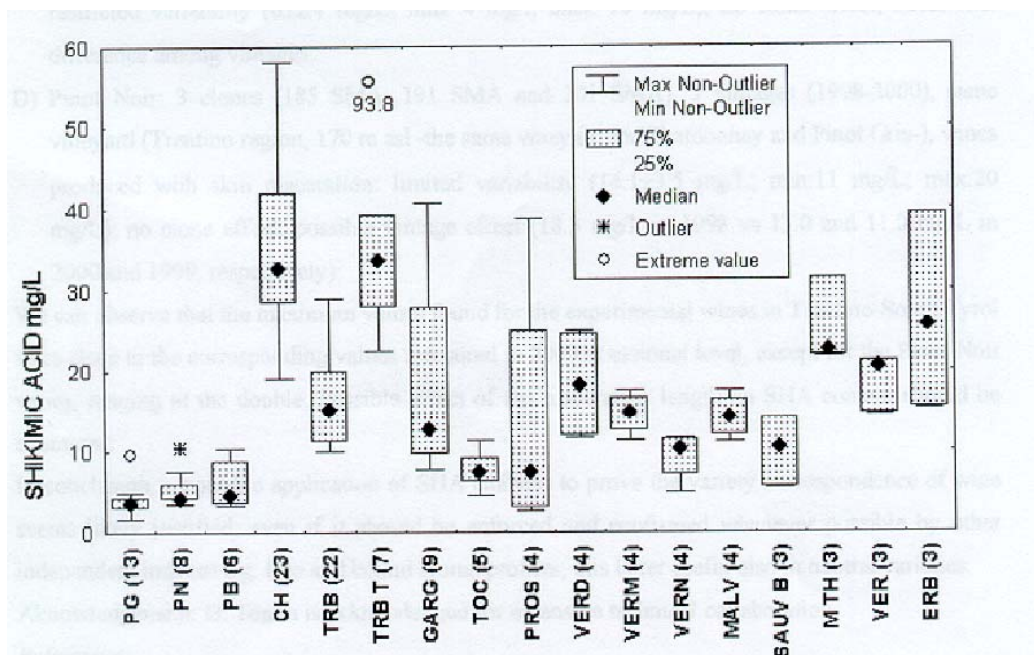
Particolarmente evidente appare in numerosi studi epidemiologici la protezione cardiovascolare che si manifesta con l'assunzione a dosi moderate di vino bianco e vino rosso.

Il vino è una soluzione idroalcolica contenente diversi composti (Fig.1).

ACQUA (g/l)	750 - 1.000
ALCOL ETILICO (g/l)	40-160
GLICEROLO (g/l)	4-20
GOMME E PECTINE (g/l)	2-4
ACIDI (g/l)	2-5
POLIFENOLI (mg/l)	250 - 5.000
OLIGOELEMENTI	più di 500 elementi descritti

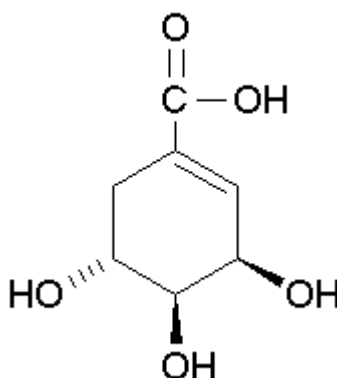
**Fig. 1 I costituenti del vino.**

Un composto che troviamo spesso ad alte concentrazioni nel vino bianco è l'acido scichimico (Versini et al. 2003) (Fig.2), come ad esempio nel vino bianco Reno Montuni DOC e Reno Pignoletto DOC.



**Fig.2 Distribuzione dell'acido scichimico nei vini bianchi italiani**

Questa sostanza (Fig.3) è nota in letteratura come costituente fondamentale dell'*Hypericum perforatum* e dell' *Hypericum laricifolium* (meglio conosciuto in Ecuador come Romerillo), piante che vengono utilizzate nella medicina popolare. Diversi studi hanno messo in evidenza le proprietà biologiche di questo principio attivo, tra cui una spiccata attività antinfiammatoria (El-Seedi et al. 2003), un'attività inibente l'aggregazione piastrinica indotta da ADP e da collagene (Wang et al. 1999) e la capacità di prevenire il danno cerebrale dopo ischemia focale indotta da trombosi (Ma et al. 1999).



**Fig.3 Struttura chimica dell'acido scichimico**

Studi condotti su modelli animali e nell'uomo hanno dimostrato che l'aterosclerosi iniziale e quella avanzata sono associate ad una disfunzione dell'endotelio dell'arteria (Ross 1993; Pettersson et al. 1993).

L'attrazione dei monociti a livello dell'endotelio dei vasi e la migrazione verso il tessuto sottostante è il punto centrale nella generazione di una risposta infiammatoria a livello vasale. E' ora riconosciuto che l'aterosclerosi appartiene al gruppo delle malattie nelle quali il reclutamento di monociti è alla base della patologia (Ross R. 1999). Questo reclutamento richiede l'espressione di varie classi di molecole di adesione (selectine, ICAM-1 e VCAM-1) e la presenza di recettori per i monociti e nelle cellule endoteliali, oltre all'instaurarsi di un gradiente chemotattico che guida i monociti verso la sorgente del segnale infiammatorio (Springer 1994; Proost et al. 1996). Nell'aterosclerosi il segnale infiammatorio ha origine nella parete vasale stessa. L'aterosclerosi è una condizione patologica data dall'ispessimento e perdita di elasticità delle pareti arteriose conseguentemente alla deposizione di lipidi nella tonaca intima delle arterie ed al suo ispessimento. La lesione principale è l'ateroma o placca fibrolipidica, costituita da una placca localizzata e rilevata, situata nell'intima e dotata di un core lipidico (soprattutto colesterolo ed esteri del colesterolo) e di un cappuccio fibroso che lo riveste; col progredire della malattia gli ateromi finiscono con l'interessare l'intera circonferenza delle arterie. Queste lesioni sono le principali responsabili della stenosi delle arterie.

Le placche aterosclerotiche sono costituite da tre componenti principali:

gli elementi cellulari (cell. muscolari lisce, macrofagi ed altri leucociti), il tessuto connettivo della matrice extracellulare (collagene, fibre elastiche e proteoglicani) i depositi lipidici intra- ed extra-cellulari.

Gli ateromi, negli stadi avanzati, vanno quasi sempre incontro a calcificazione focale o diffusa per cui le arterie divengono simili a tubi rigidi. Sia la rottura localizzata che l'estesa ulcerazione della superficie luminale delle placche possono provocare l'esposizione di sostanze con proprietà altamente trombogeniche, facilitando la formazione di trombi o l'immissione in circolo di ateroemboli. La trombosi costituisce la complicanza più temuta in quanto i trombi possono determinare l'occlusione parziale del lume dei vasi. Le arterie maggiormente interessate dall'aterosclerosi sono l'aorta, le coronarie ed i vasi cerebrali; di conseguenza le principali manifestazioni sono rappresentate dall'infarto miocardico, cerebrale e dall'aneurisma dell'aorta (Robbins et al.).

Nel corso degli anni sono stati identificati numerosi fattori di rischio per l'aterosclerosi, tra cui elevati livelli di colesterolo plasmatico in particolare le lipoproteine a bassa densità (LDL), l'ipertensione, il diabete mellito ed il fumo (Ross 1993).

Tra le possibili cause le LDL modificate sono considerate il principale induttore della disfunzione endoteliale. Infatti le LDL, quando presenti in grande concentrazione nello spazio sub-endoteliale, vanno incontro a processi di ossidazione ad opera di specie reattive dell'ossigeno prodotte dalle cellule endoteliali, dai macrofagi residenti o dalle cellule muscolari lisce; una volta formatesi le LDL ossidate possono recare danni all'endotelio e contribuire a far aumentare l'adesione dei monociti e la loro migrazione nella parete vascolare.

L'iniziale ancoraggio dei monociti all'endotelio (rolling) si pensa sia controllato da una classe di molecole di adesione, le selectine, che sono espresse sia dai leucociti sia dalle cellule endoteliali. L'ancoraggio e la diffusione dei monociti avviene grazie all'interazione con le integrine dei monociti. Un ruolo importante nel processo aterosclerotico è svolto dalle citochine.

I monociti/macrofagi fanno parte insieme ai leucociti delle cellule infiltranti e sono considerati i principali mediatori infiammatori nell'aterosclerosi. Anche le cellule-T sono molto abbondanti nel tappo fibroso dove rappresentano fino al 20% della popolazione cellulare (Jonasson et al. 1986).

La migrazione dei monociti nella parete vasale è uno dei primi eventi nella patogenesi dell'aterosclerosi. Il primo stadio visibile della malattia (detto fatty streak) è caratterizzato dalla presenza dei macrofagi e dalle cellule-T nella tonaca intima. I macrofagi, una volta entrati nella lesione aterosclerotica, funzionano da scavenger internalizzando le particelle lipoproteiche modificate e diventano "cellule schiumose" (Ross 1993).

Le sostanze assorbite a livello dell'apparato digerente entrano nel circolo sanguigno e vengono in contatto con lo strato cellulare endoteliale che riveste la parete interna dei vasi sanguigni. Le cellule endoteliali rappresentano quindi un bersaglio primario di sostanze esogene presenti nel sangue e che vengono successivamente trasportate a livello di altri compartimenti tissutali. Le sostanze che entrano nel circolo sanguigno possono modificare in maniera positiva o negativa la funzionalità dell'endotelio; è noto, per esempio, che uno sbilanciamento fra sostanze ossidanti e sostanze antiossidanti porta ad una condizione di stress ossidativo che può modificare la funzionalità e la sopravvivenza cellulare.

Le risposte prodotte dall'endotelio sono di importanza fondamentale per l'intero organismo, tanto che oggi viene considerato funzionalmente un organo.

Tra le molecole più importanti si possono annoverare le citochine. Queste sostanze vengono

prodotte e rilasciate in risposta a vari stimoli, da vari tipi cellulari tra cui le cellule del sistema immunitario presenti nel torrente circolatorio.

Le citochine sono un gruppo di proteine segnale intercellulari che regolano la risposta immune ed infiammatoria (locale e generale), il processo cicatriziale, l'emopoiesi e molti altri fenomeni biologici.

Fino ad oggi sono state identificate più di 100 citochine diverse, molte delle quali sono peptidi o glicoproteine con peso molecolare compreso tra i 6KDa ed i 60KDa. Esse sono estremamente potenti ed agiscono a concentrazioni di  $10^{-10}$ - $10^{-15}$  M legandosi a specifici recettori presenti sulle cellule bersaglio. A differenza degli ormoni endocrini, le citochine non sono prodotte da specifiche ghiandole ma, piuttosto, da una varietà di differenti tessuti e cellule individuali (fibroblasti, leucociti, macrofagi, cellule endoteliali, piastrine ecc). Solo poche citochine, come il TGF $\beta$ , l'eritropoietina, il fattore stimolante le colonie di monociti ed il fattore di crescita emopoietico (SCF), sono normalmente presenti nel sangue in quantità rilevabili e sono capaci di influenzare cellule bersaglio poste a distanza.

I primi studi sulle citochine risalgono agli anni '50-'70, ma il periodo d'oro della ricerca sulle citochine risale agli anni '80; esso è stato caratterizzato dal clonaggio molecolare delle singole molecole, nonché dalla produzione di anticorpi neutralizzanti, assolutamente specifici e spesso monoclonali. Tuttavia, sebbene si conosca molto sugli effetti in vitro delle citochine, è ancora poco chiaro quali azioni biologiche siano veramente importanti in vivo e quali eventi siano necessari perché si verifichi una data risposta biologica.

Sebbene le citochine siano una famiglia di proteine molto diverse tra loro, tutte queste molecole presentano una serie di caratteristiche comuni:

- 1) Le citochine sono prodotte durante la fase effettrice sia dell'immunità naturale che di quella specifica, e servono a mediare e regolare la risposta immune ed infiammatoria.
- 2) La secrezione di citochine è un fenomeno di breve durata e autolimitato. In genere le citochine non sono accumulate come molecole pre-formate e la loro sintesi è avviata dalla trascrizione de novo dei relativi geni.
- 3) Numerose citochine sono prodotte da molti tipi cellulari diversi.
- 4) Le citochine agiscono su numerosi tipi cellulari differenti (pleiotropismo).
- 5) Le citochine svolgono spesso numerosi effetti diversi su di una stessa cellula bersaglio. Alcuni effetti possono verificarsi simultaneamente, mentre altri possono manifestarsi serialmente nel giro di minuti, ore, giorni.

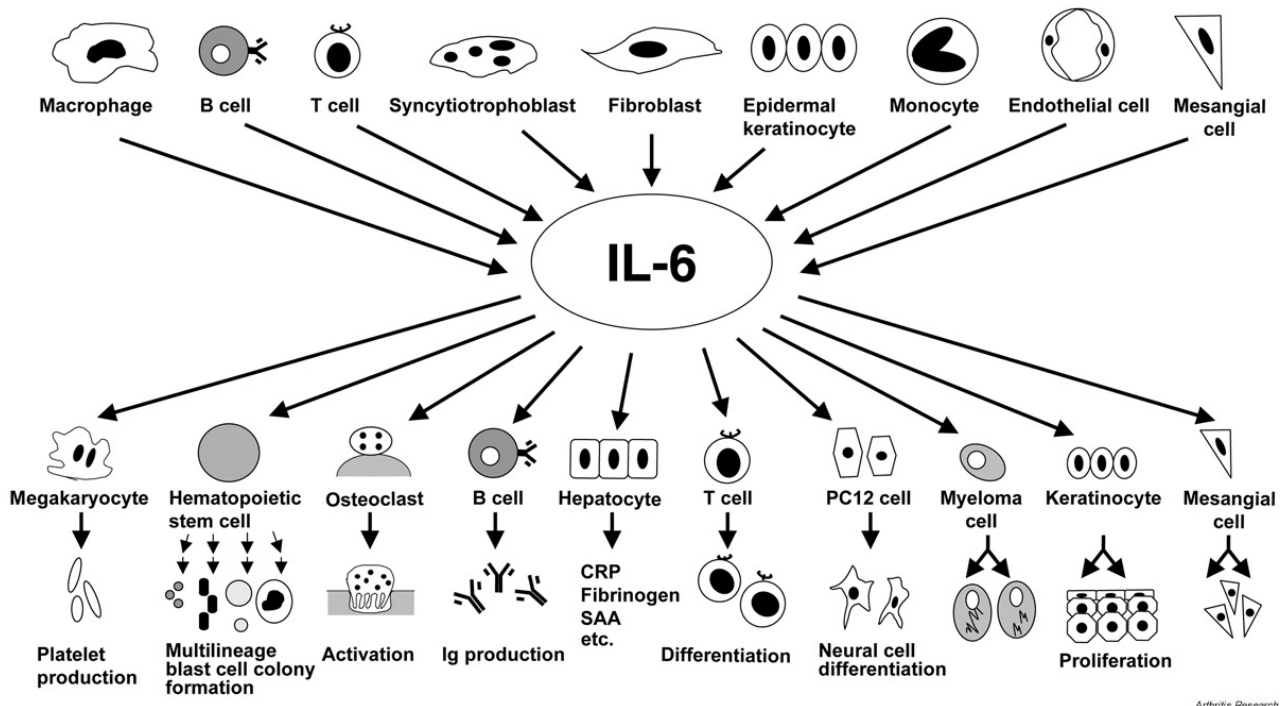
- 6) L'attività delle citochine è spesso ridondante. Molte funzioni originariamente attribuite esclusivamente ad una singola citochina si sono poi dimostrate comuni a molte citochine diverse.
- 7) Le citochine influenzano spesso la sintesi di altre citochine, in una cascata in cui una seconda o terza citochina può mediare l'azione biologica della prima; possono quindi avere un effetto antagonista, additivo o sinergico.
- 8) Le citochine, al pari di altri ormoni polipeptidici, iniziano la loro attività legandosi a recettori specifici presenti sulla superficie delle cellule bersaglio; si può avere un effetto endocrino, un effetto autocrino o un effetto paracrino.
- 9) L'espressione di molti recettori per le citochine è regolata da segnali specifici; tali segnali possono essere costituiti da un'altra citochina o dalla stessa citochina che, legandosi al proprio recettore, crea circuiti di inibizione o di amplificazione.
- 10) La maggior parte delle risposte cellulari alle citochine richiede la neosintesi di mRNA e di proteine.
- 11) Per molte cellule bersaglio le citochine si comportano come regolatori della divisione cellulare, cioè come fattori di crescita.

L'interleuchina 6 è una citochina pro-infiammatoria che regola la risposta umorale e cellulare e gioca un ruolo centrale nel processo infiammatorio e nel danno tissutale.

È una citochina pleiotropica che partecipa ad un gran numero di attività biologiche (Fig.4); viene prodotta da vari tipi di cellule linfoidi e non linfoidi come le cellule T, le cellule B, monociti, fibroblasti, cheratinociti, cellule endoteliali, mesangiali e varie cellule tumorali (Kishimoto et al. 1995). Induce la differenziazione dei macrofagi (Nicola et al. 1983).

IL-6 è presente in alte concentrazioni nella placca aterosclerotica (Seino et al. 1994; Rus et al. 1996) e la sua presenza è predittiva di futura malattia cardiovascolare (Ridker et al. 2000).

Alte concentrazioni di IL-6 sono presenti in pazienti con angina (Ikonomidis et al. 1999), inoltre è stato visto che pazienti che presentano elevate concentrazioni di IL-6 hanno una maggiore degenza ospedaliera (Biasucci et al. 1999).



*Arthritis Research*

Fig.3 Funzioni biologiche dell'interleuchina 6 (IL-6)

L'interleuchina 8 è una citochina che appartiene alla famiglia delle citochine; recenti studi hanno messo in evidenza che la produzione di IL-8 viene innalzata da alti livelli di LDL ossidate (Wang et al. 1996) e da alte concentrazioni di glucosio fornendo in questo caso una potenziale spiegazione per l'associazione tra iperglicemia e aterosclerosi (Temaru et al. 1997). IL-8 sintetizzata e secreta dalle cellule endoteliali attrae le cellule mononucleari alla parete arteriosa ed aumenta l'adesione dei monociti alle cellule endoteliali aortiche umane. (Berliner et al. 1990; Rollins et al. 1990; Takahara et al. 1996; Zeiher et al. 1995). Inoltre induce una "down-regulation" degli inibitori tissutali delle metallo proteinasi 1 (TIMP-1), favorendo la generazione della placca aterosclerotica instabile (Moreau et al. 1999). IL-8 può funzionare da chemoattrattante per le cellule-T (Xu et al. 1995), inoltre ricopre un ruolo nell'angiogenesi, infatti può indurre la proliferazione e la migrazione delle cellule muscolari lisce vascolari (Yue et al. 1994). E' stato dimostrato che IL-8 viene espressa nella placca di macrofagi nell'uomo. (Apostolopoulos et al. 1996; Wang et al. 1996) e negli aneurismi (Koch et al. 1992).

Uno studio recente ha evidenziato il coinvolgimento del recettore per IL-8 nel reclutamento dei monociti durante l'aterosclerosi (Gerszten et al. 1999).

E' stato visto che in topolini privi geneticamente di IL-8 o dei suoi corrispondenti recettori si ha una significativa riduzione della progressione della patologia aterosclerotica (Mach et al. 1998).

## **Scopo del Lavoro**

Sulla base di queste osservazioni abbiamo deciso di valutare, su cellule umane della serie bianca isolate dal sangue periferico (PBMC), la modulazione della risposta infiammatoria e aterogena esercitata dall'acido scichimico presente nel vino bianco.

In particolare siamo andati a valutare l'azione dell'acido scichimico nella modulazione delle citochine proinfiammatorie IL-6 e della citochina proaterogena IL-8.

## **Materiale e metodi**

Il lavoro è stato condotto su cellule mononucleari di sangue periferico umano (PBMC) isolati da donatori sani.

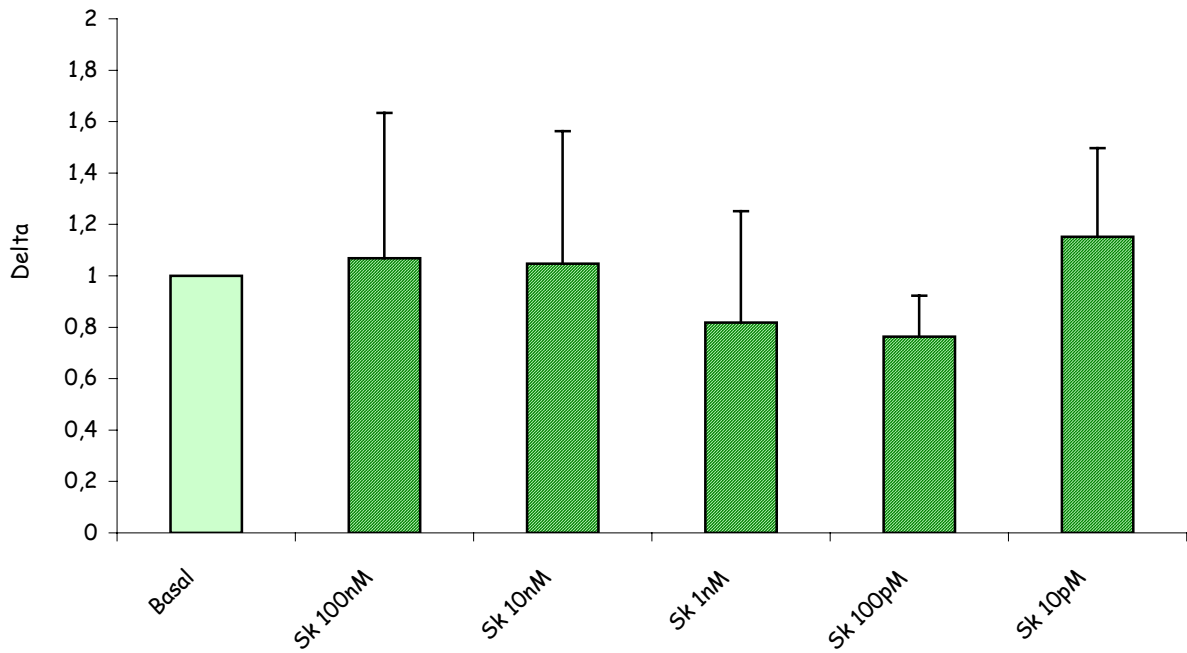
Lo studio è stato suddiviso in:

- Isolamento dei PBMC mediante gradiente di concentrazione Ficoll (Histopaque.1077, Sigma Aldrich Co.).
- Trattamento dei PBMC con lipopolisaccaride (LPS) da E. Coli e P. Maltofilia 100 ng/ml e con dosi diverse (10 pM, 100 pM, 1 nM, 10 nM, 100nM) di acido scichimico (Sigma). Ogni campione contiene 2.5 milioni di cellule in un volume finale di 1 ml di mezzo di coltura RPMI 1640 (Sigma Aldrich Co.) al quale è stato aggiunto siero fetale bovino, glutammina e antibiotici (2.5MI/ml).
- Incubazione dei campioni a 37°C per 24 ore.
- In seguito all'incubazione le cellule vengono lisate per mezzo di tre cicli di congelamento (-40° C) e scongelamento (37°C).
- Dosaggio delle citochine (IL-6 e IL-8) con tests immunoenzimatici (ELISA; Bender MedSystem).

### Risultati e Commenti

L'acido scichimico alle concentrazioni usate nei nostri esperimenti (10 pM, 100 pM, 1 nM, 10 nM, 100nM) non modifica il rilascio basale di IL-6 da PBMC non stimolati con LPS .

Questo dato mette in evidenza che l'acido scichimico non modifica le attività biologiche dei PBMC umani e quindi non altera la loro normale attività fisiologica (Fig. 5)

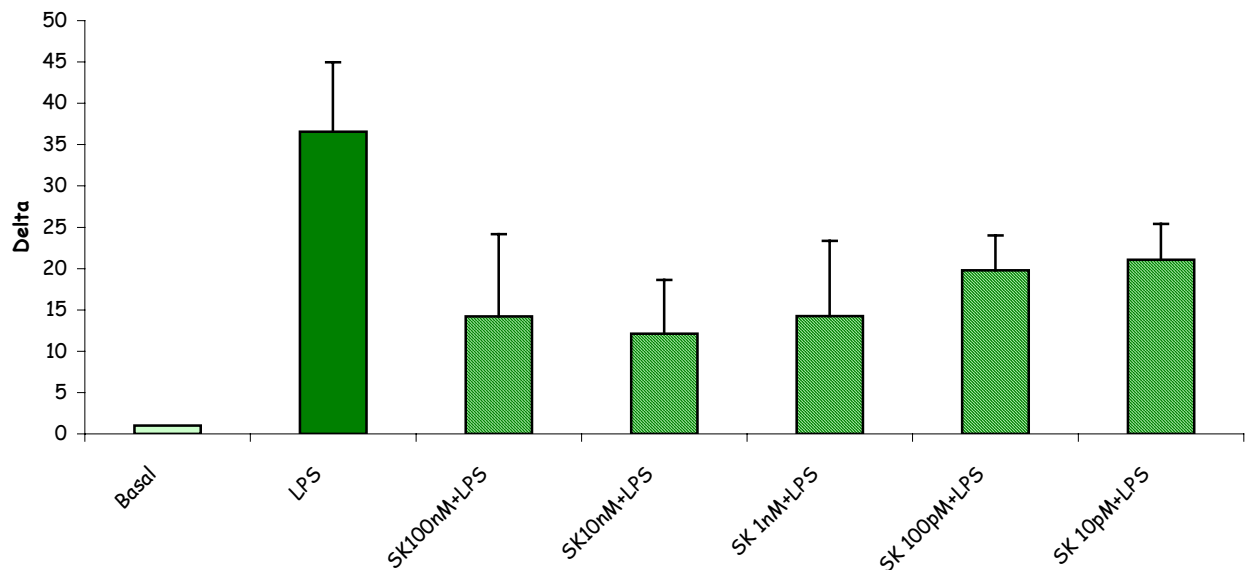


**Fig. 5** Effetto dell'acido Scichimico sulla secrezione di IL6 in PBMC umani non stimolati

La stimolazione dei PBMC con LPS, in accordo con i dati in letteratura, determina un aumento significativo della concentrazione di IL6 di  $36.5 \pm 9.2$  volte rispetto al basale ( $p < 0.01$ ).

La coincubazione con acido scichimico alle diverse dosi (10 pM, 100 pM, 1 nM, 10 nM, 100nM) riduce significativamente il rilascio di IL6, che incrementa da un massimo di  $21 \pm 4.3$  volte ad un minimo di  $12 \pm 6.5$  volte.

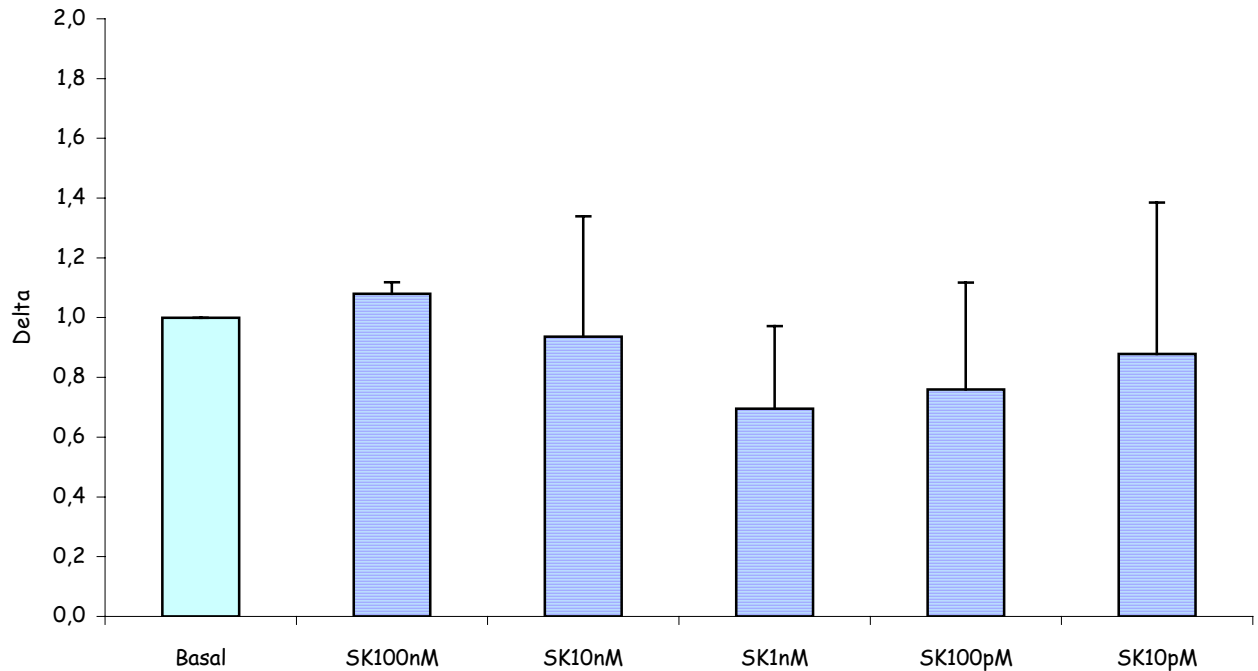
Questo risultato mette in evidenza che l'acido scichimico è in grado di ridurre l'espressione dell'IL-6 riducendo la sua concentrazione e quindi diminuendo la sua potenziale attività proinfiammatoria (Fig.6).



**Fig. 6** Effetto dell'acido Scichimico sulla secrezione di IL6 in PBMC umani stimolati con LPS

L'acido scichimico alle concentrazioni usate nei nostri esperimenti (10 pM, 100 pM, 1 nM, 10 nM, 100nM) non modifica il rilascio basale di IL-8 da PBMC non stimolati con LPS.

Questo dato mette in evidenza che l'acido scichimico non modifica le attività biologiche dei PBMC umani e quindi non altera la loro normale attività fisiologica (Fig. 7)

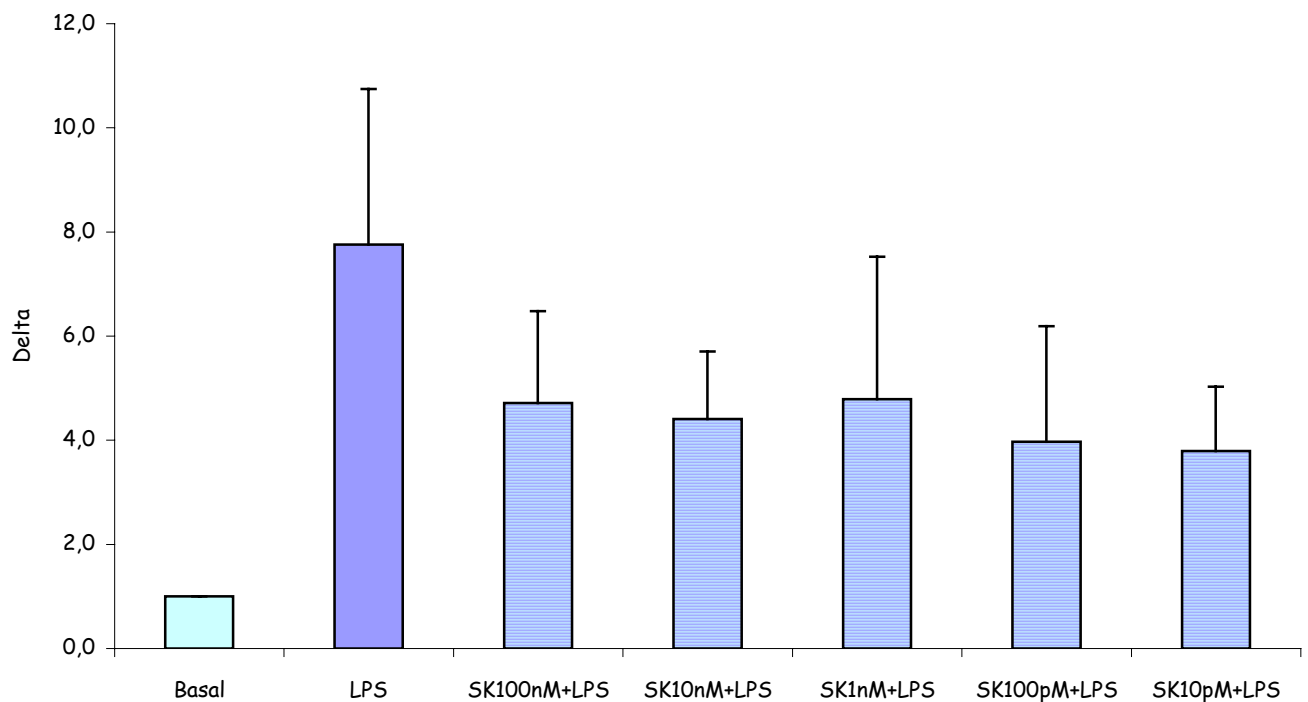


**Fig. 7 Effetto dell'acido Scichimico sulla secrezione di IL8 in PBMC umani non stimolati**

La stimolazione dei PBMC con LPS determina un aumento significativo della concentrazione di IL8 di  $7.6 \pm 2.9$  volte rispetto al basale ( $p < 0.01$ ).

La coincubazione con acido scichimico alle diverse dosi (10 pM, 100 pM, 1 nM, 10 nM, 100nM) riduce significativamente il rilascio di IL8, che incrementa da un massimo di  $4.7 \pm 2.7$  volte ad un minimo di  $3.7 \pm 1.2$  volte.

Questo risultato mette in evidenza che l'acido scichimico è in grado di ridurre l'espressione dell'IL-8 riducendo la sua concentrazione e quindi diminuendo la sua potenziale attività proaterogena. (Fig.8).



**Fig. 8 Effetto dell'acido Scichimico sulla secrezione di IL8 in PBMC umani stimolati con LPS**

## Conclusioni

L'assunzione di vino bianco determina una riduzione delle malattie cardiovascolari.

I nostri studi per la prima volta mettono in evidenza che tale azione può essere determinata dalla presenza nel vino bianco dell'acido scichimico.

Ad esempio se andiamo ad analizzare i vini bianchi provenienti dalle zone del vino Reno Montuni DOC e Reno Pignoletto DOC possiamo evidenziare la presenza di acido scichimico oltre che di altre sostanze, con ben nota attività antiossidante, a concentrazioni elevate.

Shikimic Acid	15-27 mg/l (0,0861- 0,155mM)
Quercetin	5-10 mg/l
Caffeic Acid	0.8-1.8 mg/l
Caftaric Acid (as Caffeic Acid)	15-39 mg/l
Tyrosol	<5 mg/l

**Tab.1: Analisi dei vini bianchi** (analisi effettuate dal Laboratorio Unione Italiana Vini (Verona))

L'acido scichimico si dimostra infatti capace di modulare la liberazione di IL-6, abbassandone la concentrazione, e quindi riducendo la presenza di questa citochina pro-infiammatoria responsabile tra le sue tante attività di attivare a livello endoteliale il processo aterosclerotico.

Inoltre l'acido scichimico si è dimostrato capace di inibire l'espressione dell'IL-8, citochina responsabile della progressione della placca aterogena.

I nostri esperimenti hanno inoltre messo in evidenza che l'acido scichimico non altera la funzionalità delle cellule e quindi non modifica le loro attività fisiologiche.

E' bene evidenziare che i risultati sono stati ottenuti con dosaggi molto inferiori rispetto alle concentrazioni ritrovate nel vino bianco Reno Montuni DOC e Reno Pignoletto DOC (concentrazioni dell'acido scichimico ritrovate: 0.0861-0.155 espresse in milliMoli).

Questi dati confermano gli studi epidemiologici dai quali si evidenzia che l'assunzione di vino bianco a dosaggi moderati apporta una ridotta incidenza di malattie cardio-vascolari nell'uomo.

## **Bibliografia**

1. Apostolopoulos J., Davenport P. Tipping P.G. Interleukin-8 production by macrophages from atheromatous plaques. *Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol.* **16** pp. 1007–1012, 1996.
2. Berliner J.A., Territo M.C., Sevanian A., Ramin S., Kim J.A., Bamshad B., Esterson M. Fogelman A.M. Minimally modified low density lipoprotein stimulates monocyte endothelial interactions. *J. Clin. Invest.* **85** pp. 1260–1266, 1990.
3. Biasucci LM., Liuzzo G., Fantuzzi G. et al. Increasing levels of interleukin (IL)-1Ra and IL-6 during the first 2 days of hospitalization in unstable angina are associated with increased risk of in-hospital coronary events. *Circulation*; **99**; 2079-2084, 1999.
4. El-Seedi HR., Ringbom T., Torssell K., Bohlin L. Constituents of *Hypericum laricifolium* and their cyclooxygenase (COX) enzyme activities. *Chem. Pharm. Bull.* **51**(12), 1439-1440, 2003.
5. Gerszten R.E., Garcia-Zepeda E.A., Lim Y.C., Yoshida M., Ding H.A., Gimbrone Jr M.A., Luster A.D., Lusinskas F.W. Rosenzweig A. MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions. *Nature* **398** pp. 718–723, 1999.
6. Huang FY., Xu QP., Sun JN., Guo YJ. Inhibitory effects of triacetylshikimic acid on platelet aggregation. *Acta Pharm. Sin.* **34**: 345-348, 1999.
7. Ikonomidis I., Andreotti F., Economou E., Stefanadis C., Toutouzas P., Nihoyannopoulos P. Increased proinflammatory cytokines in patients with chronic stable angina and their reduction by aspirin. *Circulation*. **100**; 793-798, 1999.
8. Jonasson L., Holm J., Skalli O., Bondjers G., Hansson G.K., Regional accumulations of T-cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque. *Arteriosclerosis* **6** pp. 131–138, 1986.
9. Kishimoto T., Akira S., Narazaki M., Taga T. Interleukin-6 family of cytokines and gp130. *Blood* **86**: 1243-1254, 1995.
10. Koch A.E., Polverini P.J., Kunkel S.L., Harlow L.A., DiPietro L.A., Elner V.M., Elner S.G. Strieter R.M. Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. *Science* **258** pp. 1798–1801, 1992.
11. Ma Y., Xu QP., Sun JN., Bai LM., Guo YJ., Niu JZ. Antagonistic effects of shikimic acid against focal cerebral ischemia injury in rats subjected to middle cerebral artery thrombosis. *Acta Pharm. Sin.* **20**: 701-704, 1999.

*Università degli Studi di Pisa*  
**Dipartimento di Neuroscienze**  
**Sezione di Farmacologia**  
**Direttore Prof. Giovanni Umberto Corsini**

12. Mach F., Schonbeck U., Sukhova GK., et al. Red of atherosclerosis in mice by inhibition of CD40 signalling. *Nature*. 394; 200-203, 1998.
13. Moreau M., Brocheriou I., Petit L., Ninio E., Chapman M.J. Rouis M. Interleukin-8 mediates downregulation of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 expression in cholesterol-loaded human macrophages: relevance to stability of atherosclerotic plaque. *Circulation* **99** pp. 420–426, 1999.
14. Nicola NA., Metcalf D., Matsumoto M., Johnson GR. Purification of a factor inducing differentiation in murine myelomonocytic leukemia cells. Identification as granulocyte colony-stimulating factor. *J. Biol. Chem.* 258: 9017-9023, 1983.
15. Pettersson K., Björk H., Bondjers G. Endothelial integrity and injury in atherogenesis. *Transplant Proc.* **25** pp. 2054–2056, 1993.
16. Proost P., Wuyts A., Van Damme J. The role of chemokines in inflammation. *Int. J. Clin. Lab. Res.* **26** pp. 211–223, 1996.
17. Renaud S. and de Lorgeril M. Wine, alcohol, platelet, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet*; 339, 1523, 1992.
18. Ridker PM., Rifai N., Stampfer RJ., Hennekens CH. Plasma concentration of interleukin-6 and the risk of future myocardial infarction among apparently healthy men. *Circulation*; 101; 1767-1772, 2000.
19. Robbins S.L, Kumar V. and Cotran R.S. “Robbins Pathologic basis of Disease”, 4<sup>th</sup> Edition, Ed. W.B. SAUNDERS COMPANY
20. Ross R. Atherosclerosis — An inflammatory disease. *New Engl. J. Med.* **340** pp. 115–126, 1999.
21. Rollins B.J., Yoshimura T., Leonard E.J. J. Pober S. Cytokine-activated human endothelial cells synthesize and secrete a monocyte chemoattractant, MCP-1/JE. *Am. J. Pathol.* **136** pp. 1229–1233, 1990.
22. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective of the 1990s. *Nature* **362** pp. 801–808, 1993.
23. Ross R. Atherosclerosis: a defence mechanism gone awry. *Am. J. Pathol.* **143**, pp. 987–1002, 1993.
24. Rus HG., Vlaicu R., Niculescu F. Interleukin-6 and Interleukin-8 protein and gene expression in human arterial atherosclerotic wall. *Atherosclerosis* 127: 263-271, 1996.
25. Seino Y., Ikeda U., Ikeda M. Et al. Interleukin-6 gene transcripts are expressed in human

- atherosclerotic lesions. *Cytokine* 6: 87-91, 1994.
26. Springer T.A. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* **76** pp. 301–314, 1994.
27. Takahara N., Kashiwagi A., Maegawa H., Shigeta Y. Lysophosphatidylcholine stimulates the expression and production of MCP-1 by human vascular endothelial cells. *Metabolism* **45** pp. 559–564, 1996.
28. Temaru R., Urakaze M., Satou A., Yamazaki K., Nakamura N. Kobayashi M. High glucose enhances the gene expression of interleukin-8 in human endothelial cells, but not in smooth muscle cells: possible role of interleukin-8 in diabetic macroangiopathy. *Diabetologia* **40** pp. 610–613, 1997.
29. Versini G., Mattivi F., Moser S., Pisoni A., Volontario 7thInt. Symp. Of Oenology 166-169, 2003.
30. Wang N., Tabas I., Winchester R., Ravalli S., Rabbani L.E. Tall A. Interleukin 8 is induced by cholesterol loading of macrophages and expressed by macrophage foam cells in human atheroma. *J. Biol. Chem.* **271** pp. 8837–8842, 1996.
31. Xu L., Kelvin D.J., Ye G.Q., Taub D.D., Ben-Baruch A., Oppenheim J.JWang. J.M. Modulation of IL-8 receptor expression on purified human T lymphocytes is associated with changed chemotactic responses to IL-8. *J. Leuk. Biol.* **57** pp. 335–342, 1995.
32. Yue T.L., Wang X., Sung C.P., Olson B., McKenna P.J., Gu and J.L. Feuerstein G.Z. Interleukin-8: a mitogen and chemoattractant for vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.* **75** pp. 1–7, 1994.
33. Zeiher A.M., Fisslthaler B., Schray-Utz and B. Busse R., Nitric oxide modulates the expression of monocyte chemoattractant protein 1 in cultured human endothelial cells. *Circ. Res.* **76** pp. 980–986, 1995.