



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

Dottorato di Ricerca in Medicina molecolare e Biotecnologie
Curriculum Biotecnologie applicate alla ricerca biomedica
Dipartimento di Biopatologia e Biotecnologie Mediche
SSD MED/09

VALUTAZIONE *IN VIVO* DELLO STRESS OSSIDATIVO E DELL'ATTIVAZIONE PIASTRINICA NELL'IPOBETALIPOPROTEINEMIA FAMILIARE: CONFRONTO CON L'IPERCOLESTEROLEMIA FAMILIARE E L'IPERALFALIPOPROTEINEMIA FAMILIARE

IL DOTTORE
DOTT.SSA ANTONINA GIAMMANCO

IL COORDINATORE
CH.MO PROF. CALOGERO CARUSO

IL TUTOR
CH.MO PROF. MAURIZIO AVERNA

IL CO TUTOR
CH.MO PROF. ANGELO BALDASSARE CEFALU'

INDICE

1. INTRODUZIONE	pag. 3
2. STRESS OSSIDATIVO	pag. 4
2.1 PATOGENESI	pag. 6
2.2 SISTEMI DI DIFESA	pag. 7
2.3 BIOMARKERS DI STRESS OSSIDATIVO	pag. 8
2.4 PEROSSIDAZIONE LIPIDICA E ISOPROSTANI	pag. 10
2.5 ISOPROSTANO-8	pag. 12
2.6 11-DEIDRO-TBX2	pag. 12
2.7 NOX-2 (NADPH ossidasi isoforma 2)	pag. 13
2.8 STRESS OSSIDATIVO E IPERCOLESTEROLEMIA	pag. 14
3. LIPIDOMICA DELLE PIASTRINE	pag. 14
3.1 Gli acidi grassi polinsaturi omega-3	pag. 16
3.2 Gli acidi grassi della serie omega-6	pag. 17
3.3 Acidi grassi saturi (SFA)	pag. 17
3.4 Acidi grassi monoinsaturi (MUFA)	pag. 18
3.5 Preparazione del campione	pag. 18
4. EVIDENZE DA TRIALS CLINICI	pag. 27
5. DISFUNZIONE ENDOTELIALE	pag. 28
6. INFIAMMAZIONE E ATEROSCLEROSI	pag. 29
6.1 IL-6	pag. 30
6.2 MOLECOLE DI ADESIONE	pag. 31
7. DISORDINI DEL TRASPORTO LIPOPROTEICO E RISCHIO CARDIOVASCOLARE	pag. 32

7.1 IPERCOLESTEROLEMIA FAMILIARE	pag. 32
7.2 IPOBETALIPOPROTEINEMIA	pag. 33
7.3 IPERALFALIPOPROTEINEMIA	pag. 37
8. SCOPO DELLO STUDIO	pag. 38
9. MATERIALI E METODI	pag. 40
10. ANALISI STATISTICA	pag. 45
11. RISULTATI	pag. 46
12. DISCUSSIONE	pag. 50
13. CONCLUSIONI	pag. 52
BIBLIOGRAFIA	pag. 53

1. INTRODUZIONE

Le malattie cardiovascolari su base aterosclerotica (infarto miocardico ed ictus cerebrale) rappresentano la prima causa di mortalità e morbilità della popolazione nei paesi industrializzati.

I classici fattori di rischio cardiovascolari quali l'ipercolesterolemia, l'età avanzata, l'ipertensione arteriosa, il diabete, il fumo di sigaretta, l'ipertrofia ventricolare sinistra, l'insufficienza cardiaca e l'inattività fisica rappresentano i principali fattori di rischio nello sviluppo delle complicanze cardiovascolari e sono tutti caratterizzati da un aumentato stress ossidativo e dalla presenza di disfunzione endoteliale.

Lo stress ossidativo e l'infiammazione sono profondamente collegati, in quanto lo stimolo infiammatorio può portare alla produzione, da parte delle cellule fagocitiche, di numerosi radicali liberi; entrambi sono legati alla disfunzione endoteliale, in quanto l'endotelio può essere sorgente ed obiettivo dello stress ossidativo e partecipa alla risposta infiammatoria.

Lo stress ossidativo è definito come il danno tissutale derivato dallo squilibrio tra un'eccessiva generazione di composti ossidanti e l'insufficienza dei meccanismi di difesa.

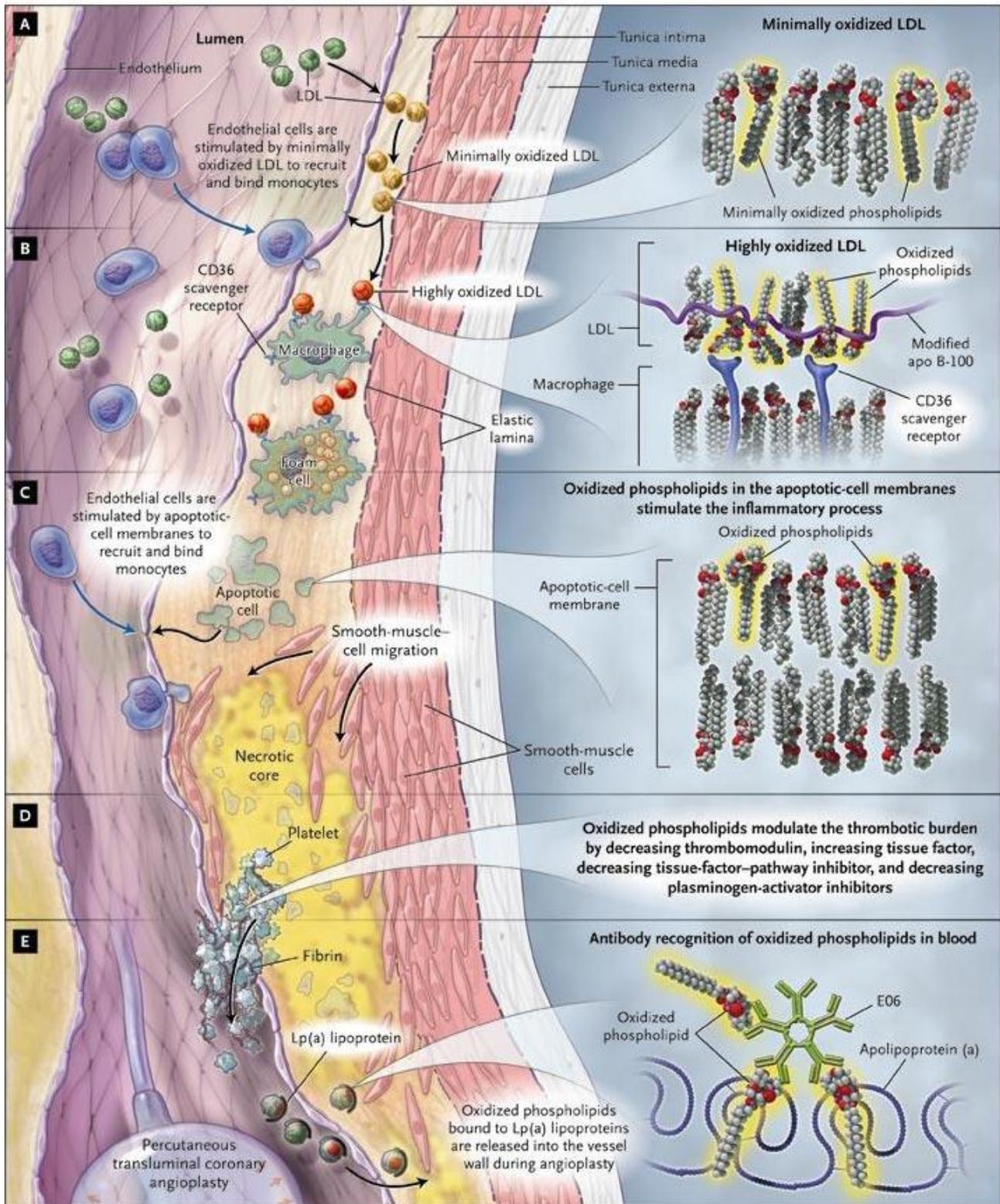
La generazione di composti ossidanti avviene fisiologicamente in risposta ad insulti infiammatori e nei processi di riparazione tissutali. D'altro canto un'impropria attivazione dei processi ossidativi può essere cronicamente presente in situazioni patologiche, come ad esempio l'ipertensione arteriosa ed il diabete mellito, contribuendo al danno tissutale e cellulare (1).

2. STRESS OSSIDATIVO

Lo stress ossidativo, definito come un'eccessiva attività dei ROS (Reactive Oxygen Species – Radicali liberi dell'ossigeno), è associato all'ipercolesterolemia così come a numerose patologie quali l'ipertensione, il diabete, l'invecchiamento.

Nel 1989 Steinberg ed il suo gruppo avanzarono l'ipotesi che l'aterogenicità delle Low-density lipoprotein (LDL) fosse aumentata dalle modificazioni ossidative. Studi sperimentali hanno evidenziato come i ROS possano essere coinvolti in diversi aspetti del processo aterosclerotico. I ROS possono promuovere l'infiammazione, alterare il tono vascolare, attivare le metalloproteinasi, causare aggregazione piastrinica, stimolare la proliferazione di cellule muscolari lisce. Tutti questi eventi sono coinvolti nella lesione aterosclerotica. Le cellule endoteliali, le cellule muscolari lisce, i macrofagi sono una sorgente di ossidanti che possono favorire l'ossidazione delle LDL. La teoria "response to injury" dell'aterosclerosi ipotizza che l'endotelio possa essere danneggiato da un fattore fisico o chimico, dall'infezione o dalle stesse LDL ossidate (LDL-ox). Le LDL-ox possono danneggiare direttamente le cellule endoteliali ed indurre l'espressione di molecole di adesione e fattori chemiotattici. Questi processi portano all'attivazione e al legame dei monociti e linfociti T alle cellule endoteliali. Quindi le cellule endoteliali, i leucociti e le cellule muscolari lisce producono chemochine che favoriscono la migrazione dei monociti e dei linfociti nello spazio sub-endoteliale, dove si avrà la formazione delle cellule schiumose e della successiva placca (2).

Il ruolo fondamentale dello stress ossidativo nell'aterosclerosi è stato evidenziato in un modello sperimentale su cavie con deficit di apoE, un modello di aterosclerosi, dove l'escrezione urinaria di 8-ISO PGF 2-alpha era aumentata (3-4); inoltre, nell'uomo l'8-ISO PGF 2-alpha è stato trovato localizzato nella placca aterosclerotica (5).



Berliner J and Watson A. N Engl J Med 2005;353:9-11

Le LDL raggiungono lo spazio sub-endotheliale e vengono ossidate.

Le cellule infiammatorie vengono attratte dalla parete vascolare, entrano in contatto con le LDL-ox attraverso i recettori scavengers e si trasformano in cellule schiumose (foam cells).

Le membrane cellulari delle cellule andate incontro ad apoptosi continuano a richiamare cellule infiammatorie. I fosfolipidi ossidati possono promuovere la trombosi attraverso la modulazione di fattori trombotici. La lipoproteina Lp(a), che si accumula nelle lesioni aterosclerotiche, può essere riscontrata in elevate concentrazioni mediante l'uso di E06, un anticorpo diretto contro i fosfolipidi ossidati

2.1 PATOGENESI

I processi ossidativi avvengono principalmente nei mitocondri, dove l'enzima citocromo ossidasi è responsabile di circa il 90% del metabolismo dell'ossigeno. Questo enzima agisce trasferendo 4 elettroni all'ossigeno in una reazione che produrrà 2 molecole d'acqua come prodotto finale. Questo complesso enzima contiene 4 gruppi redox, ognuno dei quali immagazzina un elettrone. Solo quando tutti e quattro i gruppi saranno ridotti avverrà il trasferimento simultaneo dei 4 elettroni alla molecola di ossigeno, senza passaggi intermedi che potrebbero portare alla formazione di prodotti intermedi dell'ossigeno altamente reattivi. Nonostante ciò una piccola frazione (1-2%) avviene attraverso passaggi intermedi che portano alla formazione di radicali liberi. In risposta a questo problema nei mammiferi si sono evoluti sistemi intracellulari con attività antiossidante, tali sistemi includono sistemi enzimatici idrofili e lipofili che possono legarsi con questi radicali liberi e favorirne l'eliminazione, prima che essi possano recare danno alle componenti strutturali funzionali della cellula (7-8).

Mentre i mitocondri sono produttori "accidentali" di stress ossidativo, i fagociti deliberatamente utilizzano alti livelli di ossigeno per difendersi dai patogeni. La catena respiratoria di questi fagociti è nota utilizzare 4 enzimi (NADPH ossidasi, superossido dismutasi, ossido nitrico sintetasi e mieloperossidasi) per produrre le specie reattive intermedie quali: anione superossido, idrogeno perossido,ossido nitrico e acido ipocloroso per la distruzione dei microorganismi. Più recentemente

è stata individuata una nuova via ossidativa che permette la nitrosilazione degli agenti patogeni direttamente per mezzo della mieloperossidasi (9-10).

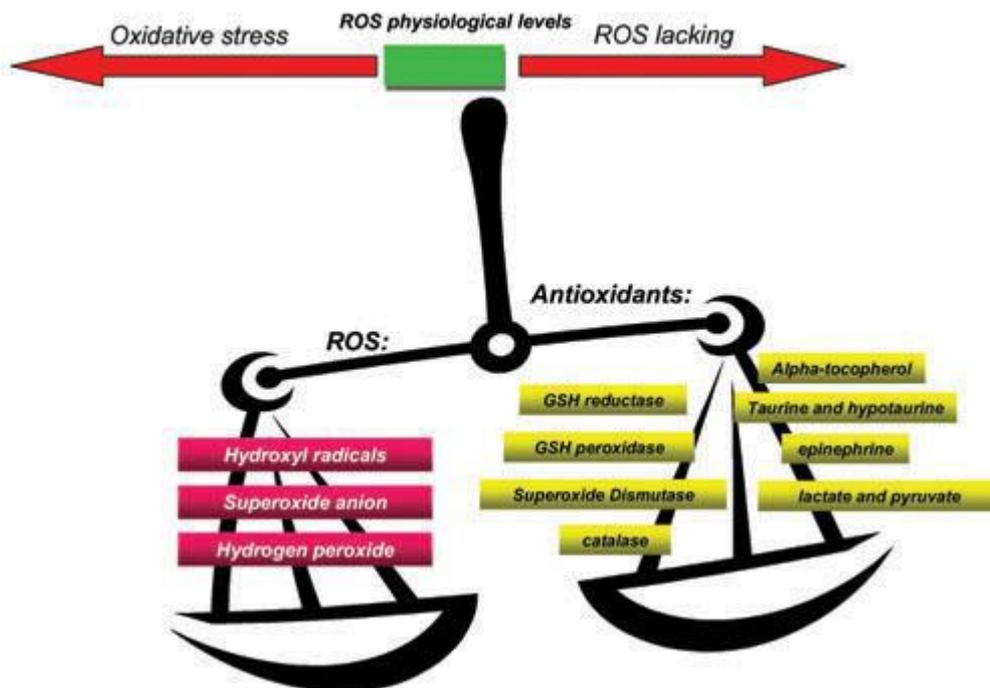
Ognuno di questi ossidi di derivazione fagocitica può danneggiare direttamente i tessuti, recenti studi hanno enfatizzato il ruolo delle reazioni ossidative cloranti catalizzate dalla mieloperossidasi. La mieloperossidasi è una delle proteine più abbondanti dei fagociti, costituendo approssimativamente il 5% delle proteine dei neutrofili e l'1% delle proteine dei monociti. La mieloperossidasi viene rapidamente secreta sotto stimolo. L'analisi istologica del tessuto aterosclerotico ha mostrato la presenza di mieloperossidasi attiva nelle cellule schiumose, 3-Clorotirosina e di tirosina (prodotti dell'ossidazione della tirosina da parte della mieloperossidasi) nelle LDL ossidate e nelle lesioni aterosclerotiche (10). Queste reazioni sottolineano il ruolo centrale dell'attivazione fagocitica e delle reazioni associate all'infiammazione nell'aumentato stato ossidativo e nell'aterosclerosi.

2.2 SISTEMI DI DIFESA

Per contrastare gli effetti dei radicali liberi e lo stress ossidativo in natura sono presenti sistemi di difesa enzimatici e non enzimatici. La superossido dismutasi (SOD) agisce come prima linea di difesa nei confronti delle molecole di ossigeno; la catalasi riduce l'H₂O₂ in acqua mentre l'enzima glutatione perossidasi (GSH-Px) riduce i lipidi perossidati utilizzando il GSH come donatore di elettroni (11-12).

L'antiossidante non enzimatico più attivo è il Glutatione, che è uno scavenger per H₂O₂, OH⁺ e ossidanti clorinati. La Vitamina E protegge le membrane cellulari dalla perossidazione lipidica formando un radicale tocoferolico a bassa reattività. La vitamina C lega direttamente O₂⁻ e OH⁻. Le proteine come la ferritina, la transferrina, l'albumina esercitano un'azione antiossidante non enzimatica legando ioni reattivi (13-14) Nel plasma il più importante sistema antiossidante è fornito dai gruppi tiolici, che sono largamente localizzati sulle molecole di albumina (15-16).

Anche l'ascorbato è un importante sistema extracellulare antiossidante ma l'albumina per mezzo di tali gruppi tiolici fornisce una protezione antiossidante almeno dieci volte superiore.



2.3 BIOMARKERS DI STRESS OSSIDATIVO

Il termine biomarker è stato assunto dalla epidemiologia molecolare dai biologi per descrivere il cambiamento molecolare di una molecola indotto dalla reazione con una sostanza reattiva:ossigeno, nitrato o aldeide. Questo termine è applicato per prodotti derivati dai lipidi, dalle proteine o dal consumo di antiossidanti; le reazioni chimiche che producono tali reazioni possono essere di differente natura.

Lo Stress Ossidativo esercita la sua azione quando la produzione di sostanze ossidanti supera la capacità antiossidante dell'organismo. Quando ciò accade ne risulta l'ossidazione di macromolecole quali proteine, lipidi, carboidrati e DNA. Data la minima quantità e la breve emivita dei Radicali liberi, clinicamente la quantificazione dello Stress Ossidativo si effettua sulla misura di differenti sostanze più stabili prodotte dalle reazioni ossidative (prodotti di perossidazione lipidica, AGE,

prodotti dell'ossidazione di proteine e lipidi, derivati dell'ossidazione dell'Acido nucleico) o anticorpi diretti contro epitopi ossidati (anticorpi anti-LDL ossidate)(16-17).

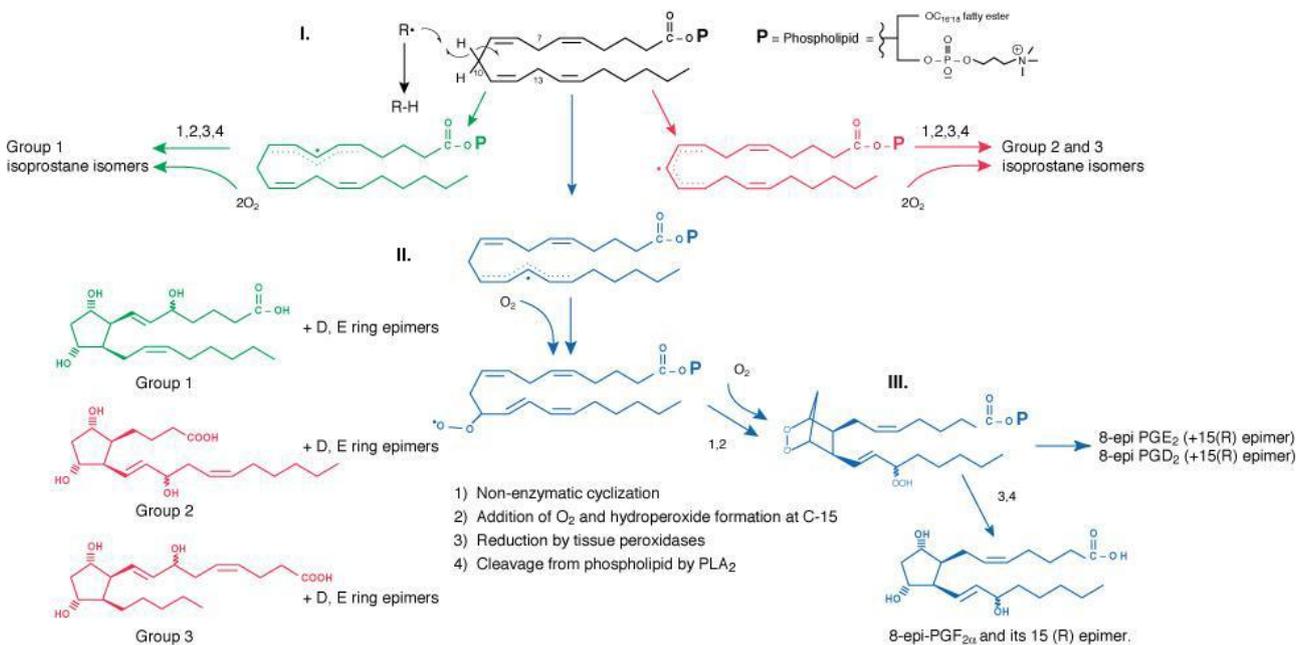
Allo stesso modo possono essere quantificati antiossidanti enzimatici (superossido dismutasi, catalasi, glutazione perossidasi) e non enzimatici (Glutazione, Vitamina C, Vitamina E, Proteine di fase acuta negativa)(18-21).

Markers di stress ossidativo ed anti-ossidanti

Markers of Oxidative Stress	Anti-Oxidants
Lipid Peroxidation	
Acroleyn	
Malonyldialdehyde	Enzymatic
4-Hydroxynonenal	Superoxide dismutase
F2-isoprostanes	Catalase
TBARS	Glutathione peroxidase
Advance Lipid oxidation products	
Oxidized LDL antibodies	Non-Enzymatic
	Glutathione
Protein Oxidation	Vitamin E
Advance oxidat protein products	Vitamin C
	Ferritin
Carbohydrate oxidation	Transferrin
AGE	Albumin
	Etc..
Nucleic Acid oxidation	
8-Hydroxy-2-deoxiguanosine	

2.4 PEROSSIDAZIONE LIPIDICA E ISOPROSTANI

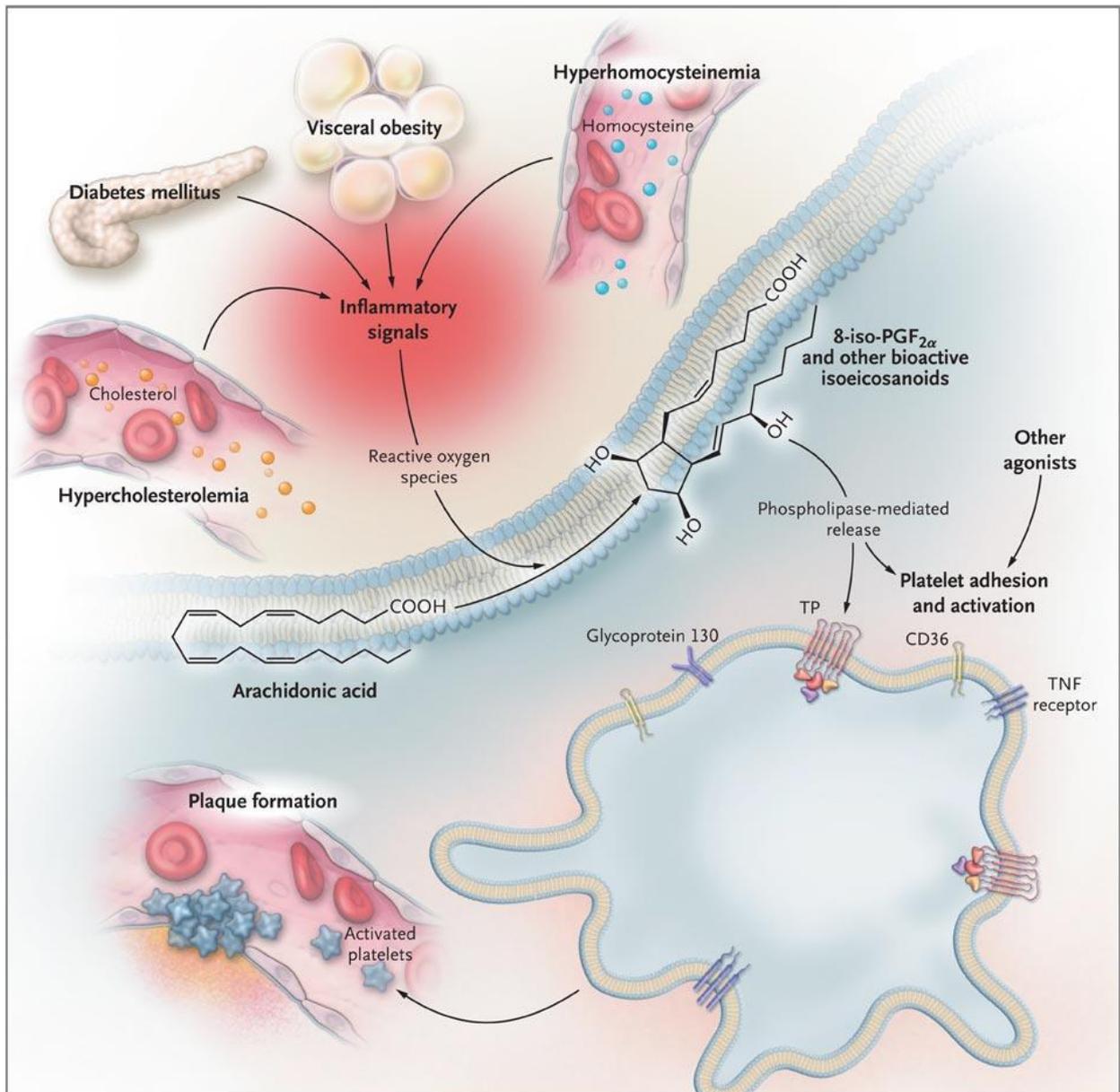
Nel plasma dei pazienti ipercolesterolemici sono state riscontrate elevate concentrazioni di prodotti di ossidazione lipidica in confronto ai soggetti sani. Per esempio, l'acido arachidonico è stato dimostrato andare incontro ad una reazione di perossidazione per via non enzimatica, indotta dai radicali liberi, producendo una serie di composti simil prostaglandinici (F2-like) chiamati F2 isoprostani (22)



Le sorgenti di radicali liberi che principalmente contribuiscono alla formazione di isoprostani in vivo sono multiple. Queste includono la produzione di anione superossido da parte di radicale idrossilico dal sistema mitocondriale di trasporto degli elettroni, la generazione di anione superossido dalla NADPH ossidasi, radicali idroperossilici dalla lipoossigenasi

Gli F2-isoprostani, vengono dapprima sintetizzati sui fosfolipidi e secondariamente rilasciati nel plasma, dove possono essere dosati in forma libera o legati ai fosfolipidi, e rappresentano quindi un valido metodo di stima di stress ossidativo.

Gli isoprostani posseggono diverse attività proaterogene che includono la vasocostrizione in diversi letti vascolari, favoriscono l'aggregazione piastrinica e stimolano la produzione delle cellule muscolari lisce. Le concentrazioni plasmatiche di isoprostani dipendono principalmente dalla loro produzione, piuttosto che dal metabolismo ed escrezione, pertanto risultano ottimi indicatori di stress ossidativo in vivo (23)



Davì G and Patrono C. N Engl J Med 2007

Il “Biomarker of Oxidative Stress Study” (BOSS) ha mostrato che gli isoprostani sono il miglior indice di stress ossidativo in vivo.

Una diminuita disponibilità di NO ed un aumentato stress ossidativo sono stati riscontrati in numerosi studi su soggetti ipercolesterolemici. Gli isoprostani urinari sono stati riscontrati elevati nei pazienti a rischio per futuri eventi cardiovascolari. E' stato evidenziato che i soggetti ipercolesterolemici hanno un'elevata escrezione di 8-ISO-PGF2alpha e Trombossano (24-27).

2.5 ISOPROSTANO-8

L'isoprostano-8 è un metabolita dell'acido arachidonico derivante dalla perossidazione non enzimatica dei lipidi di membrana e delle lipoproteine ad opera dei radicali liberi dell'ossigeno e, pertanto, marcatore di stress ossidativo in vivo. L'ossidazione di questi fosfolipidi è la maggior parte delle volte causata dai radicali liberi dell'ossigeno.

Sono normalmente presenti nel sangue e nelle urine, in maggiori quantità se l'individuo è sotto stress ossidativo e si presentano in campioni di tessuto quando non correttamente conservati o sottoposti ad ossidazione.

L' 8-isoprostano (8-epiPGF2a) ha dimostrato di avere attività biologica; è un potente vasocostrittore polmonare e renale ed è riconosciuto come un mediatore della sindrome epato-renale, dell'artrite reumatoide, dell'aterosclerosi e della carcinogenesi. 8-epiPGF2a è proposto come marker di deficit anti-ossidante ovvero dello stress ossidativo.

Livelli elevati si possono trovare nei fumatori. Può anche essere un indicatore dell'integrità dei lipidi in campioni conservati, per esempio nel siero, nel plasma, o in preparati cellulari.

2.6 11-DEIDRO-TROMBOSSANO-2

E' prodotto dalla scomposizione del trombossano A2 ed è rilasciato dalle piastrine attivate. I livelli urinari di questo metabolita possono essere usati per monitorare la risposta alla terapia

con aspirina nella prevenzione di malattie cardiovascolari e in patologie dove l'attivazione piastrinica risulta notevole (28).

2.7 NOX-2 (NADPH ossidasi isoforma 2)

La NADPH ossidasi è considerata la più importante fonte cellulare di stress ossidativo e la sua attivazione è stata associata al possibile sviluppo di danno cellulare (29).

Le isoforme della NADPH ossidasi, che comprendono la NOX1, NOX2 NOX4 e NOX5, regolano l'attivazione macrofagica, che rappresenta un evento centrale nelle fasi iniziali dell'aterosclerosi. Nox1 e Nox2 svolgono un ruolo proaterogeno mentre NOX4 sembra avere effetti ateroprotettivi. Il ruolo di NOX5 sulle funzioni vascolari rimangono tuttora indeterminate (30). L'isoforma Nox2 assume un ruolo cruciale nella risposta immunitaria innata a microrganismi, tramite la produzione di ROS. Si trova nelle cellule endoteliali e nelle piastrine dove presenta proprietà vasocostrittrici e aggreganti, rispettivamente (31).

Studi su pazienti affetti da malattia granulomatosa cronica x-linked con deficit ereditario di Nox2, non solo hanno una compromessa risposta immunitaria, ma in associazione alla perdita di funzione di NOX2, presentano anche compromissione della trombosi dipendente dalle piastrine e ridotto carico aterosclerotico carotideo. Studi sperimentali hanno inoltre dimostrato che Nox2 è iperespresso nella placca aterosclerotica, correlando significativamente con lo stress ossidativo: l'inibizione farmacologica di Nox2 è associata ad una ritardata progressione aterosclerotica in modelli animali. Inoltre il ruolo di Nox2 nella trombosi associata alle piastrine è stata confermata da esperimenti che hanno mostrato un'attivazione piastrinica compromessa in cavie trattate con un inibitore di Nox2 oppure un'alterata aggregazione piastrinica associata a ridotta trombosi piastrino-indotta in un modello di topo Knock-out per Nox2.

2.8 STRESS OSSIDATIVO E IPERCOLESTEROLEMIA

Dati sperimentali e clinici dimostrano che elevate concentrazioni plasmatiche di colesterolo totale e LDL si associano ad alterazione della funzione endoteliale, alta incidenza di aterosclerosi e complicanze trombotiche. Poiché l'iperattivazione piastrinica è stata considerata responsabile o almeno contribuente alle complicanze tromboemboliche acute come infarto miocardico e ictus ischemico, diversi studi hanno valutato la funzione piastrinica nell'ipercolesterolemia familiare (32).

Nell'ipercolesterolemia sono stati descritti un'incrementata sensibilità piastrinica agli effetti aggreganti di diversi agonisti e la produzione di metaboliti dell'acido arachidonico in associazione ad una aumentata attività delle fosfolipasi piastriniche. E' stato visto come piastrine isolate in soggetti affetti da ipercolesterolemia familiare, sottoposte a lavaggi e incubate con acido arachidonico producano elevati quantitativi di trombossano (TX) B₂ che correla in modo lineare con i livelli plasmatici di colesterolo. Quest'alterata funzionalità piastrinica è stata correlata al contenuto di colesterolo delle piastrine, che riflette probabilmente uno scambio tra lipoproteine plasmatiche e piastrine. Infatti piastrine arricchite artificialmente con colesterolo mostrano un'accentuata capacità di aggregazione ed elevata conversione di arachidonato a TXB₂. In linea con questa ipotesi è la scoperta che il contenuto di colesterolo e fosfolipidi delle piastrine è significativamente più elevato in soggetti affetti da ipercolesterolemia familiare rispetto ai controlli sani e che questa alterata composizione piastrinica si associa ad un'accentuata produzione di TXA₂ dalle piastrine (33).

3. LIPIDOMICA DELLE PIASTRINE

La lipidomica è una disciplina che studia i percorsi metabolici dei lipidi cellulari nei sistemi biologici. Il termine *lipidoma* descrive il profilo lipidico completo di una cellula, di un tessuto o di un organismo. In un sistema biologico, i cambiamenti fisiologici o patologici che avvengono nelle cellule creano una perturbazione della componente lipidica; la lipidomica permette

l'identificazione e la quantificazione delle specie lipidiche contenute nelle cellule e lo studio delle loro interazioni reciproche e con gli altri metaboliti. Lo studio di queste alterazioni fornisce informazioni utili per la comprensione dei meccanismi biochimici, che sono alla base di numerose patologie correlate al metabolismo dei lipidi. Alla luce dell'enorme potenziale degli acidi grassi nelle indagini metaboliche, risulta interessante la determinazione dei livelli di acidi grassi nel plasma e nelle piastrine, al fine di un loro possibile utilizzo come markers per diverse patologie cliniche.

Il dosaggio degli acidi grassi plasmatici consente una visione metabolica recente (acidi grassi assunti negli ultimi 7-10 giorni, la cui presenza nel plasma è transitoria). Questa valutazione rivela lo stato attuale del paziente al momento del prelievo (34).

Il profilo plasmatico è indicativo di uno squilibrio lipidico ed è suggerito per una valutazione generale.

Il dosaggio degli acidi grassi di membrana consente una visione più ampia (i globuli rossi hanno un'emivita di 3 mesi) e permette di valutare l'effettiva incorporazione di acidi grassi essenziali nelle membrane della cellula. Questa valutazione è raccomandata per il monitoraggio dell'efficacia d'interventi d'integrazione e in caso di patologie infiammatorie croniche. Il dosaggio degli acidi grassi delle membrane dei trombociti può fornire informazioni rilevanti in caso di disturbi neuropsicologici e patologie a carico dell'apparato cardiovascolare.

Conoscere il profilo degli acidi grassi è utile per la prevenzione e la cura di svariate patologie come:

- Patologie cardiovascolari
- Dislipidemie e disordini metabolici familiari o acquisiti
- Diabete
- Obesità
- Dermatiti

- Allergie
- Sterilità
- Malattie infiammatorie croniche
- Disturbi neurologici
- Deficit visivi
- Patologie tumorali

Soltanto eliminando i fattori di rischio di queste patologie multifattoriali è possibile prevenirle.

Inoltre, conoscere il profilo degli acidi grassi è importante in situazioni fisiologiche particolari: per es. in gravidanza e durante l'allattamento, per un corretto sviluppo del feto e una corretta crescita del bambino.

3.1 Gli acidi grassi polinsaturi omega-3:

Acido α -linolenico (C18:3; LNA): è considerato il capostipite dei PUFA n-3. Da esso si origina l'acido eicosapentaenoico (EPA) che a sua volta viene trasformato in docosaesaenoico (DHA). Studi recenti indicano che una dieta ricca di LNA determina una riduzione della mortalità per patologie cardiovascolari gravi, senza influenzare colesterolemia e pressione arteriosa.

Acido eicosapentaenoico (C20:5; EPA): il precursore delle prostaglandine della serie 3 possiede una importante proprietà antiaggregante.

Acido docosaesaenoico (C22:6; DHA): è il principale costituente dei fosfolipidi del cervello. Studi negli animali hanno dimostrato che ridotti livelli DHA nel cervello perinatale sono associati a ridotta arborizzazione neurale, patologie sinaptiche e deficit dei neurotrasmettitori serotonina e dopamina, deficit neurocognitivi, ma anche ansia, aggressività e depressione. Nei bambini nati pretermine si osserva una ridotta maturazione della materia grigia corticale, difficoltà nell'apprendimento e di mantenere l'attenzione, aumentato rischio di ADHD e schizofrenia (75). E' molto presente anche nei fosfolipidi della retina, svolge quindi un ruolo importante per lo sviluppo e la maturazione cerebrale e del tessuto retinico.

Tuttavia, una recente ricerca ha rivelato che l'aumento dei livelli di DHA nella retina a causa di una dieta ricca di acido linoleico aumenta la vulnerabilità della retina per stress foto-ossidativo. Questo studio ha valutato i potenziali effetti negativi di assunzione di DHA su individui di solito esposti a condizioni di alta intensità di luce. I risultati hanno mostrato che il DHA ha promosso la proliferazione delle cellule dell'epitelio pigmentato retinico (RPE) senza citotossicità in condizioni di oscurità. Tuttavia, il DHA ha suscitato effetti deleteri sulle cellule RPE in condizioni di luce ad alta intensità. Cioè, gli elevati livelli di DHA hanno inibito la proliferazione cellulare, distrutto l'integrità della membrana cellulare, aumentato rilascio del fattore di crescita vascolare endoteliale (VEGF) e ridotto la funzione fagocitaria. Inoltre, il DHA elevato ha aumentato a livello intracellulare e extracellulare le specie reattive dell'ossigeno e a livello extracellulare dei prodotti della perossidazione lipidica in condizioni di luce ad alta intensità. Questi risultati dimostrano che DHA aumenta la vulnerabilità della retina attraverso la perossidazione lipidica (34; 75).

3.2 Gli acidi grassi della serie omega-6:

Acido linoleico (C 18:2; LA): è considerato il precursore dei PUFA n-6.

Acido arachidonico (C 20:4; AA): deriva dal precursore LA (n-6). Insieme al DHA è importante per lo sviluppo embrionale e l'accrescimento del bambino. E' il precursore di prostaglandine e leucotrieni pro-infiammatori.

3.3 Acidi grassi saturi (SFA)

Gli SFA sono considerati grassi nocivi per l'organismo. Oltre ad apportare calorie, favoriscono l'irrigidimento della membrana cellulare, inducendo la diminuzione della sua permeabilità. In questo modo sono ostacolati gli scambi di sostanze tra le cellule e tra la cellula e l'ambiente esterno. A causa di queste proprietà gli SFA, se consumati in eccesso, possono indurre un

aumento dei livelli di colesterolo, un aumento del rischio di contrarre patologie cardiovascolari, di andare incontro ad obesità, insorgenza di diabete e sindrome metabolica.

Tra gli acidi grassi saturi ricordiamo: **Acido palmitico** (C16:0) e **Acido stearico** (C18:0):

3.4 Acidi grassi monoinsaturi (MUFA)

Acido oleico (C18:1): molto diffuso nell'olio d'oliva riduce i livelli di colesterolo LDL e di conseguenza riduce il rischio di patologie cardiovascolari. Tuttavia, livelli eccessivi di acido oleico sono stati descritti in alcune forme patologiche, ad esempio nella cirrosi epatica (34).

In questo lavoro, sono stati impiegati gli standard "37 Component FAMES Mix (10 mg/mL in methylenechloride)", "Methylheptadecanoate" e "Diethyl phthalate-3,4,5,6-d4" acquistati dalla Sigma-Aldrich (St.Louis, MO, USA). I solventi Esano, Cloroformio, Metanolo ed acqua sono ad elevato grado di purezza.

Preparazione del campione

L'estrazione dei lipidi, precedente all'analisi, è indispensabile al fine di isolarli dalla matrice e di rimuovere eventuali fonti d'interferenza, come proteine e zuccheri. Il metodo più efficiente è l'estrazione liquido-liquido (LLE, *Liquid-Liquid Extraction*) proposta da Folch nel 1957^[1].

L'indagine è stata eseguita, in parallelo, su due campioni di sangue intero provenienti dallo stesso individuo, posti rispettivamente uno in provetta addizionata con EDTA (tappo viola) l'altro in provetta addizionata con citrato (tappo azzurro). Ricordiamo che l'acido etilendiamminotetracetico (EDTA) è un anticoagulante che esplica la sua azione sequestrando lo ione calcio, indispensabile per il processo di coagulazione, e formando con esso composti insolubili. Rappresenta l'anticoagulante di scelta per l'esame emocitometrico poiché:

- Non altera il volume degli eritrociti.

- Non provoca emolisi.
- Riduce al minimo la lisi dei leucociti.
- Limita l'aggregazione piastrinica.
- E' rapidamente solubile nel sangue.

Tuttavia, in alcuni soggetti l'EDTA può causare un calo piastrinico, in quanto a causa sua le piastrine si ammassano con conseguente riduzione della conta piastrinica. Si tratta di una falsa diminuzione perché i livelli di piastrine nel soggetto sono normali. Per evitare questa condizione, si è ritenuto opportuno condurre il test sia con provette standard (EDTA) sia con provette contenente un altro anticoagulante come il citrato.

Il citrato, è utilizzato soprattutto come sale sodico, anch'esso sequestra il calcio e lo rende insolubile impedendo la coagulazione. A differenza dell'EDTA il citrato non causa aggregati piastrinici e viene perciò utilizzato per lo studio dei fattori della coagulazione (fibrinogeno, tempo di protrombina ecc.) e della funzionalità piastrinica.

I campioni vengono centrifugati a 1350 rpm per 5 minuti. Da questa centrifugazione soft otteniamo la separazione del campione di sangue in emazie e **PRP** (plasma ricco in piastrine); poiché le emazie hanno peso molecolare maggiore precipitano sul fondo della provetta mentre il PRP, di peso molecolare inferiore sarà al di sopra delle emazie.

Il PRP viene recuperato, posto in un tubo *Schotte* sottoposto ad una seconda centrifugazione questa volta più spinta, a 3500 rpm per 5 minuti; come risultato di questa centrifugazione si ottiene la formazione di un pellet di piastrine, cioè la sedimentazione delle piastrine sul fondo della provetta e al di sopra delle piastrine vi è il **PPP** cioè il plasma povero di piastrine che viene recuperato e posto in una eppendorf.

Una volta allontanato il PPP, nel tubo Schott rimangono solo le piastrine a cui si aggiungono 10 µL di soluzione 300 ng/µL di eptadecanoato di metile, usato come Standard Surrogato (SS) per

calcolare il recupero di estrazione. Le piastrine sono, in seguito, sottoposte all'azione degli ultrasuoni per 10 minuti a 25 °C per provocare la rottura delle membrane piastriniche e recuperare in maniera ottimale gli acidi grassi presenti.

Parallelamente si prelevano 190 µL di PPP e si pongono in un tubo Schott a cui si addiziona anche un volume di 10 µL di soluzione 300 ng/µL di eptadecanoato di metile (SS).

I due campioni sono sottoposti ad estrazione liquido liquido, perciò in step successivi si aggiungono al campione:

- 950 µL di una miscela cloroformio/metanolo 1:2 (v/v)
- 313 µL di cloroformio
- 313 µL di acqua distillata
- Cloruro di sodio.

Il sistema risultante è posto in centrifuga per 15 minuti a 5000 rpm. Al termine di quest'operazione, il contenuto di ciascun tubo Schott presenta due fasi distinte, acquosa e organica, interfacciate da una fase solida di natura proteica. La fase organica (inferiore) viene recuperata mediante l'ausilio di una Pasteur di vetro e trasferita in vials *Weathonda* 2 mL e portata a secco, sotto un leggero flusso di N₂. Una volta che il solvente è evaporato, si procede alla derivatizzazione degli acidi grassi nei corrispondenti esteri metilici, aggiungendo 50 µL di una soluzione di KOH 2M in metanolo ed incubando per 15 minuti a temperatura ambiente.

Trascorsi 15 minuti si aggiungono 490 µL di esano e un volume di 10 µL di soluzione 300 ng/µL di Dep-d4 usato come Standard Interno (IS).

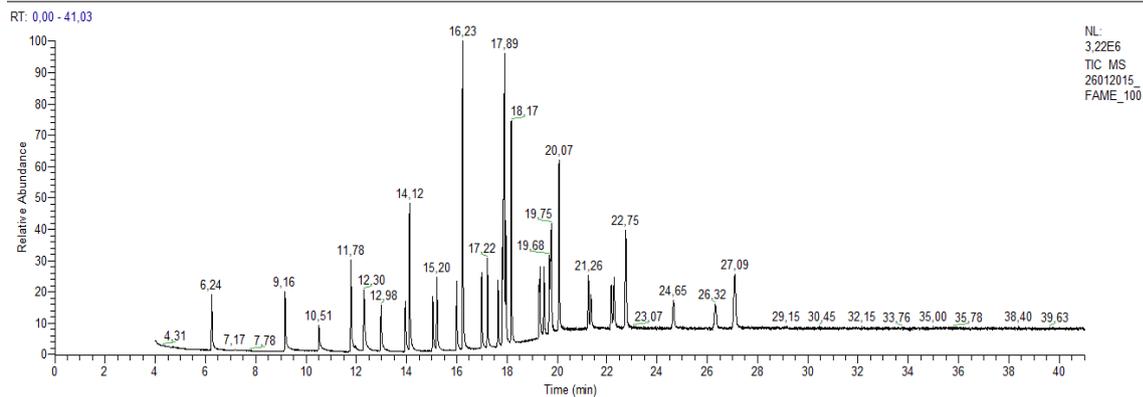
Le analisi quali-quantitative sono state effettuate mediante l'utilizzo di un gascromatografo (Trace GC ULTRA) munito di colonna capillare in silice fusa 30 m di diametro 0,25 mm con un film interno dello spessore di 0,25 µm (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm i.d. thickness con fase stazionaria TraceGold TG-1MS), utilizzando elio come carrier (velocità di flusso = 1 ml/min, flusso totale = 20 ml/min). Per l'iniezione è stata utilizzata la modalità splitless con flusso di

spurgo 20 ml/min e temperatura di 250°C. Il volume di campione iniettato è stato di 1 µl ed è stato prelevato mediante l'autocampionatore (Tris Plus RSH *Thermo Scientific*). La programmata di temperatura utilizzata per la suddetta analisi è riportata in

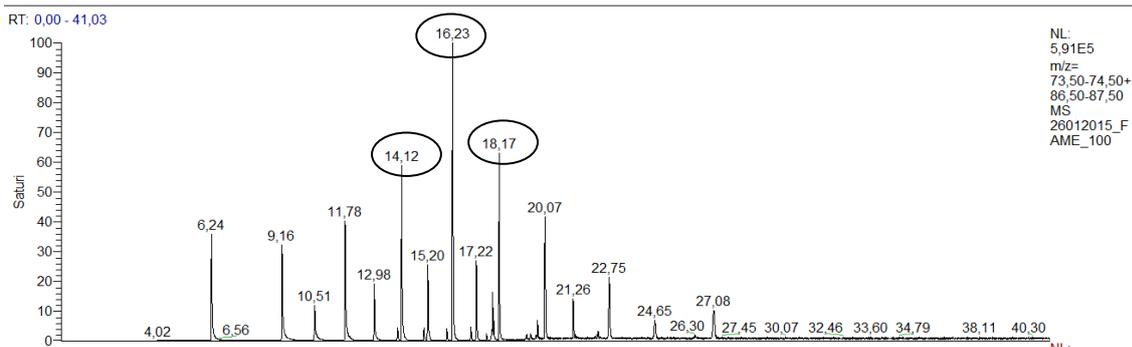
Tab.1: programmata di temperatura GC

	Rate (°C/min)	Temp (°C)	Hold Time (minutes)
Initial	-	70	2
Ramp 1	10	240	22

Gli analiti sono stati identificati mediante i tempi di ritenzione (RT) e gli spettri di massa (m/z). Gli spettri sono stati acquisiti registrando la corrente ionica totale, TIC (modalità FULL SCAN), mentre le analisi dei campioni e delle soluzioni standard utilizzate per costruire le rette di taratura sono state effettuate in modalità EXTRACT ION. Tale modalità consente di registrare un cromatogramma degli ioni creato prendendo da una serie di scansioni spettrali di massa i valori di intensità a un valore unico di massa o di un range di masse in funzione del tempo. L'identificazione di ogni analita nei campioni è stata effettuata confrontando i tempi di ritenzione con quelli dei picchi ottenuti dall' analisi della soluzione standard descritte in precedenza, ed inoltre la ulteriore conferma si è avuta per confronto con gli spettri di massa registrati nella libreria (Library Nist MS versione 2.0) dello strumento. A titolo di esempio nelle Figure seguenti è riportato il cromatogramma della soluzione standard FAME MIX 100 ng/µL

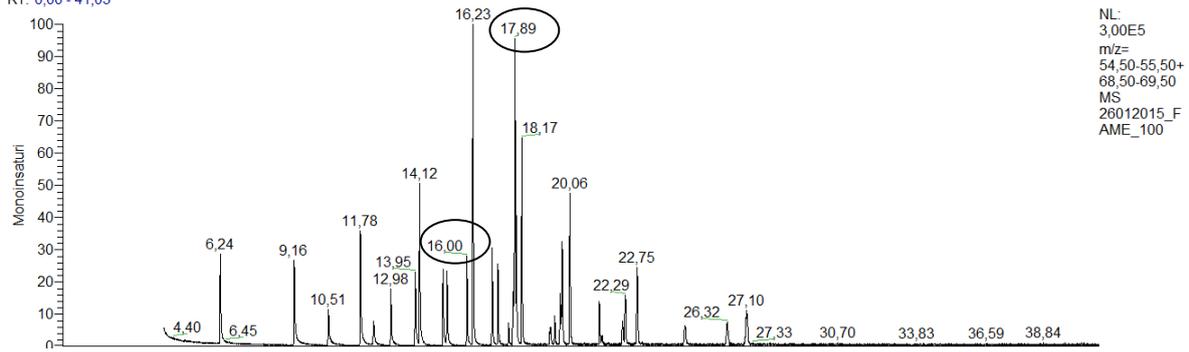


Cromatogrammi relativi al FAME MIX 100 ng/μL della TIC



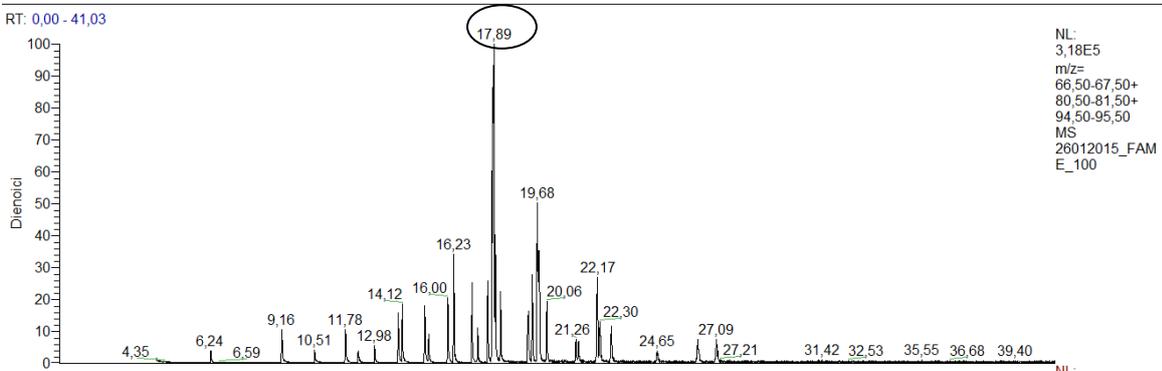
Cromatogrammi relativi al FAME MIX 100 ng/μL degli acidi grassi saturi, con le rispettive masse caratteristiche.

RT: 0,00 - 41,03



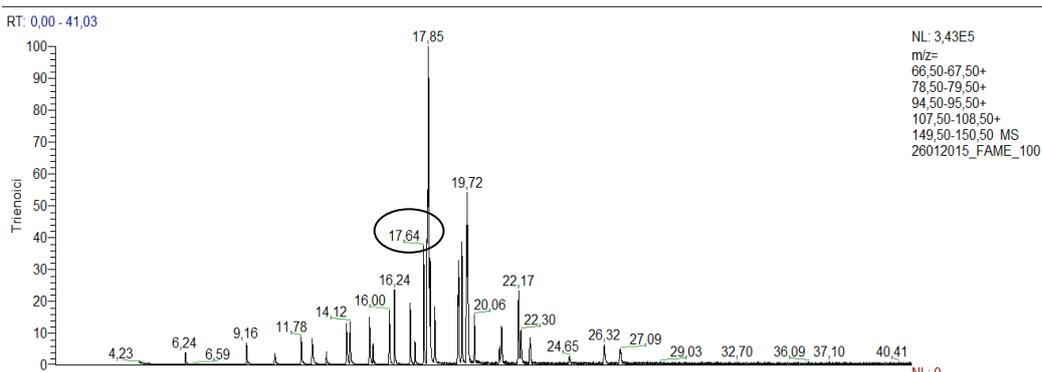
Cromatogrammi relativi al FAME MIX 100 ng/μL degli acidi grassi monoinsaturi con le rispettive masse caratteristiche.

RT: 0,00 - 41,03

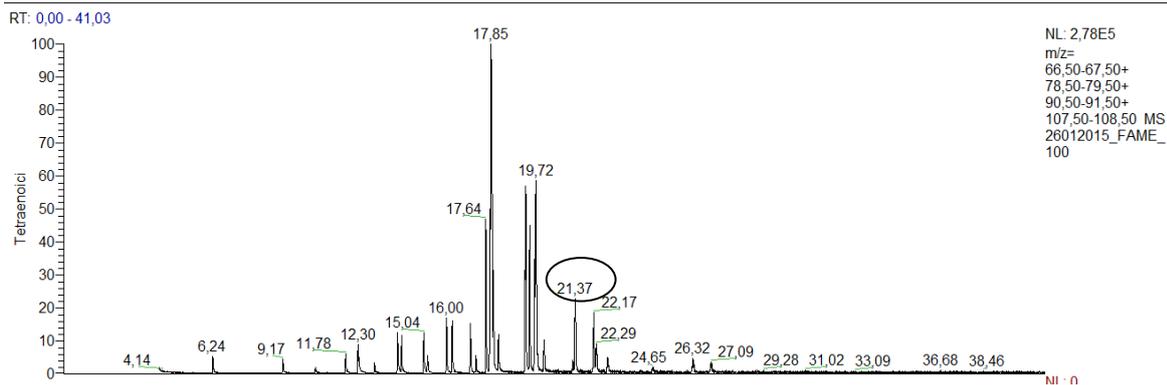


Cromatogrammi relativi al FAME MIX 100 ng/μL degli acidi grassi dienoici con le rispettive masse caratteristiche.

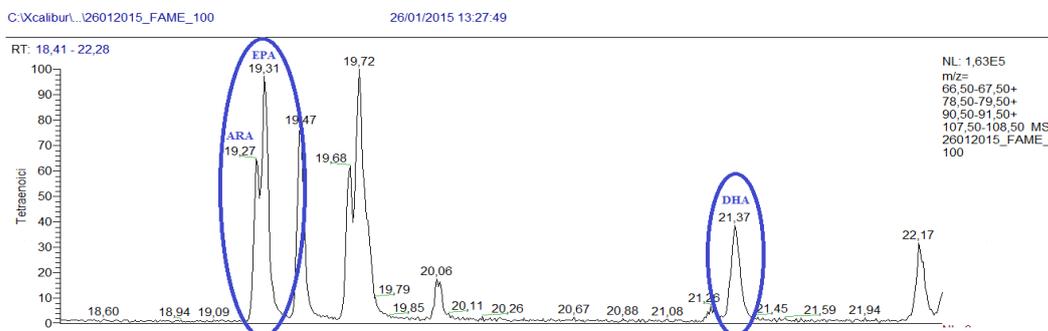
RT: 0,00 - 41,03



Cromatogrammi relativi al FAME MIX 100 ng/μL degli acidi grassi trienoici con le rispettive masse caratteristiche.



Cromatogrammi relativi al FAME MIX 100 ng/ μ L degli acidi grassi tetraenoico con le rispettive masse caratteristiche.



Dettaglio del cromatogrammi relativo al FAME MIX 100 ng/ μ L degli acidi grassi tetraenoico (ARA-EPA-DHA) con le rispettive masse caratteristiche.

Al fine della determinazione quantitativa degli acidi grassi, si è scelto di utilizzare la standardizzazione interna per ottenere risultati molto accurati, sfruttando il rapporto tra l'area del picco dell'analita d'interesse e l'area del picco di una sostanza, definita *standard interno*, appositamente aggiunta in concentrazione nota. In questo modo, si risolve il problema della variabilità delle quantità delle sostanze realmente iniettate in colonna. Lo standard interno deve,

ovviamente, essere una sostanza non presente nella miscela da analizzare, deve generare un segnale ben risolto dagli altri componenti e dovrebbe presentare struttura e caratteristiche chimico-fisiche analoghe all'analita *target*. Dopo aver iniettato una miscela standard/analita, in rapporto 1:1, al fine di determinare il fattore di correzione, si procede all'iniezione del campione in esame, cui è stata aggiunta una quantità nota di standard interno; effettuata la corsa, si calcolano le aree relative all'analita ed allo standard e si determina la concentrazione dell'analita, secondo la relazione:

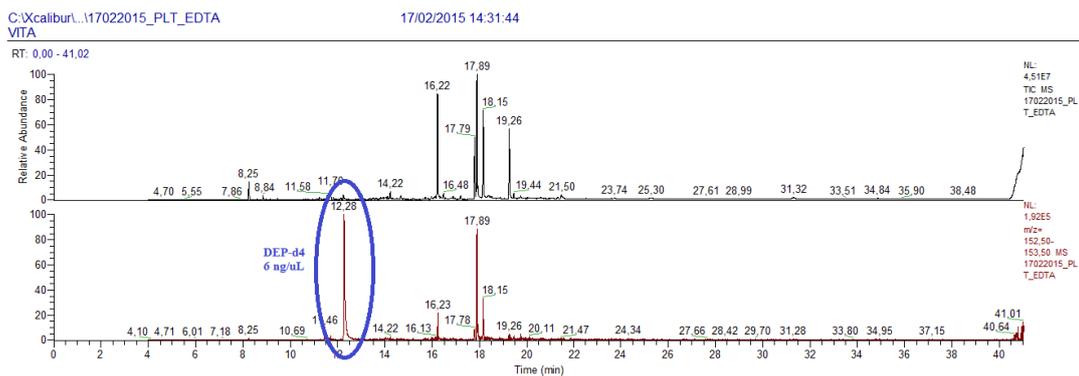
$$C_{IS}: C_a = S_{IS}: S_a^{Corr}$$

dove C_{IS} è la concentrazione dello standard interno,

C_a è la concentrazione dell'analita

S_{IS} è l'area del segnale relativo allo standard interno

S_a^{Corr} è l'area del segnale relativo all'analita, opportunamente corretta.



4. EVIDENZE DA TRIALS CLINICI

Da numerosi studi epidemiologici emerge una forte evidenza che i livelli di colesterolo totale e di colesterolo-LDL costituiscano fattori di rischio indipendenti di morbilità e mortalità cardiovascolare e che tale correlazione sia diretta e continua (35-38). A conferma di ciò numerosi trials randomizzati e placebo-controllati hanno dimostrato che la riduzione dei livelli di colesterolo totale e di colesterolo-LDL indotta dalle più svariate terapie con statine si associa a riduzione del rischio cardiovascolare (37).

Lo stress ossidativo e' un importante fattore associato ad aumentato rischio di aterotrombosi e ad attivazione piastrinica (38).

Numerosi modelli animali di stress ossidativo supportano l'ipotesi che le specie reattive dell'ossigeno (ROS) abbiano un ruolo causale nell'aterosclerosi e in altre patologie cardiovascolari. Studi sull'uomo sembrano confermare tale ipotesi e lo stress ossidativo pertanto viene attualmente considerato come il meccanismo unificante per diversi fattori di rischio cardiovascolare, compresi i livelli di colesterolemia totale e di colesterolemia-LDL.

L'incrementata formazione di ROS in corso di stress ossidativo, può indurre un'accentuata perossidazione lipidica dei fosfolipidi della membrana cellulare oppure delle LDL circolanti, portando ad un aumentata produzione di F2-isoprostani, una famiglia di isomeri di prostaglandine, generati a partire dall'acido arachidonico per mezzo di un meccanismo catalizzato dai radicali liberi. Gli F2-isoprostani possono modulare l'attivazione delle piastrine indotta da alti livelli degli altri agonisti. La costante relazione tra la velocità di formazione di F2-isoprostani e trombociti (TX) in parecchie malattie metaboliche suggerisce che un'attivazione piastrinica TX-dipendente può essere mediata, almeno in parte, dall'accentuata perossidazione lipidica (35-36).

In un recente studio si è osservato che in soggetti con fenotipo “basso HDL”, uno dei maggiori fattori indipendenti di rischio cardiovascolare (36), sia sani che affetti da malattia coronarica, vi è un’ aumentata escrezione urinaria di 8-iso-PGF_{2α} e di 11-deidro-trombossano(TX)B₂, markers *in vivo* rispettivamente di perossidazione lipidica indotta dallo stress ossidativo e di attivazione piastrinica (36); tale escrezione si riduce dopo modifiche dello stile di vita (regolare esercizio fisico) o dopo trattamento farmacologico (fenofibrato) in grado di indurre incremento dei livelli di HDL-colesterolo (39).

5. DISFUNZIONE ENDOTELIALE

La definizione più accettata di disfunzione endoteliale riguarda il bilancio tra produzione di sostanze vaso dilatanti o vaso costringenti da parte di cellule endoteliali.

Recentemente è stato suggerito che la disfunzione endoteliale includa non soltanto una ridotta vasodilatazione, bensì una condizione pro infiammatoria pro trombotica associata ad una ridotta vasodilatazione in risposta a specifici stimoli dell’endotelio (37-38)

La disfunzione endoteliale, che è coinvolta nello sviluppo dell’aterosclerosi, aumenta il rischio cardio- e cerebro vascolare (39). A livello endoteliale la più importante reazione consiste nella generazione di ossido nitrico dalla L-Arginina per mezzo dell’enzima Ossido nitrico sintetasi. La presenza di Stress Ossidativo può agire direttamente sulla Tetraidrobiopterina, che è un fattore essenziale per la funzione del NOS. Quando avviene l’ossidazione di tale molecola la sintesi di NO si riduce. Inoltre, l’ossido nitrico sintetasi può cominciare a generare anione superossido aumentando lo stress ossidativo già presente. Antiossidanti quali la Vitamina C e il GSH possono riconvertire la Tetraidrobiopterina alla forma non ossidata e normalizzare la sintesi di NO.

Va detto inoltre che l’ossigeno può reagire direttamente con NO, infatti si può avere la generazione di Perossinitrito, un composto altamente reattivo che aggiunge nitrati ai residui tirosinici delle proteine, potendo alterare le funzioni di molti enzimi e danneggiare i tessuti.

Diversi inibitori della NOs partecipano alla disfunzione endoteliale; il più noto è l'ADMA (dimetil arginina asimmetrica) (40). Quando la concentrazione di tale sostanza è elevata la produzione di NO è ridotta.

6. INFIAMMAZIONE E ATEROSCLEROSI

L'infiammazione e la disfunzione endoteliale sono associate con diverse patologie cardiovascolari quali l'aterosclerosi e la patologia coronarica.

L'American Heart Association nel 2002 ha indicato la proteina C reattiva ad alta sensibilità come marker di scelta nella stratificazione del rischio cardiovascolare. Sebbene numerosi altri markers infiammatori (come il fibrinogeno, la conta dei leucociti, la proteina amiloide A) siano stati testati, la PCR ha mostrato la maggiore sensibilità, stabilità, precisione ed accuratezza.

In particolare, riguardo il rischio cardiovascolare, dai dati basati sullo studio di oltre 40000 persone, è stato proposto di stabilire che una hsPCR <1mg/L indica un basso rischio, tra 1 e 3 rischio moderato, >3 rischio elevato.

La Proteina C Reattiva appartiene alla famiglia delle pentrassine, è una proteina non glicosilata, prodotta principalmente a livello epatico, anche se recentemente è stato ipotizzato che possa essere prodotta dai macrofagi e dalle cellule muscolari lisce nelle lesioni aterosclerotiche, nel rene, neuroni e nei macrofagi alveolari (41)

Opinione diffusa è che la sintesi avvenga sotto stimolo di Interleuchina 6 (IL-6), ma anche altre citochine quali il Tumor Necrosis Factor alpha (TNFalpha) e Interleuchina 1 (IL-1) possono indurne la produzione. Recenti evidenze suggeriscono che stimolo per la produzione di PCR possa essere dato dalla perossidazione lipidica o da infezioni da citomegalovirus che possono portare alla produzione di citochine pro infiammatorie che porteranno al rilascio di Proteina C Reattiva. Anche il tessuto adiposo può produrre citochine quali il TNFalpha e IL-6 (42-43)

Patologie che sono state dimostrate essere associate ad elevati livelli di Proteina C Reattiva includono l'infiammazione cronica, la sindrome metabolica, il diabete tipo 2, l'ipertensione e l'insufficienza renale cronica(44).

La Proteina C Reattiva è presente nella parete vascolare dove induce l'espressione di molecole di adesione VCAM1 e ICAM1 da parte delle cellule endoteliali e funge da chemochina per i macrofagi. La Proteina C Reattiva lega le cellule danneggiate ed attiva il sistema del complemento in un processo che porterà alla formazione della placca aterosclerotica; la Proteina C Reattiva è associata alla disfunzione endoteliale ed alla aterosclerosi probabilmente attraverso processi che riducono la sintesi di ossido nitrico.

6.1 IL-6

Venne identificata per la prima volta come fattore pro-proliferativo dei linfociti B e venne inizialmente nominata BSF2 o IFNB2. A causa dei suoi numerosi effetti è stata identificata più volte indipendentemente e ha avuto numerose denominazioni: per esempio HPGF (hybridoma plasmacytoma growth factor) e HSF (hepatocyte stimulating factor).

Fanno parte della famiglia di IL-6, con cui condividono il recettore di membrana GP 130: LIF (leucemia inhibitory factor), OM (oncostatin M) e IL-11. La struttura dell'IL-6 è caratteristica della famiglia delle citochine a 4 eliche up-up, down-down. Tra le eliche C e D si osserva una quinta struttura ad elica (E), il sito di legame per il recettore specifico per IL-6 (IL6Ra) si trova in questo tratto. IL-6 è una citochina estremamente pleiotropica, coinvolta sia nell'ambito dell'immunità innata che di quella specifica. Viene prodotta da un gran numero di tipi cellulari, in particolare da fagociti mononucleati, cellule endoteliali, fibroblasti, linfociti T attivati in risposta ai microbi e ad altre citochine, quali IL-1 e TNF, e ha effetto su altrettanti tipi cellulari. Sembra essere importante nella cronicizzazione dell'infiammazione, in quanto media il passaggio dallo stadio acuto a quello cronico (44).

Nell'ambito dell'immunità innata l'IL-6 opera in sinergia con l'IL-1 nell'induzione delle proteine di fase acuta da parte delle cellule epatiche, contribuendo così agli effetti sistemici dell'infiammazione (la cosiddetta "risposta di fase acuta"). Nell'ambito dell'immunità specifica essa stimola la crescita

di linfociti B in fase di differenziazione in cellule producenti anticorpi. Agisce inoltre come fattore di crescita anche per plasmacellule neoplastiche (mielomi); molte cellule mielomatose secernono in effetti IL-6 come fattore di crescita autocrina. L'IL-6 (citochina messaggera di secondo livello), agendo a livello epatico, stimola la sintesi di proteine di fase acuta, prima fra tutte la proteina C-reattiva (PCR): tale proteina potrebbe quindi costituire un marker sierologico sistemico dell'attività infiammatoria locale, a livello della placca aterosclerotica.

6.2 MOLECOLE DI ADESIONE

Le molecole di adesione comprendono la famiglia delle Selectine (composta dalle E-selectine, P-selectine e L-selectine) e la famiglia delle Immunoglobuline che includono Intercellular Adhesion Molecole (ICAM-1) e Vascular Adhesion Molecole (VCAM-1).

Le molecole di adesione sono proteine che regolano l'interazione tra endotelio e leucociti; un aumento della loro espressione sulla superficie endoteliale induce un'augmentata adesione dei leucociti all'endotelio, in particolare dei monociti. Questo processo rappresenta la prima tappa della formazione dell'ateroma. Il particolar modo le cellule endoteliali presenti nelle lesioni aterosclerotiche esprimono elevate concentrazioni di ICAM-1, VCAM-1 ed E-Sel.

Studi clinici hanno evidenziato l'importanza delle molecole di adesione in numerose patologie legate all'infiammazione. E' stato dimostrato che i ROS peggiorano la vasodilatazione endotelio dipendente per mezzo della ridotta produzione di NO, ma studi in vitro su cellule endoteliali umane hanno evidenziato come i ROS possano altresì provocare la produzione di NF-KB, un fattore nucleare in grado di indurre la stimolazione del gene per V-CAM (44).

Numerosi studi che hanno valutato il legame tra molecole di adesione, aterosclerosi e patologia cardiovascolare, hanno dimostrato che i livelli plasmatici di ICAM-1 e VCAM-1 sono legati alla patogenesi dello stroke, patologia coronarica e morte.

7. DISORDINI DEL TRASPORTO LIPOPROTEICO E RISCHIO CARDIOVASCOLARE

7.1 IPERCOLESTEROLEMIA AUTOSOMICA DOMINANTE

L'Ipercolesterolemia Autosomica Dominante (ADH) è una malattia monogenica a trasmissione autosomica dominante caratterizzata da elevati livelli di colesterolo sierico legato alle lipoproteine a bassa densità (LDL-C) ed è associata ad elevato rischio cardiovascolare.

Classificazione:

- a) ADH-1 (OMIM 606945) per mutazioni del gene LDL-R con conseguente ridotto legame e catabolismo delle LDL plasmatiche;
- b) ADH-2 (OMIM 603776) per mutazioni del gene dell'apoB-100 con conseguente produzione di una apoB-100 difettiva che ha una ridotta affinità di legame per l'LDL-R
- c) ADH-3 (OMIM 603776) causata da mutazioni del gene di PCSK9, con conseguente alterazione dell'attività proteolitica della proteina.

FORMA OMOZIGOTE: Frequenza stimata di FH-1 e' di 1: 300.000/1.000.000

FORMA ETEROZIGOTE: Frequenza stimata di ADH-1 è di circa 1: 200 individui; ADH-2: in Italia sono state identificate solo 4 famiglie con FDB. ADH-3 è relativamente rara (circa il 2 % dei soggetti con ADH).

ADH: Aspetti clinici e Criteri diagnostici

La malattia nella forma omozigote ha manifestazioni cliniche severe (xantomi tendinei e arco corneale, valori di TC compresi tra 600 e 1200 mg/dL) che compaiono già in età infantile. I soggetti

eterozigoti, grazie alla presenza nel loro genoma di un allele normale, hanno manifestazioni più lievi, spesso poco evidenti in età infantile. La diagnosi è prevalentemente clinica e si basa su diversi criteri come quelli del Simon Broome Register Group e del Dutch Lipid Network. Secondo i criteri del Simon Broome la diagnosi è definita “certa” quando sono presenti valori del colesterolo totale o LDL superiori al 95° percentile, e quindi valori del CT superiori a 260 mg/dL (in età < 16 anni) o a 290 mg/dL (in età > 16 anni) o di LDL-C > 190 mg/dL, associati alla presenza di xantomi tendinei (per lo più al dorso delle mani o al tendine di Achille) nello stesso paziente o nei parenti di I e II grado oppure se vi sono nella famiglia bambini prepuberi affetti da ipercolesterolemia (CT > 250 mg/dl o LDL-C > 155 mg/dl). In mancanza di familiari disponibili per l’analisi biochimica, la malattia è probabilmente presente se può essere documentata una cardiopatia ischemica precoce (prima dei 55 anni nei maschi, dei 60 anni nelle femmine) nei familiari di 1° grado. Secondo i criteri del Dutch Lipid Network (sistema a punteggio), la diagnosi di FH si basa su cinque criteri: storia familiare, storia clinica di CHD precoce, esame fisico per xantomi e arco corneale, colesterolo LDL molto elevato a misurazioni ripetute e/o mutazione causativa.

In entrambe le forme l’indagine genetico-molecolare consente di dimostrare le mutazioni a carico dei geni candidati che influiscono sulla captazione del colesterolo LDL: LDL-R, APOB, PCSK9) (45-47).

7.2 IPOBETALIPOPROTEINEMIA

L’Ipobetalipoproteinemia Primitiva (pHBL) è un disordine monogenico ereditato come tratto dominante o recessivo caratterizzato da livelli plasmatici di colesterolo totale (CT) e/o LDL-colesterolo (LDL-C) e/o apolipoproteina B (APOB) inferiori al 5° percentile della popolazione generale di riferimento. Mutazioni in eterozigosi del gene APOB sono responsabili della maggior parte delle forme dominanti di pHBL, che causano l’Ipobetalipoproteinemia Familiare (FHBL) (48-50).

Nelle popolazioni occidentali la frequenza della forma eterozigote è di 1/500 a 1/1000. Il fenotipo clinico di FHBL eterozigote è in genere lieve, essendo caratterizzato frequentemente da steatosi epatica e livelli plasmatici di APOB e LDL-C ridotti del 60% (range di 40-80 mg/dl). Gli omozigoti presentano concentrazioni plasmatiche di apoB molto basse o assenti. Il fenotipo FHBL può derivare da due tipi di difetti molecolari: difetti legati al gene APOB o indipendenti da questo gene (51-55). La FHBL dovuta a mutazioni del gene APOB può essere associata alla presenza (forme secrete) o assenza (forme non secrete) di forme troncate di apoB evidenziabili nelle lipoproteine plasmatiche. Da tutti gli studi condotti è emerso comunque che il gene dell' apoB è responsabile solo in parte del fenotipo FHBL; altre cause sono da attribuire a mutazioni localizzate su altri geni (56-57). La possibilità di forme di FHBL non legate al gene apoB trova inoltre riscontro nell' osservazione che in alcune grandi famiglie l'analisi dell'aplotipo ha dimostrato una assenza di co-segregazione del fenotipo FHBL con il gene apoB. Queste forme di FHBL possono essere dovute a difetti di altri geni che controllano l'assemblaggio, la secrezione o il catabolismo delle lipoproteine contenenti apoB. In base ai dati derivanti da "wide genome scan" per la ricerca di nuovi loci di suscettibilità per FHBL recentemente il gene PCSK9 è emerso come un nuovo importante gene candidato associato a FHBL in una famiglia di Afro-Americani e Caucasiche. Mutazioni di PCSK9 sono associate con un fenotipo che non è complicato da steatosi epatica al contrario di quanto si verifica nelle mutazioni del gene APOB. Ulteriori studi hanno inoltre mostrato anche un ruolo del gene ANGPTL3, che pertanto può essere considerato un nuovo gene candidato di Ipobetalipoproteinemia familiare (58-60).

Negli omozigoti, il pattern lipoproteico riproduce molto fedelmente quello dell'abetalipoproteinemia omozigote recessiva. Le lipoproteine con mobilità beta o pre-beta sono assenti nell'elettroforesi sierica e non sono riscontrabili chilomicroni dopo ingestione di grassi.

Nell'ipobetalipoproteinemia grave, come si manifesta con l'eterozigosi composta o con l'omozigosi, possono essere evidenti: manifestazioni ematologiche (acantocitosi), manifestazioni gastrointestinali (numerosi accumuli di grasso nell'epitelio intestinale e nel fegato). L'accumulo intraepatocitario di lipidi che non vengono esportati determina la presenza di steatosi generalmente pura, raramente evolve in un quadro di NASH (non alcoholic steato-hepatitis). I chilomicroni sono assenti dal plasma dopo un pasto di grassi e il grasso nelle feci è normale. Il contenuto di colesterolo libero è aumentato insieme al rapporto tra sfingomieline e fosfatidilcolina; la concentrazione di linoleato è basso tra gli acidi grassi esterificati del plasma (61).

In contrasto con le manifestazioni ematologiche e gastrointestinali, quelle neurologiche (assenza o diminuzione dei riflessi tendinei profondi, atassia e deficit propriocettivi) e oftalmiche (retinite pigmentosa) possono essere presenti anche negli eterozigoti.

Gli eterozigoti in genere non presentano sequele cliniche e non richiedono terapia specifica. I pazienti omozigoti presentano una marcata riduzione o assenza di colesterolo LDL e di apoB e possono essere a rischio delle stesse complicanze tipiche dell'abetalipoproteinemia (62-63).

Il trattamento dell'ipobetalipoproteinemia negli omozigoti richiede pertanto: restrizione di grasso nella dieta e supplementazione intensiva di vitamina E. La somministrazione di dosi moderate (da 400 a 800 mg al giorno) di tocoferolo è raccomandata per gli eterozigoti perché possono sviluppare deficit neurologici. Negli eterozigoti, si può ricorrere alla restrizione di grassi nella dieta quando c'è evidenza di malassorbimento mentre una dieta a contenuto di glucidi moderato è suggerita al fine di ridurre la neosintesi di lipidi epatici (64).

L'Ipocolesterolemia combinata familiare (FHBL-2) è una condizione legata a mutazioni con perdita di funzione di ANGPTL-3 che causano assenza o marcata riduzione della proteina simile all'Angiopietina-3 (ANGPTL3). Mutazioni nel gene ANGPTL3 (2 mutazioni non-senso del gene ANGPTL3 sia in omozigosi che in compound eterozigosi) sono state recentemente identificate (49).

Il gene ANGPTL3 è localizzato sul cromosoma 1 e codifica per una proteina di 460 amminoacidi

prodotta dal fegato e immessa in circolo, che modula il metabolismo delle lipoproteine ricche in trigliceridi, maggiormente mediante inibizione della lipasi lipoproteica (LPL) ed endoteliale. La crescente evidenza del ruolo di ANGPTL-3 nella regolazione dei livelli plasmatici delle lipoproteine è emerso dall'identificazione di individui affetti da FHBL-2. I soggetti affetti da FHBL-2 presentano un profilo lipidico caratterizzato da bassi livelli plasmatici di CT, trigliceridi (TG), LDL-C e HDL-C (50-52; 65).

La scoperta di FHBL-2 è stata fatta da Musunuru et al. in una famiglia originariamente classificata come ipobetalipoproteinemia familiare (FHBL) dal gruppo di Schonfeld nel 1998. Mediante strategia di exome sequencing, è stato dimostrato che 4 fratelli ipocolesterolemici erano eterozigoti compound per 2 mutazioni *loss of function* (LOF) di ANGPTL3 (p.E129X/p.S17X), che sono associate a deficit completo di ANGPTL3. In particolare questi fratelli, oltre ad avere livelli estremamente bassi di colesterolo totale (CT) e LDL-C, avevano anche livelli molto bassi di trigliceridi e HDL-C, giustificando così la denominazione di questo disordine come FHBL-2. Dopo questa prima descrizione, sono stati riportati in letteratura altri soggetti con FHBL-2 (66). Infine, Noto, Cefalù et al. hanno valutato la prevalenza di mutazioni di ANGPTL3 in soggetti con diagnosi clinica di FHBL. Da un'ampia coorte di individui portatori di FHBL (390 Italiani e 523 Americani), hanno selezionato 78 soggetti che si presentavano con un fenotipo di ipocolesterolemia combinata, definita da criteri ristretti (es. CT <2° e HDL-C < 2° decile della popolazione). Mentre nessuno di questi soggetti aveva mutazioni a carico del gene APOB, 8 soggetti (10.25 %) erano portatori di varianti rare di ANGPTL3. FHBL-2 sembra essere trasmessa come tratto recessivo e non sembra essere associata a specifiche manifestazioni cliniche, come aterosclerosi prematura o steatosi epatica. Tuttavia l'impatto di ANGPTL3 su LDL-C e ApoB rimane tuttora difficile da spiegare e necessita pertanto di ulteriori ricerche capaci di metterne in luce il meccanismo specifico di questa modulazione (48-65).

7.3 IPERALFALIPOPROTEINEMIA FAMILIARE

Si definisce iperalfalipoproteinemia un aumento delle HDL plasmatiche con valori superiori al 90° percentile della distribuzione dei valori nella popolazione di appartenenza. Il colesterolo totale può essere di conseguenza lievemente aumentato, le VLDL e le LDL sono normali. In alcune famiglie l'anomalia sembra essere trasmessa come carattere autosomico dominante, mentre in altre sembra avere caratteristiche multifattoriali o poligeniche. Non si conoscono con esattezza i meccanismi patogenetici (aumentata produzione o ridotto catabolismo) (67).

Purtroppo non può essere assunto il principio che, se ai bassi livelli di colesterolo HDL si può correlare un incremento del rischio cardiovascolare, a livelli molto elevati si associa invece una riduzione del rischio cardiovascolare. In effetti, studi epidemiologici, prevalentemente giapponesi, dimostrano che nella curva di associazione fra colesterolo HDL e malattia coronarica i soggetti con livelli molto alti presentano una ripresa del rischio coronarico, imputabile probabilmente ad un alterato metabolismo delle HDL stesse.

La causa monogenica più comune di iperalfalipoproteinemia (HALP) è il deficit di CETP. In tale condizione le HDL non sono in grado di smaltire gli esteri di colesterolo, aumentano le loro dimensioni e sono catabolizzate più lentamente. Sono stati identificati altri quadri a trasmissione familiare caratterizzati da deficit della lipasi epatica (HL), oppure aumentata sintesi di APOA-1 o dalla presenza di una apoC-III mutata (68).

Non sono stati descritti sintomi clinici, mentre sembra che l'anomalia conferisca un certo grado di protezione nei confronti dell'infarto del miocardio, come atteso in base al supposto ruolo biologico delle HDL. Esistono famiglie con deficit di CETP gravate da alta incidenza di ictus cerebri ed altre che presentano segni di malattia cardiovascolare.

8. SCOPO DELLO STUDIO

In questo studio abbiamo preso in considerazione e confrontato tra loro, due disordini congeniti del trasporto delle lipoproteine che rappresentano gli estremi di un *continuum* di livelli di colesterolemia, totale ed LDL, e pertanto di rischio cardiovascolare: l'ipobetalipoproteinemia familiare (FHBL) e l'ipercolesterolemia autosomica dominante (ADH-1). Abbiamo preso altresì in considerazione, per confronto, un altro disordine genetico del metabolismo delle lipoproteine che è l'iperalfalipoproteinemia familiare (HALP).

L'ipobetalipoproteinemia (HBL) rappresenta un gruppo geneticamente eterogeneo di disordini del metabolismo lipoproteico caratterizzati da livelli plasmatici di colesterolo totale, LDL ed apoB inferiori al 5° percentile della distribuzione nella popolazione di appartenenza.

Le forme secondarie di HBL, che in questo studio sono state escluse, sono legate a molteplici condizioni cliniche che vanno dalla malnutrizione, al malassorbimento, a malattie croniche di fegato, a neoplasie maligne, spesso occulte.

Le forme primarie monogeniche a trasmissione autosomica dominante possono essere causate dalle mutazioni in vari geni conosciuti (APOB, PCSK9) o in geni non ancora identificati. L'ipobetalipoproteinemia familiare (FHBL) è la più frequente forma monogenica di HBL con una modalità di trasmissione autosomica dominante e può essere dovuta a mutazioni del gene dell'apoB o, meno frequentemente, a mutazioni "*loss of function*" del gene PCSK9. Le rare forme monogeniche recessive sono rappresentate dall'abetalipoproteinemia (ABL) e dalla malattia da ritenzione dei chilomicroni (CMRD) dovute a mutazioni rispettivamente dei geni MTP e SARA2. Le forme di FHBL in omozigosi, ABL e CMRD, molto rare, si caratterizzano per livelli plasmatici di CT, LDL ed apo B particolarmente bassi, talora indosabili, con un quadro clinico severo correlato al malassorbimento intestinale dei lipidi con deficit di vitamine liposolubili (A, E, K), che si manifesta a partire dall'infanzia, con ritardo di crescita, diarrea con steatorrea, disturbi neurologici,

retinite pigmentosa atipica, acantocitosi, steatosi epatica che può evolvere fino a cirrosi epatica, ridotta aspettativa di vita (57-62). Le forme in eterozigosi, (in Europa si stima una prevalenza da 0.1% a 1.9%) (63-64) si caratterizzano per livelli di CT, LDL ed apoB inferiori al 5° percentile di distribuzione nella popolazione, con un quadro clinico per lo più asintomatico o “*mild*”, con buona aspettativa di vita. La manifestazione clinica più frequente è la steatosi epatica e talvolta a quadri più severi di epatopatia(61), ma con un rischio di malattia cardiovascolare aterosclerotica “probabilmente” ridotto.

L’interesse verso questa patologia nella forma “*mild*” eterozigote nasce soprattutto dal fatto che rappresenta un modello naturale di ipocolesterolemia e può aiutare a comprendere i benefici di una terapia ipolipemizzante intensiva in pazienti con alto rischio cardiovascolare.

Tuttavia, se si eccettua uno studio condotto su pazienti con FHBL e su gruppo di controllo da Sankatsing et al. del 2005 in cui vengono valutati lo spessore carotideo intima media (IMT) e la stiffness di parete arteriosa, quali markers surrogati di rischio cardiovascolare (63), in letteratura non sono noti altri studi di questo tipo.

Altrettanto pochi sono gli studi in cui in pazienti con FHBL siano stati valutati lo stress ossidativo e l’attivazione piastrinica quali determinanti del processo aterotrombotico; tuttavia non si tratta di studi *in vivo* ma di studi *in vitro* (64-66) ed *ex vivo* (67) con risultati per lo più di non univoca interpretazione.

Abbiamo valutato infine lo stress ossidativo e l’attivazione piastrinica in vivo in un’altra dislipidemia genetica che è la HALP Primitiva, un disordine genetico co-dominante caratterizzato da elevati livelli plasmatici di HDL (> 90° percentile), la frazione lipoproteica nota per il suo effetto protettivo nei confronti dell’aterosclerosi. La più studiata delle forme primitive di HALP è dovuta a mutazioni nel gene della CETP che determinano deficit di CETP, un raro disordine nei Caucasic

(68), ma relativamente comune in Giappone dove la sua relazione con la malattia arteriosa coronarica è dibattuta (69).

9. MATERIALI E METODI

In accordo con la dichiarazione di Helsinki e la linee guida istituzionali, il protocollo è stato approvato dal comitato etico locale e i pazienti erano a conoscenza della natura investigativa dello studio e d'accordo a partecipare dopo firma di consenso informato.

Sono stati valutati:

- (a) un gruppo di soggetti con FHBL,
- (b) un gruppo di soggetti con ADH-1 di nuova diagnosi, altro estremo di un *continuum* di rischio cardiovascolare correlato ai livelli di colesterolemia totale ed LDL, prima e dopo trattamento ipolipemizzante convenzionale ottimale,
- (c) un gruppo di soggetti con HALP,

Abbiamo considerato i seguenti parametri:

- i livelli urinari di 8-iso-PGF_{2α} e di 11-deidro-TX B₂, markers in vivo rispettivamente di stress ossidativo e di attivazione piastrinica, determinanti del processo atero-trombotico.
- la composizione lipidica delle membrane piastriniche attraverso lo studio della lipidomica, tecnica di spettrometria di massa, che negli ultimi anni ha aperto nuove frontiere nella comprensione dei molti processi che nelle piastrine sono controllati da molecole lipidiche e la cui disregolazione può condurre a significativi difetti della funzione piastrinica e a stati morbosi quali quelli correlati alla malattia aterosclerotica (20).

Lo scopo di tali valutazioni è stato quello di comprendere quale sia l'effettivo rischio cardiovascolare nei pazienti con FHBL e se questo sia paragonabile a quello dei pazienti con ADH-

1 a target di CT totale ed LDL, mediante trattamento ipolipemizzante ottimale o a quello dei soggetti con HALP. Lo studio della lipidomica applicata alle membrane piastriniche può inoltre contribuire alla comprensione della relazione tra composizione lipidica della membrana piastrinica e livelli di lipoproteine circolanti.

POPOLAZIONE DI STUDIO - Selezione dei pazienti

a. Criteri di inclusione:

Età > 18 anni e < 75 anni.

Pazienti con FHBL: Colesterolemia totale < del 5° percentile della distribuzione dei valori nella popolazione (125 mg/dl) in più controlli e in assenza di terapia ipolipemizzante in corso; trasmissione verticale dell'ipobetalipoproteinemia nella famiglia.

Pazienti con ADH-1 di nuova diagnosi: Colesterolemia-LDL > del 95° percentile della distribuzione dei valori nella popolazione (195 mg/dl); trasmissione verticale dell'ipercolesterolemia nella famiglia; presenza di xantomatosi tendinea.

Pazienti con HALP: Colesterolemia-HDL > 100 mg/dl; trasmissione verticale dell'iperalfalipoproteinemia nella famiglia.

b. Criteri di esclusione:

- Tutte quelle condizioni patologiche che possono essere responsabili di forme secondarie di ipobetalipoproteinemia, ipercolesterolemia e iperalfalipoproteinemia: Malnutrizione, malattie da malassorbimento, malattie croniche di fegato, neoplasie maligne, disfunzioni tiroidee e surrenaliche, sindrome nefrosica, insufficienza renale moderata-severa, terapia con estrogeni, abuso di alcool, attività fisica agonistica.
- Essere già in trattamento con terapia ipolipemizzante farmacologica.

- Terapie, anche occasionali nei 7-10 giorni che precedono l'arruolamento, con farmaci che possono avere effetti diretti o indiretti sull'attività piastrinica, l'assetto lipidico ematico e lo stato flogistico sistemico: in particolare ASA e altri antiaggreganti, FANS di ogni tipo, corticosteroidi, estro-progestinici.

Disegno dello studio

Sono stati studiati 10 pazienti con FHBL, 10 pazienti con ADH-1, 10 pazienti con HALP. I pazienti con FHBL, ADH-1, HALP verranno studiati al tempo 0.

Inoltre i pazienti con ADH-1 saranno studiati dopo almeno un mese di terapia ipolipemizzante convenzionale ottimale.

Con il termine "convenzionale" si intende la terapia basata sullo stile di vita in associazione a uno o più farmaci ipolipemizzanti disponibili in commercio, già autorizzati dall'Agenzia Italiana del Farmaco (AIFA), utilizzati secondo linee guida e raccomandazioni per una buona pratica clinica, in ossequio alle normative della Comunità Scientifica Internazionali in materia. Con il termine "ottimale" si intende il raggiungimento del target terapeutico secondo linee-guida, oppure la massima terapia ipolipemizzante tollerata.

Al momento del reclutamento, previa firma del consenso informato, tutti i pazienti saranno sottoposti a raccolta di anamnesi fisiologia, patologica, familiare e farmacologica per verificare i criteri di eleggibilità. Ai pazienti che non sono stati mai caratterizzati geneticamente, si chiederà di esprimere un ulteriore consenso informato scritto per l'esecuzione delle indagini genetiche.

Al tempo 0: tutti i pazienti sono stati sottoposti ad esame obiettivo compreso il rilievo dei parametri antropometrici; sono stati sottoposti alle indagini strumentali non invasive previste dallo studio per la valutazione del rischio cardiovascolare e della eventuale steatosi

epatica (vedi paragrafo 6); hanno fornito un campione delle prime urine del mattino, dopo il riposo notturno (campione di almeno 50 cc delle urine di almeno 8 ore notturne), per il dosaggio urinario di 8-iso-PGF_{2α} e di 11-deidro-TX B₂; sono stati sottoposti a prelievo dopo almeno 10-12 ore di digiuno per

- caratterizzazione dei geni candidati (solo per chi ha espresso il consenso informato scritto specifico, non preclusivo alla partecipazione allo studio): una provetta con EDTA;
- principali esami di routine, compresa funzionalità tiroidea, insulinemia e assetto lipidico completo: 1 provetta con EDTA, 1 provetta con citrato, 2 provette a secco;
- studio della lipidomica delle piastrine: 2 provette con citrato.

Dopo 3 mesi: i soli pazienti con ADH-1, dopo almeno tre mesi di terapia ipolipemizzante ottimale, hanno fornito un ulteriore campione delle prime urine del mattino, dopo il riposo notturno (campione di almeno 50 cc delle urine di almeno 8 ore notturne) per il dosaggio urinario di 8-iso-PGF_{2α} e di 11-deidro-TX B₂, e saranno sottoposti a prelievo dopo almeno 10-12 ore di digiuno per

- l'assetto lipidico completo: 1 provetta a secco;
- studio della lipidomica delle piastrine: 2 provette con citrato.

Analisi cliniche e di laboratorio:

- Al tempo 0 → esame obiettivo, compreso rilievo dei parametri antropometrici + esami ematochimici di routine, inclusi indici di funzionalità tiroidea, PCR, insulinemia + lipidomica delle membrane piastriniche + caratterizzazione genetica

(solo per chi ha espresso il consenso informato scritto specifico, non preclusivo alla partecipazione allo studio);

- Dopo tre mesi di terapia ipolipemizzante standard (solo pazienti ADH-1) assetto lipidico completo + lipidomica delle membrane piastiniche.

3. Valutazioni strumentali eseguiti al tempo 0 : ECO- TSA

4. Analisi statistiche → standard.

METODI DI LABORATORIO

Tutti i parametri di natura endoteliale venivano misurati con metodica ELISA, le curve di standardizzazione sono state stabilite usando concentrazione appropriate per ogni fattore. Precauzioni venivano prese per evitare interferenze con altri componenti sierici. Dopo centrifugazione a 4 C i campioni di sangue venivano congelati a – 80 C.

Lo stress ossidativo e l'attivazione piastrinica misurati rispettivamente come 8-ISO-PGF 2alpha e 11-DH-TXB2, sono stati utilizzati mediante un kit commerciale AssayDesignink, Ann,Arbor,USA.

VALUTAZIONE DELL'ISPESSIMENTO MEDIO-INTIMALE (IMT)

Per la scansione ultrasonografica delle carotidi è stato utilizzato un ecografo dotato di sonda lineare (7-10 MHz). Il valore di IMT è stato ottenuto dalla migliore immagine in scansione longitudinale e proiezione laterale dei seguenti segmenti:

- ultimi 10 mm della carotide comune
- bulbo carotideo
- primi 10 mm della carotide interna distalmente alla biforcazione.

Nelle immagini ottenute sono stati misurati i seguenti parametri:

- IMT medio in ogni segmento arterioso (definito come la distanza tra l'interlinea lume-intima e media-avventizia)
- IMT massimo in ogni segmento arterioso
- diametri lume-lume e avventizia-avventizia in carotide comune.

I valori di IMT sono stati espressi come:

- IMT mean (media cumulativa degli IMT medi misurati in ciascun segmento dell'asse carotideo analizzato)

IMT-MAX (media cumulativa di tutti i massimi IMT misurati in ciascun segmento arterioso dell'asse carotideo analizzato)

Per convenzione si considera limite normale per l'IMT un ispessimento <0,9 mm.

I valori compresi tra 0,9 e 1,3 sono stati considerati indicativi di ispessimento intimale. La placca viene definita come un ispessimento focale dell'IMT di 0,5 mm in più all'IMT normale circostante o un incremento dell'IMT del 50% o un IMT superiore a 1,3 mm.

10. ANALISI STATISTICA

I risultati sono forniti come medie più deviazione standard.

Abbiamo analizzato un totale di 30 soggetti distribuiti rispettivamente in tre gruppi in relazione al disordine genetico:

n=10 pazienti affetti da Ipobetalipoproteinemia (FHBL)

n=10 soggetti affetti da Iperalfalipoproteinemia (HALP)

n=10 soggetti affetti da Ipercolesterolemia Autosomica Dominante (ADH-1)

Questi ultimi (soggetti ADH-1) sono stati valutati prima e dopo tre mesi di trattamento ipolipemizzante standard.

Abbiamo successivamente analizzato i vari gruppi in funzione delle patologie concomitanti [Diabete Mellito di tipo 2, malattia coronarica (CHD), ipertensione arteriosa]

Le differenze tra i gruppi sono state valutate mediante ANOVA, TUKEY e BONFERRONI test per confronti multipli.

L'analisi della covarianza (ANCOVA) è stata condotta per aggiustare per eventuali fattori confondenti quali età, sesso, glicemia, valori pressori e trattamento farmacologico.

L'analisi di regressione semplice e multipla è stata usata per testare le relazioni dei parametri lipidici con l'8-ISOPGF2alpha e le altre variabili che abbiamo utilizzato.

Il modello di regressione multipla è stato costruito considerando LDL-C, 8-ISOPGF2alpha, 11-DH-TXB2, NOX-2, ICAM1 e VCAM come variabili dipendenti ed includendo: glicemia, valori pressori, CHD, età, BMI e sesso.

L'Ipotesi nulla veniva rifiutata per una $P < 0.05$.

L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando software SYSTAT data e medcalc.

11. RISULTATI

Le tabelle seguenti forniscono le caratteristiche cliniche (**Tabella 1**) e biomorali (**Tabella 2**) dell'intero gruppo di pazienti arruolati, in particolare soggetti affetti da ipercolesterolemia autosomica dominante (ADH-1), soggetti affetti da Iperalfalipoproteinemia familiare (HALP) e Ipbetalipoproteinemia familiare (FHBL). I soggetti ADH-1 sono stati valutati prima e dopo tre mesi di trattamento ipolipemizzante standard

Tabella 1. Caratteristiche cliniche e biochimiche dei soggetti in studio.

Variabili	ADH-1 pre-trattamento	HALP	FHBL
Età, anni (media)	58	65	62
Maschi, n %	7 (58.3)	6 (60)	7 (70)
BMI, kg/m ²	24.5±2.3	23.9±3.1	24.1±2.7
Colesterolo totale mg/dl (media)	354	154	86
Trigliceridi, mg/dl (media)	97	72	52
HDL-C mg/dl (media)	42	105	17
LDL-C mg/dl (media)	292.6	34.6	58.6
Fumo di sigaretta, n %	3 (25)	2 (20)	1 (10)
Ipertensione arteriosa, n %	6 (50)	1 (10)	4 (40)
Aterosclerosi, n %	6 (50)	1 (10)	4 (40)
Diabete mellito di tipo 2, n %	1 (8.3)	0 (0)	5 (50)
CHD, n %	5(50)	0 (0)	0 (0)

Tabella 2. Markers e principali componenti lipidici piastrinici valutati nei soggetti in studio.

Parametri biochimici	FHBL	HALP	ADH-1 pre-trattamento	ADH-1 post-trattamento
8isoPGF2 (pg/ml)	765.2±540.2	691.6±432.4	1433.8±662.8 [§]	402.3±64.4 [§]
11_dH_TXB2 (pg/ml)	1497.8±660.1	963.7±563.1	3603.8±2989.8 [§]	689.6±433.4 [§]
NOX-2 (pg/ml)	15.6±6.9 [§]	20.1±8.6 [§]	31.3±8.1 [§]	27.1±14.1
IL-6 (pg/ml)	2±1	1.5±0.7	3.5±4	1.5±1.1
ICAM-1(pg/ml)	233.98±43.7	231.03±33.9	273.7±61.02 [§]	202.7±74.7 [§]
VCAM-1(pg/ml)	524.2±147.5	512±106.5	811.5±218.9 [§]	701.8±161.9 [§]
PALM/ARA	6.54±7.2	1.35±0.59	5.2±1.7	3.5±4.5
ARA/DHA	6.04±4.4	13.4±4.3	9.4±2.3	8.1±5.1

[§]p value < 0.05 (FH pre-trattamento vs FH post-trattamento, FHBL e HALP)

I tre gruppi di pazienti sono sovrapponibili per distribuzione di età, sesso e BMI. Le principali differenze riguardano i parametri lipidici – colesterolemia totale, trigliceridemia e colesterolo HDL - (caratteristici rispettivamente dei tre disordini lipidici considerati): LDL-C elevato nei soggetti ADH-1 e ridotto nei soggetti FHBL; valori plasmatici di HDL-C aumentati nei soggetti HALP e ridotti nei soggetti FHBL. La frequenza di ipertensione arteriosa e aterosclerosi risulta minore nel gruppo HALP. Tra tutti i soggetti il 50% dei FHBL è affetto da Diabete mellito di tipo 2, mentre solo il 50% dei pazienti ADH-1 presenta malattia cardiovascolare (Coronary Heart Disease – CHD). Nessuna differenza significativa è stata riscontrata nell'abitudine al fumo di sigaretta tra i tre gruppi di soggetti in studio.

L'escrezione urinaria di 8isoPGF2 e 11_dH_TXB2 è significativamente aumentata nei soggetti ADH-1 prima dell'inizio del trattamento ipolipemizzante standard rispetto ai gruppi FHBL e

HALP. Inoltre, dopo tre mesi di terapia ipolipemizzante si è assistito ad una riduzione di circa il 30% di 8isoPGF2 e 11-dH-TXB2 nei pazienti ADH-1 (Tabella 2).

Le concentrazioni plasmatiche medie dei biomarcatori di Stress Ossidativo, Infiammazione e di Disfunzione Endoteliale sono risultate sovrapponibili fra i due Gruppi FHBL e HALP. Il dosaggio sierico dei markers di stress ossidativo ha messo in evidenza valori significativamente aumentati di NOX-2 ($p<0.001$), ICAM-1 ($p<0.03$) e VCAM-1 ($p<0.04$) nei soggetti ADH-1 pre-trattamento rispetto agli altri gruppi. I valori sierici di IL-6 e l'analisi della composizione di acidi grassi delle membrane piastriniche non ha mostrato differenze nei tre gruppi. Come mostrato nella Tabella 2, i dati sull'escrezione urinaria di 8isoPGF2 e 11-dH-TXB2 così come quelli relativi ai markers sierici NOX-2, ICAM-1 e VCAM-1 suggeriscono l'esistenza di un potenziale link tra perossidazione lipidica e attivazione piastrinica nei pazienti ADH-1 pre-trattamento rispetto agli altri gruppi di soggetti esaminati.

Inoltre, l'esame ultrasonografico del Tronchi Sovra-Aortici ha mostrato, nei pazienti diabetici, un lieve aumento dello spessore Intimo-Mediale Carotideo ed una lieve prevalenza di Spessore Intimo-Mediale Carotideo aumentato, entrambi non statisticamente significativi.

12. DISCUSSIONE

Le malattie cardiovascolari rappresentano una sfida per i sistemi sanitari di tutto il mondo. La prevalenza in costante crescita determina un coinvolgimento sempre maggiore della popolazione adulta, il che si riflette in un considerevole dispendio di risorse umane ed economiche. Si tratta, inoltre, di patologie potenzialmente prevenibili, nelle quali una accurata valutazione (stratificazione) del rischio ed una ponderata strategia di prevenzione potrebbero rivelarsi molto fruttuose a medio e lungo termine. La determinazione di alcuni fattori di rischio biochimici pone il laboratorio in una posizione strategica nella valutazione del rischio, sempre che i parametri selezionati rispondano ad una precisa logica di efficienza clinica, in cui sia dimostrabile un favorevole rapporto tra costo e beneficio.

Numerosi studi hanno evidenziato il ruolo dello stress ossidativo sulla morbilità e mortalità cardiovascolare. Le ragioni dell'aumentato rischio cardiovascolare nei pazienti affetti da ADH-1 possono essere spiegate non soltanto dall'aumentata prevalenza dei classici fattori di rischio "tradizionali", ma dalla presenza di fattori di rischio "non-tradizionali" che includono lo stress ossidativo, l'infiammazione e la disfunzione endoteliale.

I ROS possono determinare disfunzione endoteliale e aumentare lo stato proinfiammatorio sistemico, aumentano i fattori fibrotici, scatenando una sequenza di meccanismi coinvolti nell'aterosclerosi e negli eventi cardiovascolari.

Gli isoprostani sono derivati prostaglandinici prodotti dalla perossidazione dell'acido arachidonico, un acido grasso polinsaturo ubiquitario. Le sorgenti di radicali liberi che contribuiscono alla formazione di 8-ISO-PGF₂α in vivo sono molteplici. Queste includono la formazione di ROS come l'anione superossido da parte della catena mitocondriale e da parte dell'enzima NADPH ossidasi (70).

Un aspetto importante riguardo alla quantificazione dell'8-ISO-PGF 2alpha è che la sua concentrazione nei fluidi biologici rappresenta il grado di stress ossidativo (70-71). Roberts e Morrow (71) hanno dimostrato che i livelli circolanti di isoprostani dipendono dalla produzione piuttosto che dal metabolismo e dall'escrezione, suggerendo che rappresentino un indice del livello di stress ossidativo in vivo. A tal proposito ci siamo basati su nostri dati precedenti (33;36) che evidenziavano come nei pazienti con basso HDL-C (33) e nei soggetti ADH-1 (36) lo stress ossidativo, misurato come 8-ISO-PGF 2alpha, e l'attivazione piastrinica, valutata come escrezione urinaria di 11-dH-TXB2, aumentino parallelamente al decrescere dei valori plasmatici di HDL-C e al crescere di quelli di LDL-C, rispettivamente. Pertanto, in questo studio abbiamo voluto prendere in considerazione e confrontare tra loro, due disordini congeniti del trasporto delle lipoproteine che rappresentano gli estremi di un *continuum* di livelli di colesterolemia, totale ed LDL, e pertanto di rischio cardiovascolare: l'ipobetalipoproteinemia familiare (FHBL) e l'ipercolesterolemia familiare (ADH-1). Abbiamo preso altresì in considerazione, per confronto, un altro disordine genetico del metabolismo delle lipoproteine che è l'iperalfalipoproteinemia familiare (HALP). L'interesse verso la FHBL nella forma "mild" eterozigote nasce soprattutto dal fatto che rappresenta un modello naturale di ipocolesterolemia e può aiutare a comprendere i benefici di una terapia ipolipemizzante intensiva in pazienti con alto rischio cardiovascolare. In questi gruppi abbiamo valutato, confrontandole, le relazioni esistenti fra stress ossidativo, attivazione piastrinica e disfunzione endoteliale con i principali parametri lipidici ed il rischio cardiovascolare. Abbiamo valutato anche la prevalenza di aumentato Spessore Intimo Mediale Carotideo, che rappresenta uno dei fattori di rischio cardiovascolare.

I risultati di questo studio confermano in parte la nostra ipotesi, dimostrando che le concentrazioni plasmatiche medie dei biomarkers di stress ossidativo sono aumentati in soggetti geneticamente predisposti ad un alto rischio cardiovascolare come i soggetti ADH-1 (che presentano livelli

plasmatici elevati di LDL-C) se messi a confronto con i soggetti FHBL e HALP. Nessuna differenza significativa invece è stata registrata tra questi ultimi due gruppi.

In tutti pazienti abbiamo dosato anche i markers di disfunzione endoteliale: ICAM-1 e VCAM-1 ed abbiamo visto come le concentrazioni di tali molecole aumentassero al crescere dei valori di 8ISO-PGF2alpha e di 11-dH-TXB2. Nello stesso studio l'analisi di molecole di adesione, ICAM1 e VCAM1, coinvolte nel processo aterosclerotico, risultavano dotate di valore prognostico predittivo di stress ossidativo.

L'analisi della composizione di acidi grassi delle membrane piastriniche, eseguita allo scopo di valutare eventuali difetti della funzione piastrinica, non ha mostrato differenze significative nei tre gruppi.

13. CONCLUSIONI

Questi dati confermano le precedenti scoperte relative ad una significativa correlazione lineare tra l'escrezione di F2-isoprostanine e soggetti ad alto rischio cardiovascolare (come i soggetti HeFH). I soggetti ADH-1 non trattati presentano infatti valori sierici più elevati dei markers sierici di stress ossidativo rispetto alla controparte rappresentata dai soggetti FHBL e HALP. Tuttavia questo studio presenta dei limiti dipendenti dall'esiguità del campione di soggetti valutati; sebbene infatti FHBL e HALP siano malattie rare del metabolismo lipidico, la scarsa numerosità del campione non permette di individuare correlazioni significative tra tutte le variabili esaminate, come ad esempio lo studio di lipidomica della membrana piastrinica, che potrebbe dare un valido contributo alla comprensione di patologie come l'aterosclerosi, nell'ambito dei disordini lipidici considerati in questo studio.

Ad ogni modo questi risultati possono dare un contributo seppur minimo nella prevenzione primaria e secondaria di soggetti ADH-1 e ad alto rischio cardiovascolare oltre che nei soggetti HALP, marcando i possibili benefici dei bassi livelli plasmatici di LDL-C esistenti nei pazienti FHBL.

BIBLIOGRAFIA

1. Pryor WA. Oxy-radicals and related species: their formation, lifetimes, and reactions. *Ann Rev Physiol. Review.*1986;48:657-67.
2. Berliner JA, Navab M, Fogelman AM, Frank JS, Demer LL, Edwards PA, Watson AD, Lusis AJ. Atherosclerosis: basic mechanisms. Oxidation, inflammation, and genetics. *Circulation.* 1995 May 1;91(9):2488-96. Review.
3. Sakata N, Imanaga Y, Meng J, Tachikawa Y, Takebayashi S, Nagai R, Horiuchi S. Increased advanced glycation end products in atherosclerotic lesions of patients with end-stage renal disease. *Atherosclerosis.* 1999 Jan;142(1):67-77.
4. Ziouzenkova O, Asatryan L, Akmal M, Tetta C, Wratten ML, Loseto-Wich G, Jürgens G, Heinecke J, Sevanian A. Oxidative cross-linking of ApoB100 and hemoglobin results in low density lipoprotein modification in blood. Relevance to atherogenesis caused by hemodialysis. *J Biol Chem.* 1999 Jul 2;274(27):18916-24.
5. Heinecke JW, Hsu FF, Crowley JR, Hazen SL, Leeuwenburgh C, Mueller DM, Rasmussen JE, Turk J. Detecting oxidative modification of biomolecules with isotope dilution mass spectrometry: sensitive and quantitative assays for oxidized amino acids in proteins and tissues..*Methods Enzymol.* 1999;300:124-44.
6. Berliner J and Watson A. A role for oxidized phospholipids in atherosclerosis. *N Engl J Med* 2005;353:9-11
7. Pryor WA. Oxy-radicals and related species: their formation, lifetimes and reaction. *Annu Rev Physiol* 1986; 174:305-319.
8. Papa S, Skulachev VP. Reactive oxygen species, mitochondria, apoptosis and aging. *Mol Cell Biochem.* 1997 Sep;174(1-2):305-19. Review.
9. Eiserich JP, Hristova M, Cross CE, Jones AD, Freeman BA, Halliwell B, van der Vliet A. Formation of nitric oxide-derived inflammatory oxidants by myeloperoxidase in neutrophils.*Nature.* 1998 Jan 22;391(6665):393-7.
10. Daugherty A, Dunn JL, Rateri DL, Heinecke JW. Myeloperoxidase, a catalyst for lipoprotein oxidation, is expressed in human atherosclerotic lesions. *J Clin Invest.* 1994 Jul;94(1):437-44.
11. Halliwell B. Vitamin C: antioxidant or pro-oxidant in vivo? *Free Radic Res.* 1996 Nov;25(5):439-54. Review.

12. Lee SH, Oe T, Blair IA. Vitamin C-induced decomposition of lipid hydroperoxides to endogenous genotoxins. *Science*. 2001 Jun 15;292(5524):2083-6.
13. Deneke SM. Thiol-based antioxidants. *Curr Top Cell Regul*. 2000;36:151-80. Review.
14. Mansoor MA, Svardal AM, Ueland PM. Determination of the in vivo redox status of cysteine, cysteinylglycine, homocysteine, and glutathione in human plasma. *Anal Biochem*. 1992 Feb 1;200(2):218-29.
15. Lapenna D, de Gioia S, Ciofani G, Mezzetti A, Uchino S, Calafiore AM, Napolitano AM, Di Ilio C, Cuccurullo F. Glutathione-related antioxidant defenses in human atherosclerotic plaques. *Circulation*. 1998 May 19;97(19):1930-4.
16. Jones DP, Carlson JL, Mody VC, Cai J, Lynn MJ, Sternberg P. Redox state of glutathione in human plasma. *Free Radic Biol Med*. 2000 Feb 15;28(4):625-35.
17. Pryor WA. Oxidative stress status: OSS, BOSS, and "Wild Bill" Donovan. *Free Radic Biol Med*. 1999 Dec;27(11-12):1135-6.
18. Pryor WA. Oxidative stress status-the second set. *Free Radic Biol Med*. 2000 Feb 15;28(4):503-504.
19. Levitan I, Volkov S., Subbaiah PV. Oxidized Ldl: diversity, patterns of recognition and pathophysiology. *Antioxid. Redox. Signal*. 2010, 13, 39-75
20. Parthasarathy S, Raghavamenon A, Garelnabi MO, Santanam N. Oxidized Low-Density Lipoprotein. *Methods Mol. Biol*. 2010, 610, 403-417
21. Meng-Yu Wu, Chia-Jung Li, Ming-Feng Hou and Pei-Yi Chu. New insights into the role of inflammation in the pathogenesis of atherosclerosis. *Int. J. Mol. Sci* 2017, 18, 2034
22. Witko-Sarsat V, Friedlander M, Nguyen Khoa T, Capeillère-Blandin C, Nguyen AT, Canteloup S, Dayer JM, Jungers P, Drüeke T, Descamps-Latscha B. Advanced oxidation protein products as novel mediators of inflammation and monocyte activation in chronic renal failure. *J Immunol*. 1998 Sep 1;161(5):2524-32.
23. Morrow JD, Hill KE, Burk RF, Nammour TM, Badr KF, Roberts LJ 2nd. A series of prostaglandin F₂-like compounds are produced in vivo in humans by a non-cyclooxygenase, free radical-catalyzed mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990 Dec;87(23):9383-7.
24. Castelli WP. Epidemiology of coronary heart disease: the Framingham Study. *AmJ Med* 1984; 76:4-12.
25. LaRosa JC, Hunninghake D, Bush D, Criqui MH, Getz GS, Gotto AM Jr, et al. The cholesterol facts. A summary of the evidence relating dietary fats, serum cholesterol, and coronary heart disease. A joint statement by the American Heart Association and the

- National Heart, Lung, and Blood Institute. The Task Force on Cholesterol Issues, American Heart Association. *Circulation* 1990;81(5):1721-33.
26. Kastelein JJ. The future of best practice. *Atherosclerosis* 1999; 143(Suppl 1): S17-S21.
27. Davì, G., and Patrono, C. Platelet activation and atherothrombosis. *N Engl J Med* 2007; 357: 2482–2494.
28. Lordkipanidzè M. et al. A comparison of six major platelet function tests to determine the prevalence of aspirin resistance in patient with stable coronary artery disease. *Eur Heart J*. 28(14): 1702-1708
29. Kattoor AJ, Pothineni D, Mehta JL. Oxidative stress in Atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep*. 2017; 19:42
30. Kigawa Y, Miyazaki T, Lei XF, et al. Functional Heterogeneity of NADPH Oxidase in Atherosclerotic and aneurysmal diseases. *J Atheroscler Thromb* 2017 24(1):1-13).
31. Violi F., Carnevale R., Loffredo L., Pignatelli P., Gallin JJ. NADPH Oxidase-2 and atherothrombosis. Insight from chronic granulomatous disease. *ATVB* 2017; 37:218-225.
32. Strano A., Davì G., Averna M., et al. Platelet sensitivity to prostacyclin and thromboxane production in hyperlipidemic patients. *Thromb Haemost* 1982;48:18-21.
33. Davì G., Averna M., et al. Increased thromboxane biosynthesis in type IIa Hypercholesterolemia. *Circulation* 1992;85:1792-1798.
34. O'Donnell VB, Murphy RC, Watson SP. Platelet lipidomics: a modern day perspective on lipid discovery and characterization in platelets. *Circ Res*. 2014; 114(7):1185-1203
35. Ashen MD, Blumental RS. Clinical Practice. Low HDL cholesterol levels. *N Engl J Med* 2005; 353: 1252-1260.
36. Vazzana N, Ganci A, Cefalù AB, Lattanzio S, Noto D, Santoro N, Saggini R, Puccetti L, Averna M, Davì G. Enhanced lipid peroxidation and platelet activation as potential Contributors, to increase Cardiovascular risk in the low-HDL phenotype. *J Am Heart Assoc* 2013; 2: e000063 doi: 10.1161/JAHA.113.000063).
37. Deanfield J, Donald A, Ferri C, Giannattasio C, Halcox J, Halligan S, Lerman A, Mancina G, Oliver JJ, Pessina AC, Rizzoni D, Rossi GP, Salvetti A, Schiffrin EL, Taddei S, Webb DJ;

- Working Group on Endothelin and Endothelial Factors of the European Society of Hypertension. Endothelial function and dysfunction. Part I: Methodological issues for assessment in the different vascular beds: a statement by the Working Group on Endothelin and Endothelial Factors of the European Society of Hypertension. *J Hypertens*. 2005 Jan;23(1):7-17.
38. Brunner H, Cockcroft JR, Deanfield J, Donald A, Ferrannini E, Halcox J, Kiowski W, Lüscher TF, Mancia G, Natali A, Oliver JJ, Pessina AC, Rizzoni D, Rossi GP, Salvetti A, Spieker LE, Taddei S, Webb DJ; Working Group on Endothelins and Endothelial Factors of the European Society of Hypertension. Endothelial function and dysfunction. Part II: Association with cardiovascular risk factors and diseases. A statement by the Working Group on Endothelins and Endothelial Factors of the European Society of Hypertension. *J Hypertens*. 2005 Feb;23(2):233-46.
 39. Heitzer T, Schlinzig T, Krohn K, Meinertz T, Münzel T. Endothelial dysfunction, oxidative stress, and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *Circulation*. 2001 Nov 27;104(22):2673-8.
 40. Laursen JB, Somers M, Kurz S, McCann L, Warnholtz A, Freeman BA, Tarpey M, Fukai T, Harrison DG. Endothelial regulation of vasomotion in apoE-deficient mice: implications for interactions between peroxynitrite and tetrahydrobiopterin. *Circulation*. 2001 Mar 6;103(9):1282-8.
 41. Torres JL, Ridker PM. Clinical use of high sensitivity C-reactive protein for the prediction of adverse cardiovascular events. *Curr Opin Cardiol*. 2003 Nov;18(6):471-8. Review.
 42. Memon RA, Staprans I, Noor M, Holleran WM, Uchida Y, Moser AH, Feingold KR, Grunfeld C. Infection and inflammation induce LDL oxidation in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000 Jun;20(6):1536-42.
 43. Nguyen-Khoa T, Massy ZA, De Bandt JP, Kebede M, Salama L, Lambrey G, Witko-Sarsat V, Drüeke TB, Lacour B, Thévenin M. Oxidative stress and haemodialysis: role of inflammation and duration of dialysis treatment. *Nephrol Dial Transplant*. 2001 Feb;16(2):335-40.
 44. Torzewski M, Rist C, Mortensen RF, Zwaka TP, Bienek M, Waltenberger J, Koenig W, Schmitz G, Hombach V, Torzewski J. C-reactive protein in the arterial intima: role of C-reactive protein receptor-dependent monocyte recruitment in atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000 Sep;20(9):2094-9.

45. Soutar AK, Naoumova RP. (2007). Mechanisms of disease: genetic causes of familial hypercholesterolemia. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* 4(4): 214-225.
46. Bertolini S, et al. (2000). Clinical expression of familial hypercholesterolemia in clusters of mutations of the LDL receptor gene that cause a receptor- defective or receptor-negative phenotype. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 20: E41-52
47. Klose G, et al. (2014) Familial hypercholesterolemia: developments in diagnosis and treatment. *Dtsch Arztebl Int.* 111(31-32):523-9.
48. Fasano T., Cefalù AB et al. A novel loss of function mutation of PCSK9 gene in white subjects with low-plasma low-density lipoprotein cholesterol. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007; 27:677-681
49. Musunuru K. et al., Exome sequencing, ANGPTL3 mutations, and familial combined hypolipidemia. *NEJM* 2010; 363:2220-2227
50. Arca M. et al. The angiopoietin-like protein 3: a hepatokine with expanding role in metabolism. *Curr Opin Lipidol* 2013, 24:313–320
51. Pisciotta L. et al. Characterization of three kindreds with familial combined hypolipidemia caused by loss-of-function mutations of ANGPTL3. *Cardiovasc Genet* 2012; 5:42–50.
52. Identification of a novel mutation in the ANGPTL3 gene in two families diagnosed of familial hypobetalipoproteinemia without APOB mutation. Noto D. Cefalu' AB et al. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012;32:805
53. Minicocci I, et al. Mutations in the ANGPTL3 gene and familial combined hypolipidemia: a clinical and biochemical characterization. *J Clin Endocrinol Metab* 2012; 97:E1266–E1275.
54. Israel MA et al. Probing sporadic and familial Alzheimer's disease using induced pluripotent stem cells. *Nature* 2012; 482:216-20
55. Tarugi P, Aversa M, Di Leo E, et al. Molecular diagnosis of hypobetalipoproteinemia: an ENID review. *Atherosclerosis* 2007; 195(2):e19-27.
56. Tarugi P, Aversa M. Hypobetalipoproteinemia: genetics, biochemistry, and clinical spectrum. *Adv Clin Chem* 2011; 54:81-107.
57. Gutiérrez-Cirlos C, Ordóñez-Sánchez ML, Tusié-Luna MT, Patterson BW, Schonfeld G, Aguilar-Salinas CA. Familial hypobetalipoproteinemia in a hospital survey: genetics, metabolism and non-alcoholic fatty liver disease. *Ann Hepatol.* Apr-Jun 2011; 10(2):155-64.
58. Di Leo, E., Magnolo , L., Bertolotti , M., Bourbon, M., Carmo Pereira, S., Pirisi, M., Calandra, S., and Tarugi, P. (2008) Variable phenotypic expression of homozygous familial

- hypobetalipoproteinaemia due to novel APOB gene mutations. *Clin Genet* 2008; 74: 267–273.
59. Welty FK, Lahoz C, Tucker KL, Ordovas JM, Wilson PWF, Schaefer EJ. Frequency of ApoB and ApoE gene mutations as causes of hypobetalipoproteinemia in the Framingham offspring population. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18:1745–1751.
60. Linton MF, Farese RV Jr, Young SG. Familial hypobetalipoproteinemia. *J Lipid Res* 1993; 34:521–541.
61. Sankatsing RR, Fouchier SW, de Haan S, Hutten BA, de Groot E, Kastelein JJP, Stroes ESG. Hepatic and Cardiovascular Consequences of Familial Hypobetalipoproteinemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25:1979-1984.
62. Surya II, Mommersteeg M, Gorter G, Erkelens DW, and Akkerman JW Abnormal platelet functions in a patient with abetalipoproteinemia. *Thromb Haemost* 1991; 65:306–311.
63. Aviram M, Deckelbaum RJ, and Brook JG. Platelet function in a case with abetalipoproteinemia. *Atherosclerosis* 1985; 57:313–323.
64. Shastri KM, Carvalho AC, and Lees RS. Platelet function and platelet lipid composition in the dyslipoproteinemias. *J Lipid Res* 1980; 21(4):467-72.
65. Calzada C, Véricel E, Colas R, Guillot N, El Khoury G, Draï J, Agnès Sassolas A, Peretti N, Ponsin G, Lagarde M, Moulin F. Inhibitory effects of *in vivo* oxidized high-density lipoproteins on platelet aggregation: evidence from patients with abetalipoproteinemia. *The FASEB Journal* 2013; 27:2855-2861.
66. Di Costanzo A, Di Leo E, Noto D, Cefalù AB, Minicocci I, Polito L, D'Erasmus L, Cantisani V, Spina R, Tarugi P, Averna M, Arca M. Clinical and biochemical characteristics of individuals with low cholesterol syndromes: A comparison between familial hypobetalipoproteinemia and familial combined hypolipidemia. *J Clin Lipidol*. 2017 Sep - Oct;11(5):1234-1242.
67. Cefalù AB, Noto D, Magnolo L, et al. Novel mutations of CETP gene in Italian subjects with hyperalphalipoproteinemia. *Atherosclerosis* 2009;204(1):202-7.

68. Zhong S., Sharp DS, Grove JS, et al. Increased coronary heart disease in Japanese-American men with mutation in the cholesteryl ester transfer protein gene despite increased HDL levels. *J. Clin Invest* 1996; 97:2917–2923.
69. Fam SS, Morrow JD. The isoprostanes: unique products of arachidonic acid oxidation—a review. *Curr Med Chem.* 2003 Sep;10(17):1723-40. Review.
70. Roberts LJ, Morrow JD. Measurement of F(2)-isoprostanes as an index of oxidative stress in vivo. *Free Radic Biol Med.* 2000 Feb 15;28(4):505-13. Review.
71. Morrow JD, Roberts LJ. Mass spectrometric quantification of F2-isoprostanes in biological fluids and tissues as a measure of oxidant stress. *Methods Enzymol.* 1999;300:3-12.