



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PISA
FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

Corso di Laurea in Medicina e Chirurgia

TESI DI LAUREA

*Confronto tra due metodi di stima della dimensione
delle lipoproteine a bassa densità*

Relatore:

PROF. ANDREA NATALI

Candidato:

LORENZO SANZONE

Anno Accademico 2012-2013

‘Non tocca a noi dominare tutte le maree del mondo,
il nostro compito è di fare il possibile per la salvezza degli anni nei quali viviamo,
sradicando il male dai campi che conosciamo,
al fine di lasciare a coloro che verranno dopo terra sana e pulita da coltivare.’

J.R.R. Tolkien

Sommario

| | |
|---|----|
| RIASSUNTO..... | 1 |
| INTRODUZIONE | 3 |
| <i>Importanza delle LDL piccole e dense</i> | 3 |
| <i>Generalità delle lipoproteine</i> | 5 |
| <i>Classificazione e metodi di separazione delle sottoclassi LDL</i> | 8 |
| <i>Cenni del metabolismo lipoproteico e origine delle sottoclassi LDL</i> | 11 |
| <i>LDL piccole e dense nei disturbi del metabolismo e in altre condizioni patologiche</i> | 16 |
| <i>Alterazioni del metabolismo</i> | 16 |
| <i>Malattia renale cronica</i> | 18 |
| <i>Disfunzione endoteliale</i> | 20 |
| <i>Aterogenicità delle sd-LDL</i> | 23 |
| <i>Ruolo delle LDL piccole e dense come biomarker</i> | 25 |
| <i>Rischio cardiovascolare</i> | 25 |
| <i>Rischio cerebrovascolare</i> | 28 |
| <i>Modulazione farmacologica delle sottoclassi LDL</i> | 32 |
| <i>Statine</i> | 32 |
| <i>Fibrati</i> | 33 |
| <i>Ezetimibe</i> | 33 |
| CONFRONTO FRA DUE METODI DI STIMA DELLA DIMENSIONE DELLE LIPOPROTEINE A BASSA DENSITA' | 35 |
| <i>Razionale</i> | 35 |
| <i>Scopo</i> | 40 |
| <i>Materiali e metodi</i> | 41 |
| <i>Soggetti</i> | 41 |
| <i>Protocollo sperimentale</i> | 41 |
| <i>Analisi statistica dei dati</i> | 42 |
| <i>Risultati</i> | 43 |
| <i>Caratteristiche della popolazione</i> | 43 |
| <i>Caratterizzazione del profilo lipoproteico attraverso DGUC</i> | 44 |
| <i>Confronto fra formula di Hattori e formula di Pisa</i> | 46 |
| <i>Confronto fra formula di Pisa e parametro Rf</i> | 46 |
| <i>Confronto fra formula di Pisa e parametro (13-17):(13-25)</i> | 47 |
| <i>Confronto fra (C-LDL + TG-LDL)/apoB-LDL e misure di densità</i> | 48 |
| <i>Divisione in quartili secondo il parametro (13-17):(13-25)</i> | 52 |

| | |
|---------------------------|----|
| <i>Discussione</i> | 55 |
| <i>Bibliografia</i> | 59 |

RIASSUNTO

L'eterogeneità delle LDL è nota da decenni, e nel tempo sono state elaborate numerose metodiche atte a separarle secondo densità o dimensione.

Sono stati così identificati tre diversi tipi di pattern LDL: di tipo A, caratterizzato dalla prevalenza di LDL grandi e leggere (*large buoyant LDL*); di tipo B, dato dalla predominanza di particelle piccole e dense (*small dense LDL*); infine un fenotipo intermedio fra i due.

Le LDL *small dense* sono considerate maggiormente aterogene, e il pattern di tipo B è stato riscontrato in misura maggiore nei disturbi del metabolismo, nella disfunzione endoteliale, nella malattia cardio e cerebrovascolare.

Oggi le LDL piccole e dense sono considerate un promettente fattore predittivo di eventi cardiovascolari, e la loro valutazione permetterebbe una migliore stratificazione del rischio; tuttavia la difficoltà nel poter disporre dell'analisi laboratoristica del profilo LDL per ciascun paziente, ha promosso la ricerca di strategie capaci di stimare la dimensione media di queste particelle a partire da parametri lipidici comunemente dosati nella pratica clinica.

Si è affermata l'ipotesi che il rapporto fra colesterolo e apoB delle LDL rappresenti un plausibile indice della loro dimensione; Hattori et al. hanno elaborato una formula per approssimare il valore di questo rapporto, allo scopo di evitare il dosaggio di C-LDL e apoB-LDL, e con la sola misura di: colesterolo totale e HDL; trigliceridi; apoB totale. Noi abbiamo sviluppato una nuova formula, mirando a stimare più precisamente il valore del rapporto,

grazie alla misura diretta del colesterolo LDL e alla diversa modalità di calcolo dell' apoB-LDL.

Le due formule sono state confrontate utilizzando i dati lipidici e i parametri relativi alla densità delle LDL, ottenuti attraverso ultracentrifugazione di campioni di plasma di una popolazione di 86 soggetti.

E' stato osservato che la stima di dimensione delle LDL offerta da entrambe le formule era priva di associazione con i parametri di densità; si ritrovava invece una relazione modesta ma significativa quando come misura approssimativa di dimensione erano considerati sia la quota di C-LDL che di TG-LDL rispetto all'apoB-LDL. Ciò è sembrato suggestivo dell'imprecisione del rapporto fra C-LDL e apoB-LDL quale indice di dimensione di queste particelle; ha evidenziato inoltre la necessità di studi futuri volti a delucidare il ruolo della componente dei trigliceridi nella determinazione di dimensione e densità delle LDL.

La divisione della popolazione in quartili, secondo i valori di un parametro di densità lipoproteica da noi sviluppato, ha mostrato l'associazione significativa delle LDL dense con bassi valori di colesterolo HDL e alti livelli di trigliceridi, confermando un assetto lipidico frequentemente descritto in letteratura come 'triade aterogenica'.

INTRODUZIONE

Importanza delle LDL piccole e dense

La malattia cardiovascolare, seguita da quella cerebrovascolare, rappresenta oggi la principale causa di morte nel mondo;¹ tale primato è attribuito a diversi classici fattori di rischio, ben chiariti dall' Adult Treatment Panel III del National Cholesterol Education Program, comprendenti fra gli altri: dislipidemia, diabete mellito, obesità, ipertensione, familiarità, fumo di sigaretta.¹ Fra questi, l'ipercolesterolemia è fra i più evidenti disordini causali di aterosclerosi: studi epidemiologici su larga scala² hanno dimostrato la relazione lineare fra i valori di colesterolo e l'incidenza di eventi ischemici, nonchè la notevole riduzione del rischio di futuri eventi cardiovascolari attuabile attraverso l'abbassamento dei valori di colesterolemia; tale parametro è quindi giustamente ritenuto un target terapeutico primario.

Tuttavia, il persistere di un rischio residuo di eventi nei pazienti sottoposti a terapia ipocolesterolemizzante, associato all'evidenza che molti pazienti con CVD (*cardiovascular disease*) hanno livelli di colesterolo negli stessi range di soggetti sani,^{3,4} ha stimolato la ricerca di mezzi capaci di ridurre il fardello dell'aterosclerosi e di ulteriori validi strumenti in grado di migliorare la stratificazione degli individui a rischio di eventi cardiovascolari; a questo

proposito, si è ormai accumulato un notevole corpo di evidenze a favore del fatto che, oltre all'ammontare delle lipoproteine di bassa densità, anche la loro specifica natura è strettamente connessa allo sviluppo e progressione della patologia aterosclerotica,⁵⁻⁸ e le particelle LDL piccole e dense (*small dense LDL, sd-LDL*) sono oggi riconosciute come un fattore di rischio cardiovascolare emergente.¹

Generalità delle lipoproteine

Le lipoproteine sono grandi complessi macromolecolari plasmatici, costituiti da un nucleo di lipidi idrofobici, ossia trigliceridi ed esteri del colesterolo, circondato da un mantello formato da un singolo strato di molecole anfipatiche: fosfolipidi, colesterolo non esterificato, e proteine dette apolipoproteine (indicate col termine *apo*).

La funzione delle lipoproteine risiede nel trasporto dei lipidi ai tessuti periferici, e da questi verso il fegato; tuttavia, gli acidi grassi liberi e la lisolecitina circolano semplicemente veicolati dall'albumina.

In base alla loro densità relativa, misurata attraverso ultracentrifugazione, le lipoproteine vengono distinte in cinque classi principali, denominate, in ordine di densità crescente: chilomicroni, VLDL (*very low-density lipoprotein*), IDL (*intermediate-density lipoprotein*), LDL (*low-density lipoprotein*), HDL (*high-density lipoprotein*); ciascuna classe rappresenta in realtà una famiglia di particelle, nella quale sono ulteriormente identificabili delle sottopopolazioni, eterogenee in termini di dimensione, carica, densità e composizione fisico-chimica⁵⁻¹⁰. Una sesta classe, la lipoproteina(a), ha caratteristiche simili alle LDL, ma contiene la proteina addizionale apo(a), sintetizzata dal fegato e coniugata all'apoB100 attraverso un legame covalente.

Le apolipoproteine svolgono funzioni essenziali: dall'assemblaggio alla stabilità strutturale delle lipoproteine, dal ruolo di cofattori nell'attivazione di

enzimi del metabolismo, alla funzione di ligando per i recettori esposti sulle superfici cellulari.

L' apoB è la principale proteina strutturale di chilomicroni (apoB48) e di VLDL, IDL e LDL (apoB100); una singola copia di tale apoproteina è presente in ciascuna di queste particelle.

La apoB100 è sintetizzata dall' epatocita, mentre la apoB48 è prodotta nell'intestino; le due apoB derivano dallo stesso gene, ma l'mRNA che ne è trascritto viene sottoposto, nell'enterocita, ad un processo di *editing*, che dà origine alla B48.

L' apoE è presente in copie multiple su chilomicroni, VLDL e IDL, e possiede un ruolo chiave nel metabolismo delle lipoproteine ricche in TG (*trigliceridi*), analogamente alle tre apo del gruppo C; fra queste, la C-II rappresenta il cofattore obbligatorio dell'enzima LpL (*lipoproteinlipasi*). La principale apo delle HDL è invece la A-I, localizzata di fatto su tutte queste particelle, seguita in termini di abbondanza dalla apoA-II.

Per un riassunto delle caratteristiche principali delle diverse classi lipoproteiche, si veda Tab.1.

Tabella 1 - Caratteristiche generali della lipoproteine

| Classe lipoproteica | Densità (g/ml) | Dimensioni (nm) | Mobilità elettroforetica | Apolipoproteina Principale |
|----------------------------|-----------------------|------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|
| Chilomicroni | 0,930 | 80 - 1200 | origine | apoB48 |
| VLDL | 0,930 - 1,006 | 30 - 80 | pre- β | apoB100 |
| IDL | 1,006 - 1,019 | 25 - 35 | pre- β lenta | apoB100 |
| LDL | 1,019 - 1,063 | 18 - 25 | β | apoB100 |
| HDL | 1,063 - 1,210 | 5 - 12 | α | apo A-I |
| Lp(a) | 1,050 - 1,120 | 25 | pre- β | apo(a) |

Classificazione e metodi di separazione delle sottoclassi LDL

Le LDL sono rappresentate dalla frazione lipoproteica con densità compresa fra 1,063 e 1,019 g/ml, e dimensione, misurata con elettroforesi su gel, tra 18 e 25 nm. La loro eterogeneità fu scoperta sul finire degli anni Quaranta del secolo scorso,^{11,12} e nel corso del tempo sono state messe a punto numerose metodiche atte alla loro separazione.

Utilizzando l'ultracentrifugazione in gradiente di densità (DGUC),^{5-7,9,13-18} risulta possibile identificare quattro sottoclassi, indicate da I a IV in ordine di densità crescente: LDL I fra 1,019 e 1,023 g/ml; LDL II fra 1,023 e 1,034 g/ml; LDL III fra 1,034 e 1,044 g/ml; infine LDL IV fra 1,044 e 1,060 g/ml. La predominanza delle sottoclassi I e II è definita come pattern A, mentre quella delle sottopopolazioni III e IV è indicata come pattern B;^{18,19} è possibile riconoscere anche un fenotipo 'intermedio' fra i due.^{18,19}

Alcuni studi^{5,6,8} hanno mostrato come la prevalenza del pattern B sia del 5-10% nei giovani uomini e nelle donne sotto i 20 anni, del 30% negli uomini adulti e 20% circa nelle donne in post menopausa; è stato inoltre evidenziato come i soggetti con pattern B esibiscano spesso un profilo lipoproteico aterogenico,²⁰ conosciuto anche come 'triade aterogenica', caratterizzato oltre che da sd-LDL, da un aumento dei trigliceridi e una riduzione di HDL-C. Utilizzando invece l'elettroforesi su gel in gradiente (GGE) in condizioni non denaturanti, basandosi quindi sulla mobilità elettroforetica, dipendente da dimensione e forma delle

particelle, sono state identificate sette diverse sottoclassi, raggruppate però in quattro sottopopolazioni maggiori, indicate ancora, analogamente a quelle individuate tramite DGUC, da LDL I a LDL IV.^{8,10,14,16,21}

Le LDL I hanno un diametro compreso fra i 28,5 e i 26,5 nm; le LDL II fra 26,4 e 25,5 nm; le LDL III tra 25,4 e 24,2 nm; infine le LDL IV fra 24,1 e 22,0 nm.

Anche rispetto a questa classificazione, in funzione prevalentemente del criterio dimensionale, è possibile distinguere due fenotipi, sulla base del valore del picco di diametro delle particelle LDL: pattern A se maggiore di 25,5 nm, corrispondente a LDL mediamente più grandi, e pattern B se inferiore a 25,5 nm, caratterizzato da LDL più piccole.

E' stato affermato che il diametro delle LDL correla bene, anche se non perfettamente, con la loro densità,²² ragione per cui ci si riferisce generalmente alle piccole LDL con l'espressione '*small dense LDL*' e alle particelle più grandi con i termini '*large buoyant LDL*'.

Altre metodiche utilizzate per la discriminazione delle LDL in base alla loro dimensione sono rappresentate da: TGE (tube gel electrophoresis);^{23,24} spettroscopia NMR;^{25,26} cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC);²⁷ analisi della mobilità ionica;^{28,29} diffusione dinamica della luce (DLS).³⁰

Hirano et al. hanno per primi elaborato un saggio omogeneo per il dosaggio di sd-LDL-C,³¹ successivamente modificato allo scopo di renderlo più semplice e conveniente, ottenendo un 'saggio diretto' capace di separare le small dense

LDL dalle loro controparti 'large buoyant' attraverso l'uso di un detergente e dell'enzima sfingomielinasi.^{32,33}

Cenni del metabolismo lipoproteico e origine delle sottoclassi LDL

Il trasporto dei lipidi esogeni, ovvero quelli assorbiti dal lume intestinale, e più precisamente nel tenue prossimale, ha inizio negli enterociti con l'impacchettamento di trigliceridi, colesterolo e vitamine liposolubili, a partire dalla apoproteina strutturale B-48, a formare i chilomicroni; questi sono secreti nella linfa intestinale, e tramite il dotto toracico raggiungono la circolazione sistemica, veicolando trigliceridi ad adipe, muscolo scheletrico e cuore: l'endotelio dei capillari di tali tessuti espone infatti l'enzima LpL, che idrolizza i TG contenuti nei chilomicroni, con rilascio di acidi grassi, captati da parte di adipociti e miociti; per lo svolgimento di questa reazione enzimatica è indispensabile l'apoC-II. I chilomicroni diminuiscono così progressivamente in dimensioni: durante tale processo, le apo A e C sono trasferite alle HDL, allo scopo di mantenere un rapporto ottimale fra le dimensioni del nucleo e del mantello di rivestimento; dalla delipidazione derivano residui che sono rimossi dal fegato, che si appropria in tal modo del colesterolo assorbito nel tenue.

Il trasporto dei lipidi endogeni, invece, si basa su due sistemi: il primo, si riferisce alla secrezione epatica delle lipoproteine contenenti apoB100 e al loro metabolismo; lo scopo è veicolare, analogamente ai chilomicroni, trigliceridi ad adipe e muscolo, oltre che colesterolo, tramite le LDL, ai tessuti periferici; vari studi cinetici sull'uomo^{34,35} depongono a favore del fatto che l'intero range delle lipoproteine contenenti apoB100 possa essere secreto dal fegato; dunque,

IDL e LDL plasmatiche possono derivare, oltre che dal catabolismo intravascolare dei precursori VLDL, anche da una secrezione epatica diretta, che appare inversamente correlata al livello di TG plasmatici: quando questo è basso, una significativa quota dell'apoB è secreta dal fegato nella forma di lipoproteine a densità intermedia e bassa; dall'altro lato, per livelli di TG plasmatici normali o alti, il 90% o oltre dell'apoB è secreta nella forma delle VLDL.

Le lipoproteine di bassissima densità, analogamente ai chilomicroni, sono processate dalla LpL di adipe e muscolo; i residui di tale processo sono rappresentati dalle IDL, le quali hanno breve emivita plasmatica, essendo rapidamente rimosse dal fegato o rimaneggiate, attraverso ulteriore lipolisi e perdita di apoproteine, a LDL; queste contengono circa la metà del colesterolo plasmatico, e conservano, fra le apoproteine, esclusivamente l'unica copia della apoB100, disposta a circondare la sua superficie.³⁶ Queste particelle sono rimosse prevalentemente dal recettore epatico per le LDL, mentre una parte minoritaria dai recettori scavenger dei macrofagi.

Il secondo sistema è quello basato sull'apoA-I: le HDL, secrete in forma discoidale da fegato e intestino tenue, assumono in circolo una forma sferica, caricandosi di colesterolo acquisito da macrofagi, cellule periferiche e da altre lipoproteine. Sono dunque responsabili del trasporto inverso del colesterolo, ossia centripeto, veicolandolo dai tessuti periferici verso il fegato.

Numerose evidenze³⁷⁻³⁹ depongono per l'esistenza di vie metaboliche parallele nel contesto della cascata di delipidazione plasmatica VLDL-IDL-LDL, dalla quale possono dunque derivare prodotti di bassa densità dalle caratteristiche eterogenee, poichè i loro stessi precursori appaiono variegati.

Nei soggetti normolipidemici si ritrovano almeno due principali sottopopolazioni nel contesto sia delle VLDL che delle IDL;^{40,41} per le VLDL si identificano due forme: le VLDL-1, più grandi e ricche in TG (*TG-rich*) e VLDL-2 (considerate, rispetto al tipo 1, come *TG-poor*); analogamente, anche nelle IDL si distinguono la forma *TG-rich* (IDL-1) e la controparte *TG-poor* (IDL-2).

Fisiologicamente, nei soggetti sani, la secrezione epatica delle VLDL-2 è prevalente rispetto a quella VLDL-1, ed è principalmente influenzata dalla sintesi di colesterolo e dalla disponibilità dei suoi esteri.⁴² In contrasto, la secrezione delle VLDL-1 è maggiormente influenzata dalla disponibilità di trigliceridi.^{43,44} Inoltre le VLDL-2 originano anche dal catabolismo intravascolare delle VLDL-1 a opera della LpL, rappresentando una porzione dei residui lipolitici di queste.

Riguardo le IDL, invece, quelle di tipo 1 rappresentano essenzialmente uno *step* della cascata di delipidazione plasmatica a partire da precursori ricchi in TG, mentre le IDL-2 hanno un'origine soprattutto epatica.^{41,45}

Con l'uso di isotopi stabili, si è dimostrata una relazione metabolica fra le larghe VLDL e le piccole LDL, e benchè non siano state ancora definitivamente

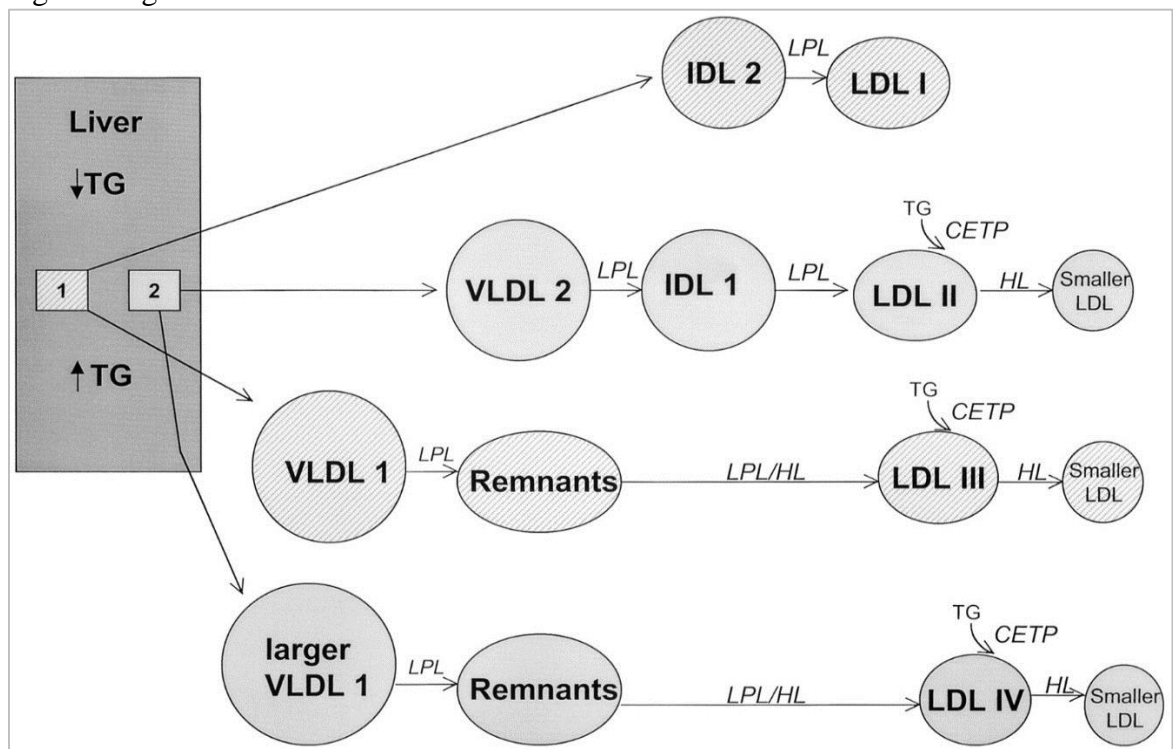
chiarite le specifiche vie precursore-prodotto nella generazione delle diverse sottoclassi LDL, molte osservazioni hanno permesso di ipotizzare meccanismi plausibili.^{5,6,9}

Berneis et al, in conseguenza dei loro studi di cinetica e di intervento sulla dieta,^{5,6} sono giunti a formulare un modello che prevede due vie principali, dipendenti dalla disponibilità epatica di TG (si veda Fig.1); secondo questo schema, il fegato secerne due tipi di precursori delle LDL: lipoproteine contenenti apoB nella forma 'TG-rich' e in quella 'TG-poor'.

In condizioni di bassa disponibilità di TG (*pathway 1*), il fegato secerne VLDL-1 come lipoproteine *TG-rich*, e IDL-2 come particelle *TG-poor*.

Quando invece la disponibilità di TG è alta (*pathway 2*), sono secrete maggiori

Fig.1 - Origine metabolica delle sottoclassi LDL



quantità di lipoproteine più grandi, quali le larghe VLDL-1 (nella forma di *TG-rich*), e VLDL-2 (quali particelle *TG-poor*), da cui derivano IDL1.

Le lipoproteine *TG rich* sono delipidate principalmente dalla LpL e solo parzialmente dalla lipasi epatica (HL), e convertite infine a sottoclassi di LDL piccole e dense (LDL III dalle VLDL-1 e LDL IV dalle larghe VLDL-1). Dai precursori *TG-poor* derivano invece sottoclassi di LDL più grandi, quali le LDL I (da IDL-2) e LDL II (da VLDL-2).

Vari studi⁴⁶⁻⁴⁸ hanno confermato la forte correlazione fra l'aumento di TG plasmatici e l'incremento di densità, parallelo a una riduzione delle dimensioni, delle sottoclassi LDL predominanti; a questo proposito Deckelbaum et al.⁴⁹ hanno descritto profondi cambiamenti fisico-chimici a carico delle LDL in un ambiente plasmatico ricco di TG: l'enzima CETP (*cholesteryl ester transfer protein*) è implicato nell'arricchimento in TG delle LDL (che vengono scambiati con esteri del colesterolo), processo che però sembra realizzarsi in modo apprezzabile quando è anche contemporaneamente presente una bassa quantità di HDL.^{50,51}

Il guadagno in TG da parte delle LDL permetterebbe così di sostenere un ulteriore processo lipolitico, catalizzato però essenzialmente dalla lipasi epatica,⁵² che ha come conseguenza la produzione di sottoclassi LDL più piccole.

LDL piccole e dense nei disturbi del metabolismo e in altre condizioni patologiche

Molti studi hanno dimostrato un aumento della quota delle sd-LDL in alterazioni del metabolismo quali sindrome metabolica,⁵³⁻⁵⁵ diabete,^{56,57} obesità⁵⁸⁻⁶⁰ e dislipidemie,^{33,61} nonché in altre condizioni patologiche quali malattia renale cronica,^{62,63} ipertensione,⁶⁴ PCOS,^{65,66} difetto di GH,⁶⁷ infezione da HIV.⁶⁸

Alterazioni del metabolismo

Considerando i disturbi del metabolismo, è stato mostrato come in soggetti con DM 2 sia presente un' aumentata secrezione di VLDL,^{69,70} in particolare del tipo 1, e una simile iperproduzione è stata verificata anche in individui obesi non diabetici,⁶⁹⁻⁷¹ è stato successivamente dedotto come alla base di tale anomalia giochi un ruolo chiave l'insulino resistenza, elemento comune alle due condizioni, e caratterizzante anche la sindrome metabolica; come esposto in precedenza nel testo, l'importanza di un eccesso di VLDL-1 ricche in TG risiede nell'incremento della formazione, a valle della cascata di delipidazione, di una maggiore quantità di *small dense* LDL.

L'insulino resistenza è associata a una ridotta inibizione della lipasi ormono sensibile del tessuto adiposo, con conseguente aumento della lipolisi e aumentato afflusso di FFA (*free fatty acids*) verso il fegato,^{56,57,72} che stimola

la sintesi di TG da parte degli epatociti;⁷³ la persistenza cronica di tale situazione promuove l'accumulo di TG nel citosol, potendo indurre steatosi epatica non alcolica, e promuovendo la formazione di VLDL-1.

Toledo et al. hanno riportato che pazienti affetti da DM tipo 2 caratterizzati da steatosi epatica moderata e severa, avevano rispettivamente concentrazioni di sd-LDL-C maggiori del 25% e 72% rispetto a quelli senza steatosi epatica;⁷⁴

Cali et al. hanno invece osservato, in soggetti obesi con normale tolleranza glucidica, che quelli caratterizzati da HFF (*hepatic fat fraction*) più alta (>5,5%) avevano una concentrazione di sd-LDL-C del 37% maggiore rispetto ai soggetti con HFF più bassa (<5,5%).⁷⁵

L'insulina possiede sull'epatocita un effetto inibitorio diretto riguardo la sintesi di VLDL (prevalentemente di tipo 1), che in caso di resistenza all'ormone tende ad indebolirsi;^{76,77} ciò contribuisce alla sovrapproduzione di VLDL attraverso alcuni meccanismi chiave: in primis si realizza nell'epatocita una ridotta degradazione post traslazionale dell'apoB,⁷⁸ rendendo così la proteina maggiormente disponibile per l'assemblaggio di VLDL nel reticolo endoplasmatico, nel quale gioca un ruolo essenziale l'enzima MTP (*microsomal transfer protein*): quest'ultimo risulta maggiormente espresso nel caso di insulino resistenza,⁷⁹ poichè la trascrizione del gene che lo codifica è influenzata negativamente dall'insulina; la conseguenza è un incremento della formazione di pre-VLDL, rapidamente lipidate a dare VLDL-2. Infine, è stata documentata un'aumentata attività della fosfolipasi D1 e di ARF-1 (*ADP*

Rybosilation Factor 1);^{56,80} ARF-1 è un fattore coinvolto nel trasporto delle VLDL-2 dal loro sito di formazione, il reticolo endoplasmatico, all'apparato di Golgi dell'epatocita, dove la fosfolipasi D1 è responsabile invece del loro arricchimento in TG, con formazione di VLDL-1.^{81,82}

Inoltre, nella sindrome metabolica, nel DM 2 e nell'obesità viscerale sono stati documentati livelli plasmatici più bassi di adiponectina:⁸³ si ritiene che anche questo elemento contribuisca alla disregolazione della secrezione VLDL-1; l'adiponectina è infatti un ormone peptidico sintetizzato principalmente nel tessuto adiposo, e fra i suoi effetti vi è quello di promuovere l'ossidazione degli FFA nel muscolo scheletrico e nel fegato;⁸⁴ in contrasto, il suo difetto promuove il loro accumulo. Inoltre, dati in vitro⁸⁵ suggeriscono un ruolo dell'adiponectina nell'attivazione del sistema PPAR-alfa, coinvolto nel ridurre la disponibilità di TG per l'assemblaggio delle VLDL; ancora, livelli più bassi dell'ormone renderebbero meno efficace questa via di regolazione.

Malattia renale cronica

Anomali valori di sd-LDL-C sono stati ripetutamente dimostrati nella malattia renale cronica (CKD, *chronic kidney disease*); in tale condizione, la principale causa di morbidità e mortalità è rappresentata dalla malattia cardiovascolare,⁸⁶⁻⁸⁸ quindi, benchè alcuni pazienti infine sviluppino ESRD, la maggioranza dei soggetti affetti da CKD va incontro ad exitus a causa di CVD prima che diventi necessario il ricorso alla dialisi.⁸⁹ Parecchi fattori contribuiscono all'aterogenesi in corso di malattia renale cronica: oltre ai classici fattori di

Framingham, è stato suggerito un ruolo chiave di fattori non tradizionali, correlati all'uremia;⁹⁰ tuttavia è stato dimostrato che, nella CKD da lieve a moderata, tali parametri aggiungono solo poco alla stima del rischio cardiovascolare rispetto all'uso di quelli classici;^{91,92} Chu et al., sulla base di precedenti studi e delle loro stesse osservazioni, hanno proposto dunque l'utilizzo dello sd-LDL-C quale fattore di rischio capace di migliorare la predizione della malattia cardiovascolare in corso di malattia renale cronica.⁹³

I pazienti con funzione renale compromessa esibiscono specifiche alterazioni del metabolismo lipoproteico, con variazioni che dipendono dal grado di compromissione, eziologia, presenza o meno di sindrome nefrosica ed eventuale metodo di dialisi.^{94,95}

L'alterazione più comune è rappresentata nell'ipertrigliceridemia (da incremento delle VLDL),^{96,97} e ad essa è spesso associato l'aumento della quota delle sd-LDL,^{62,63,98,99} nonostante i valori di colesterolo LDL e totale siano generalmente normali o anche ridotti, ad eccezioni dei casi di proteinuria in range nefrosico.¹⁰⁰

Rajman et al. trovarono che un incremento delle sd-LDL sembrava essere una caratteristica precoce della dislipidemia uremica, e che tale anomalia tendeva a persistere anche successivamente al trapianto renale;⁹⁸ Alabakovska et al. hanno dimostrato che, in soggetti in ESRD, la principale anomalia lipidica associata ad aterogenesi era la prevalenza in questi delle sottoclassi più piccole di LDL e HDL.⁶³

Il gruppo guidato da Chu ha invece recentemente resi noti i risultati dell'analisi di 131 soggetti con CKD: questi, rispetto ai controlli, esibivano una minore quantità di colesterolo totale, LDL e HDL, associata però a un incremento significativo di sd-LDL-C e del rapporto fra sd-LDL-C e LDL-C.⁹³

Disfunzione endoteliale

La disfunzione endoteliale, complesso fenomeno patologico che altera l'omeostasi vascolare, rappresenta un marcatore precoce di aterosclerosi. È stata descritta inizialmente in soggetti ipertesi,¹⁰¹ e successivamente riscontrata nel diabete,¹⁰² nella coronaropatia¹⁰³ e nello scompenso cardiaco.¹⁰⁴

Benchè la valutazione della funzione endoteliale non sia ancora entrata nell'uso routinario nel contesto della pratica clinica, un crescente corpo di evidenze supporta il suo valore predittivo per futuri eventi cardiovascolari: le analisi multivariate di 10 studi con un follow up lungo fino a 92 mesi hanno dimostrato che la disfunzione endoteliale è associata ad un aumento del rischio da 3 a 5 volte.¹⁰⁵

Alcuni studi hanno confrontato il grado di disfunzione endoteliale nel circolo coronarico¹⁰⁶ o in vasi periferici,¹⁰⁷⁻¹¹⁰ testando l'associazione fra questo e le sottoclassi lipoproteiche.

Ford, McConnell et al.¹⁰⁶ hanno studiato la funzione dell'endotelio coronarico, tramite somministrazione intracoronarica di acetilcolina (vasodilatatore endotelio-dipendente), in un campione di 490 pazienti, composto in maggioranza da donne e soggetti di razza caucasica, con età media di circa 50

anni; è stato dimostrato che la disfunzione endoteliale epicardica non correlava ai parametri lipidici convenzionali, ma che era invece associata a sd-LDL-C, relazione che persisteva nonostante aggiustamenti per età, genere, diabete, trigliceridi, pressione arteriosa e uso di statine.

Woodman et al.¹⁰⁹ hanno valutato la funzione endoteliale nel microcircolo dell'avambraccio, misurando il parametro FBF (*Forearm Blood Flow*) mediante pletismografia ad occlusione venosa e somministrazione di acetilcolina in arteria brachiale, in un gruppo di 43 soggetti affetti da DM tipo 2, paragonandola a quella di un gruppo di controlli. I diabetici avevano funzione endoteliale alterata rispetto ai controlli, ed è stato dimostrato che la dimensione delle LDL ($r=0.41$; $p=0.007$) era predittiva della risposta FBF alla somministrazione di Ach, indipendentemente da età, genere, PAS.

Uno studio su un campione di donne in menopausa ha concluso che i valori aumentati di sd-LDL nei soggetti in sovrappeso erano correlate a disfunzione endoteliale, e che questa era ridotta dal trattamento con fluvastatina, verosimilmente perchè il farmaco era responsabile della riduzione della frazione delle sd-LDL.¹¹⁰

Okumura et al.¹⁰⁸ hanno reclutato 120 uomini giapponesi apparentemente sani (età media di circa 50 anni), e la loro funzione endoteliale è stata valutata tramite l'iperemia reattiva digitale con tecnica EndoPAT, dalla quale è stato ricavato il parametro RHI (*Reactive Hyperemia Index*); successive analisi di

regressione multipla hanno dimostrato come lo sd-LDL-C rappresentava un determinante indipendente dell'indice di iperemia reattiva.

Aterogenicità delle sd-LDL

La maggiore aterogenicità delle piccole LDL, rispetto alle sottoclassi di maggiori dimensioni, è stata verificata in numerosi studi sperimentali.⁵⁻⁸ In primo luogo, dato il loro diametro inferiore, esse possono penetrare più facilmente attraverso l'endotelio;²² tendono inoltre a permanere più facilmente nello spazio subendoteliale, a causa di una maggiore affinità per i proteoglicani localizzati a tale livello;¹¹¹ è stato osservato, nelle LDL dei soggetti con pattern di tipo B, un ridotto contenuto di acido sialico,⁸ e dato che tale molecola è localizzata sulla superficie di queste particelle, ed espone cariche negative, è verosimile che il suo deficit nelle sd-LDL sia responsabile della minore capacità di repulsione nei confronti dei proteoglicani subendoteliali.

Inoltre, le sd-LDL hanno un'affinità più bassa per il recettore epatico delle LDL, e ciò si traduce in una rimozione plasmatica meno efficace da parte del fegato.^{7,8,112} Questa caratteristica sembra essere condizionata dalla struttura tridimensionale dell'apoB100, ligando del recettore; tale proteina possiede infatti una flessibilità conformazionale intrinseca,^{36,113} e in particelle più piccole si verifica una variazione nell'esposizione di alcuni epitopi, tale da influenzare negativamente il legame al recettore.^{114,115} A ciò contribuiscono due elementi: primo, la maggiore suscettibilità ossidativa delle sd-LDL,^{116,117} correlata a un minor contenuto di molecole antiossidanti, come la vitamina E;^{118,119} secondo, l'aumentata glicazione cui va incontro l'apoB100 nelle

piccole LDL.¹²⁰⁻¹²² Younis et al.¹²⁰ hanno evidenziato come, in 44 soggetti non diabetici, la percentuale di apoB glicata era dieci volte più alta nelle sd-LDL rispetto alle buoyant; il fenomeno è stato dimostrato anche in soggetti con sindrome metabolica e con DM 2.¹²² La glicazione, infatti, coinvolge epitopi molto prossimi al sito di legame col recettore, condizionando negativamente l'affinità di legame;^{123,124} le LDL ossidate e glicate sono così prevalentemente rimosse dai recettori scavenger di macrofagi e cellule endoteliali, promuovendo la formazione di cellule schiumose.¹²⁴

L'ossidazione, inoltre, genera OSE (*oxidation specific epitopes*), i quali possono essere riconosciuti da recettori coinvolti in flogosi e aterosclerosi, quali il TLR-4 (*toll like receptor 4*) e il CD36.¹²⁵

Ruolo delle LDL piccole e dense come biomarker

Rischio cardiovascolare

Studi trasversali, caso controllo e prospettici effettuati nel corso degli anni, si sono dimostrati a favore dello stretto rapporto fra un pattern LDL di tipo B e la malattia cardiovascolare.^{5,6,8,19,126,127}

Fra i primi, Austin et al. determinarono le sottoclassi LDL predominanti in 109 pazienti con coronaropatia e in 121 controlli, trovando che i soggetti con pattern di tipo B avevano un rischio di infarto miocardico tre volte più elevato rispetto a quelli con pattern A, e che questa relazione era indipendente da età e sesso;²⁰ questa associazione è stata poi successivamente confermata da altri autori e in altri gruppi etnici.¹²⁸

Fra gli studi caso controllo, Ai et al.¹²⁹ hanno quantificato lo sd-LDL-C in 1680 donne con e senza coronaropatia, partecipanti al Framingham Offspring Study; i livelli medi di sd-LDL-C erano significativamente più alti in quelle con CAD (*coronary artery disease*) rispetto alle non malate, sebbene i due gruppi avessero livelli medi di LDL-C simili. A differenza delle donne, 1508 uomini con e senza CAD, facenti parte dello stesso studio, avevano simili livelli di sd-LDL-C, ma la percentuale di sd-LDL-C sul colesterolo LDL era più alta nel gruppo con CAD; gli Autori hanno concluso che, poichè gli uomini hanno generalmente più fattori confondenti rispetto alle donne, nel sesso maschile il rapporto fra sd-LDL-C e LDL-C risultava più informativo che non la concentrazione assoluta di sd-LDL-C.

Koba et al.¹³⁰ hanno confrontato 482 pazienti con CAD stabile e 389 soggetti senza coronaropatia, non diabetici e non in trattamento ipolipemizzante; ancora, è stata confermata la dimensione media LDL significativamente più piccola nel gruppo dei casi rispetto ai controlli, e viceversa concentrazioni di sd-LDL-C significativamente maggiori. E' stato poi verificato che, non solo il livello di sd-LDL-C era associato a coronaropatia severa indipendentemente da quello di LDL-C, ma anche che il primo rappresentava un biomarker più potente rispetto al secondo per la determinazione di CAD severa e stabile.

Fra gli studi prospettici, St-Pierre et al.³ hanno stimato, in modo semiquantitativo con GGE, i valori di colesterolo contenuti nelle piccole e grandi sottoclassi LDL in una coorte di 2072 uomini del Quebec Cardiovascular Study; all'inizio del follow up, durato 13 anni, nessun soggetto era affetto da cardiopatia ischemica, ma nel corso degli anni sono stati registrati 262 primi eventi di CAD. E' stata dimostrata l'associazione forte e indipendente fra i valori di sd-LDL-C e il rischio di eventi ischemici, in particolare nei primi 7 anni di follow up, mentre l' aumento di colesterolo nelle sottoclassi LDL più larghe non era correlato all'incremento del rischio di cardiopatia ischemica.

Lo studio Suita,¹³¹ effettuato su una coorte di 2034 soggetti reclutati dalla popolazione urbana giapponese, ha riportato che l'aumento di sd-LDL-C era significativamente associato a incremento del rischio di malattia

cardiovascolare, e specialmente di infarto miocardico, indipendentemente dal valore di LDL-C.

Grammer et al. hanno analizzato 1643 soggetti dello studio prospettico LURIC, basato su una coorte di pazienti indirizzati ad angiografia coronarica; le lipoproteine sono state separate secondo un metodo combinato di ultracentrifugazione-precipitazione, e i pazienti classificati in tre gruppi sulla base del diametro medio delle loro LDL; è stato dimostrato che la mortalità a lungo termine, sia totale che cardiovascolare, era maggiore nei soggetti del gruppo delle LDL piccole rispetto a quello con LDL intermedie, e che tale relazione era essenzialmente indipendente dagli altri fattori di rischio cardiovascolare riconosciuti.¹³²

Nishikura et al. hanno seguito per 7 anni 190 pazienti affetti da CAD stabile: coloro che durante il follow up hanno sviluppato eventi cardiovascolari, avevano un livello significativamente più alto di sd-LDL-C e del rapporto fra sd-LDL-C e LDL-C, così come LDL significativamente più piccole; l'analisi Kaplan-Meier di sopravvivenza libera da eventi ha dimostrato inoltre che i pazienti con sd-LDL-C > 35mg/dl (livello mediano) avevano una prognosi significativamente peggiore; tali risultati hanno confermato lo sd-LDL-C come un marker molto promettente anche nel predire futuri eventi cardiovascolari nella prevenzione secondaria in corso di CAD stabile.¹³³

Recentemente sono stati resi noti i risultati del follow up, durato circa 11 anni, di una coorte formata da 11.419 uomini e donne facenti parte dello studio

birazziale ARIC (*Atherosclerosis Risk In Communities*),¹³⁴ oltre ad ottenere risultati analoghi a studi precedenti, è stato constatato che anche negli individui considerati a basso rischio cardiovascolare sulla base del livello di LDL-C, lo sd-LDL-C era predittivo invece per il rischio di incidenza di CAD.

Rischio cerebrovascolare

Mentre un valore elevato di colesterolo LDL è ritenuto un essenziale fattore di rischio per eventi coronarici, quando il focus si sposta sull'associazione fra questo e gli eventi ischemici cerebrali, la relazione risulta piuttosto debole; in contrasto, nell'ultimo decennio, si sono accumulate molte osservazioni a favore dell'associazione statisticamente significativa fra le alterazioni qualitative delle LDL (in particolare la predominanza di sd-LDL) e la malattia cerebrovascolare.¹³⁵⁻¹³⁷

Zhao et al.¹³⁵ in un ampio studio caso-controllo nella popolazione cinese, hanno analizzato in modo semiquantitativo con GGE lo sd-LDL-C di 299 pazienti con ictus e di 299 controlli; il livello colesterolo contenuto nelle small dense LDL era più alto nei soggetti con ictus (sia ischemico che emorragico) rispetto ai controlli; analisi di regressione multipla hanno dimostrato la significatività di questa relazione anche dopo aggiustamento per TG, HDL-C, LDL-C, pressione arteriosa sistolica; infine, il calcolo degli odds ratio indicava un rischio relativo stimato a 3.111 per ictus ischemico ($p < 0.001$).

Successivamente, Zeljkovic et al.¹³⁶ hanno indagato l'associazione fra le sottoclassi LDL e il rischio sia di ictus ischemico (AIS, *acute ischemic stroke*)

che di mortalità a breve termine dopo tale evento; i casi erano rappresentati da 200 pazienti ricoverati per il primo ictus della loro vita e i controlli da 162 soggetti sani; non solo i casi avevano più LDL delle sottoclassi III e IV, come una maggiore quantità di sd-LDL-C ($p < 0.001$), ma lo sd-LDL-C era significativamente più alto nei pazienti che erano andati incontro ad exitus intraospedaliero ($n = 75$) rispetto ai sopravvissuti; quindi, lo sd-LDL risultava come un fattore predittivo significativo sia per AIS (OR=4.31, $p < 0.001$) che per mortalità intraospedaliera dopo AIS (OR=5.50, $p < 0.05$); la relazione osservata persisteva dopo aggiustamento per i fattori di rischio convenzionali.

Cure et al.¹³⁷ hanno confrontato 54 uomini e donne con recente diagnosi di ictus e 50 controlli; ancora, il diametro medio delle LDL era più piccolo nel gruppo dei casi (26.8 ± 0.31 nm vs. 27.0 ± 0.31 nm, $P = 0.003$) mentre il livello di sd-LDL-C risultava significativamente più alto (8.2 ± 7.8 mg/dL vs. 3.3 ± 3.5 mg/dL, $P < 0.001$).

Nei soggetti affetti da aterosclerosi carotidea, il principale fattore predittivo di ictus ischemico è rappresentato dal grado di stenosi del vaso, che viene misurato tramite ECO in termini di ‘spessore intima-media’ (CA-IMT, Carotid Intima Media Thickness), inteso come la distanza tra l’interfaccia lume-intima e quella media-avventizia della parete della carotide comune e/o di quella interna.

E’ stato inoltre dimostrato come questo parametro rappresenti un indice surrogato di aterosclerosi.

Vari studi^{138,139} hanno riportato come il valore di CA-IMT risulti correlato al livello colesterolo contenuto nelle sd-LDL: Norata et al.¹³⁸ hanno selezionato in modo casuale 156 soggetti sani (senza sintomi né storia clinica di malattia cardiovascolare, dislipidemia, o DM) dallo studio PLIC (Progressione Lesione Intimale Carotidea) investigando la relazione fra CA-IMT e sottoclassi lipoproteiche; gli Autori hanno constatato che solo i valori di colesterolo contenuto nelle sottoclassi corrispondenti alle *TG-rich* e alle *small dense* LDL erano predittivi, e in modo indipendente, della variazione di spessore dell'intima-media carotidea.

Shoji et al.¹³⁹ hanno analizzato i dati di 326 individui che erano stati sottoposti ad ecografia carotidea, fra i quali erano compresi pazienti affetti da dislipidemia (ma non in trattamento con farmaci ipolipemizzanti), DM, ipertensione, malattia renale cronica; esaminando il grado dell'associazione fra le distinte variabili lipidiche e il valore di CA-IMT, hanno constatato come questo mostrasse una relazione più stretta con il livello di sd-LDL-C, piuttosto che con i valori di LDL-C o TG. Tuttavia, sono stati individuati altri fattori, oltre alla gravità della stenosi causata da un ateroma carotideo, capaci di predire il rischio di un evento neurologico acuto, in particolare il grado di instabilità della placca.^{140,141}

Questo risulta particolarmente influenzato dal tipo di cellularità nell'ateroma: l'accumulo di macrofagi e una scarsa proliferazione di CML lo rendono più vulnerabile; è stato dimostrato che la composizione cellulare della placca è

modulata non tanto dal valore di LDL-C, quanto dalla qualità del colesterolo LDL.^{142,143}

Partendo da questi presupposti, Zambon et al.¹⁴⁴ hanno valutato con immunocitochimica il tipo di cellularità in campioni di placche carotidee, ottenuti da 45 pazienti indirizzati a endoarterectomia per grave stenosi; le sottoclassi LDL sono state separate tramite UC in campioni di plasma di tali soggetti; il gruppo ha dimostrato che il valore di sd-LDL-C era significativamente correlato all'accumulo di macrofagi e inversamente associato alla proliferazione di cellule muscolari lisce, mentre non è stata riscontrata una relazione fra la composizione cellulare e i valori di LDL-C, HDL-C e TG; dunque, il livello di colesterolo nelle *small dense* LDL rappresentava un marker di vulnerabilità della placca.

Modulazione farmacologica delle sottoclassi LDL

Il trattamento ipolipemizzante ha dimostrato nella maggioranza dei *trial* la capacità di ridurre lo sd-LDL-C, con effetto generalmente proporzionale alla dose,¹⁴⁵ e indipendentemente da sesso e etnia.²²

Statine

Le statine sono state i farmaci maggiormente valutati, e hanno dimostrato di agire su tutte le sottoclassi LDL: pur avendo nella maggioranza dei casi ridotto i livelli assoluti di sd-LDL-C, con intensità variabile fra diversi agenti, spesso non hanno indotto una variazione, se non minima, della dimensione media delle LDL,⁶ perchè riducendo in modo analogo le sottoclassi LDL sia piccole che grandi, il rapporto fra le due quote rimaneva sostanzialmente simile,³³ ed è stata talvolta riscontrata un' aumentata frequenza del pattern B.¹⁴⁶

La pravastatina ha influenzato positivamente la *size* in alcuni studi^{147,148} ma non in altri;^{149,150} analogamente, la simvastatina ha mostrato effetti significativi,^{151,152} moderati¹⁵³ o assenti;¹⁵⁴ per fluvastatina, atorvastatina e rosuvastatina è stata invece verificata una maggiore efficacia; la prima ha mostrato più frequentemente la modulazione favorevole della dimensione media LDL;¹⁵⁵ analogamente l' atorvastatina.^{156,157} Uno studio su 191 soggetti dislipidemicici, trattati con atorvastatina per 8 settimane, ha mostrato la riduzione significativa di sd-LDL-C ($p < 0,0001$) e l' incremento di *size* delle particelle LDL ($p < 0,01$), con effetti più pronunciati all' aumentare della dose.¹⁴⁵ Ai et al.

hanno confrontato atorvastatina e rosuvastatina in un gruppo di 271 pazienti, trattati a dosi massimali per 6 settimane; i due farmaci hanno mostrato efficacia analoga nel ridurre i livelli di TG, ma la rosuvastatina è risultata migliore nella riduzione di sd-LDL-C.¹⁵⁸

Fibrati

I fibrati sono stati valutati in pazienti dislipidemicici e diabetici, mostrando di essere in grado di agire sia limitando i valori di sd-LDL-C, sia di aumentare la dimensione media delle LDL, con efficacia variabile fra gemfibrozil,¹⁵⁹ bezafibrato¹⁶⁰ e fenofibrato.¹⁶¹

Agouridis et al.¹⁶² hanno valutato i diversi effetti di un trattamento di 12 settimane con rosuvastatina da sola ad alte dosi, rispetto a un dosaggio medio di questa in combinazione a fenofibrato; analizzando la *size* delle LDL con elettroforesi, gli Autori hanno riscontrato che era aumentata in entrambi i casi, ma in misura maggiore nel regime di combinazione.

Ezetimibe

La maggioranza degli studi pubblicati hanno riportato effetti favorevoli di ezetimibe sulle sottoclassi LDL.^{163,164}

Tomassini et al.¹⁶⁵ hanno confrontato, in un trial di 6 settimane in soggetti con DM2 e ipercolesterolemia, il regime di combinazione rappresentato da ezetimibe e simvastatina rispetto alla sola atorvastatina, riscontrando una maggiore riduzione delle LDL dense nel primo caso; in contrasto, Stojakovic

et al.¹⁶⁶ hanno invece descritto che l'aggiunta di ezetimibe a fluvastatina, in soggetti diabetici o affetti da cardiopatia ischemica, non si traduceva in un'ulteriore riduzione delle LDL dense rispetto alla sola fluvastatina.

Winkler et al.¹⁶⁷ hanno indagato, in soggetti diabetici, i diversi effetti fra una monoterapia di ezetimibe e una di simvastatina, rispetto alla combinazione di entrambi, trovando che tutti i regimi riducevano lo sd-LDL-C, la simvastatina più di ezetimibe, e il regime di combinazione nella misura maggiore.

CONFRONTO FRA DUE METODI DI STIMA DELLA DIMENSIONE DELLE LIPOPROTEINE A BASSA DENSITA'

Razionale

Per quanto precedentemente esposto, si è cercato di evidenziare la possibile convenienza, ai fini di una migliore stratificazione del rischio, della determinazione del tipo di pattern LDL caratterizzante un determinato soggetto.

Tuttavia, data la complessità delle procedure di laboratorio, nonché le risorse economiche necessarie per poter disporre dell'analisi delle sottoclassi LDL nei diversi pazienti, sono state cercate strategie alternative capaci di stimare, attraverso l'interpretazione dei dati lipidici e apoproteici comunemente dosati nella routine clinica, dei parametri relativi alla dimensione media delle particelle lipoproteiche a bassa densità.

Fra tali misure derivate, il rapporto fra colesterolo e apoB contenuti all'interno delle LDL, si è imposto da circa due decenni, nell'opinione laboratoristica e clinica, come un plausibile indice della *size* delle LDL stesse.¹⁶⁸

Alla base dell'attendibilità di questo rapporto, si trova l'osservazione che ciascuna di queste particelle contiene una sola molecola di apoB: considerando due soggetti con valori analoghi di C-LDL, ipotizzando che uno abbia valori

maggiori di apoB-LDL, risulta intuibile poterne derivare che questi deve avere un numero maggiore di particelle, che, nella fattispecie, risulteranno mediamente più piccole.

Hattori et al.¹⁶⁸, partendo da tali presupposti, hanno elaborato una formula per stimare il valore del rapporto fra C-LDL a apoB-LDL, senza dover misurare direttamente alcuno dei due parametri, ma ricavandoli da altri analiti lipidici comunemente dosati nella pratica clinica, quali C-tot, C-HDL, TG e apoB100 totale.

Per conseguire tale obiettivo, il gruppo ha condotto analisi statistiche su migliaia di dati ottenuti con l'ultracentrifugazione di campioni di plasma di circa 2000 soggetti; in ciascun campione sono state così separate per densità le diverse classi lipoproteiche, e in ognuna di esse sono stati dosati colesterolo, TG e apoB.

Quindi, sullo schema dell'equazione di Friedewald, sono state costruite due formule approssimate per il calcolo di C-LDL e apoB-LDL; i valori da esse forniti sono stati confrontati, attraverso regressione, con quelli direttamente misurati, trovando in entrambi i casi un'altissima associazione; di seguito è riportata la formula finale di Hattori:

$$\frac{C_{LDL}}{apoB_{LDL}} = \frac{0,94 C_{tot} - 0,94 C_{HDL} - 0,19 TG}{apoB_{tot} - (0,09 C_{tot} - 0,09 C_{HDL} - 0,08 TG)}$$

Analizzando il numeratore traspare la forte analogia con l'equazione di Friedewald, risultando dei coefficienti leggermente diversi; Hattori ha affermato che tale modalità di calcolo per il C-LDL debba essere considerata più precisa, in quanto dal valore così ottenuto sarebbe teoricamente esclusa la quota del colesterolo IDL.

Riassumendo, la formula di Hattori permette di ricavare un valore molto attendibile del rapporto fra C-LDL e apoB-LDL, dunque un parametro informativo della *size* delle LDL, bastando per il calcolo: colesterolo totale e HDL, trigliceridi e apoB totale.

Di recente, abbiamo elaborato una nuova formula per il calcolo del rapporto fra C-LDL e apoB-LDL, allo scopo di apportare un miglioramento nella stima del valore del rapporto stesso; ci siamo infatti basati su presupposti diversi rispetto ad Hattori: i trigliceridi non sono più considerati nella nuova equazione, che prevede invece il dosaggio diretto del colesterolo LDL e una diversa modalità di calcolo dell'apoB-LDL, fondata sull'osservazione del rapporto medio, in termini di peso, fra le diverse costituenti delle VLDL (si veda Fig.2).

In tali particelle, infatti, è stato evidenziato come mediamente il 20% circa del peso corrisponda a colesterolo, mentre un 8% circa all'unica copia di apoB100; vale dunque la seguente equazione:

$$\frac{apoB_{VLDL}}{C_{VLDL}} = \frac{8}{20}$$

che risolta in funzione di $apoB_{VLDL}$:

$$apoB_{VLDL} = \frac{2}{5} C_{VLDL}$$

Sottraendo all'apoB totale la quota contenuta nelle VLDL, e giudicando trascurabile la quantità di apoB-IDL, si ricava l'apoB delle LDL:

$$apoB_{LDL} = apoB_{tot} - apoB_{VLDL}$$

Per le approssimazioni descritte, vale che:

$$apoB_{LDL} = apoB_{tot} - \frac{2}{5} C_{VLDL}$$

Il valore del C-VLDL può essere ricavato sottraendo la quota LDL e HDL dal colesterolo totale, quindi:

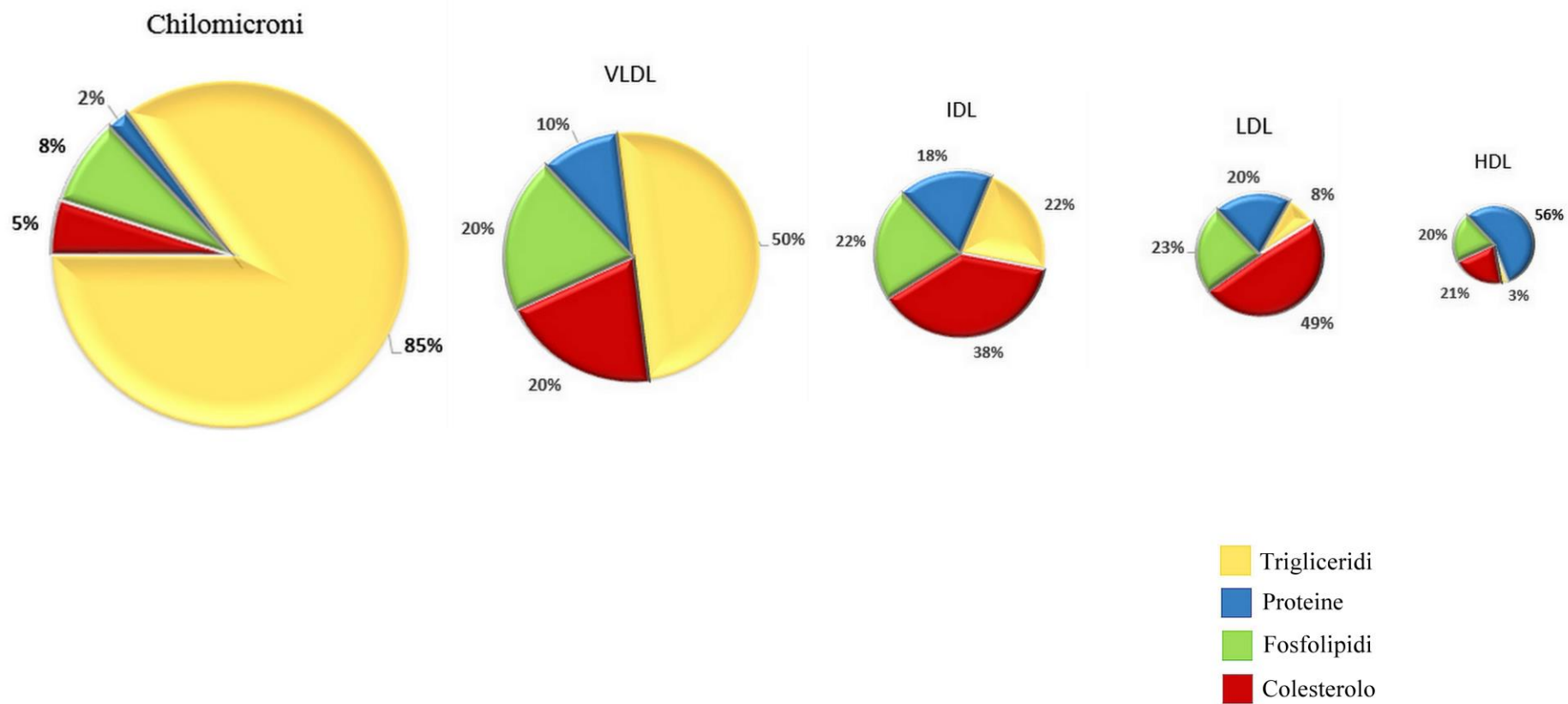
$$apoB_{LDL} = apoB_{tot} - \frac{2}{5} (C_{tot} - C_{LDL} - C_{HDL})$$

Si può concludere con:

$$\frac{C_{LDL}}{apoB_{LDL}} = \frac{C_{LDL}}{apoB_{tot} - \frac{2}{5} (C_{tot} - C_{LDL} - C_{HDL})}$$

Tale equazione rappresenta la formula di Pisa.

Fig.2 - Composizione percentuale delle diverse classi lipoproteiche



Scopo

L'obiettivo principale dello studio è rappresentato dalla valutazione dell'efficacia, rispetto a quella di Hattori, della nostra formula quale migliore modalità di approssimazione del rapporto fra C-LDL e apoB-LDL, attraverso i dati ricavati dall'ultracentrifugazione e frazionamento dei campioni di plasma dei soggetti reclutati.

Materiali e metodi

Soggetti

Per lo studio sono stati selezionati 86 pazienti, reclutati presso il reparto di Medicina Generale ad indirizzo metabolico del Dipartimento di Medicina Interna dell'Università di Pisa.

Protocollo sperimentale

Per ciascun paziente partecipante allo studio sono stati identificati, mediante anamnesi e visita: sesso, etnia, età, presenza o meno di diabete, malattia cardiovascolare, ipertensione, eventuale utilizzo di farmaci ipocolesterolemizzanti; sono stati misurati peso, altezza e circonferenza addominale. A ciascun soggetto è stato praticato un prelievo di sangue venoso a digiuno; tali campioni sono stati quindi centrifugati a 3000 rpm per 15 minuti. Il plasma, opportunamente aliquotato, è stato immediatamente congelato e conservato a -80°C. Su varie aliquote sono stati determinati i valori di colesterolo (totale, LDL, HDL), TG, apoA, apoB, Lp(a).

Una quota di plasma, di volume pari a 1 ml, è stata invece utilizzata per la caratterizzazione del profilo lipoproteico di ciascun paziente: il campione, diluito con 3 ml di una soluzione di KBr di densità pari a 1,21 g/ml, è stato versato in un tubo Beckman da 13 ml; sul campione sono stati quindi stratificati 9 ml di una soluzione di KBr di densità pari a 1,006. I tubi sono stati

ultracentrifugati a 65000 rpm per 70 minuti, ad una temperatura di 6°C; tale procedura ha permesso di separare le diverse classi lipoproteiche in funzione di densità e *flotation rate*.

Successivamente, il contenuto di ciascun tubo Beckman è stato suddiviso in 37 frazioni, attraverso l'uso di una pompa peristaltica e di un collettore di frazioni.

In ciascuna delle frazioni così ottenute è stato dosato il colesterolo.

Analisi statistica dei dati

I valori delle variabili in esame, quando non altrimenti specificato, sono presentati come media e deviazione standard. I confronti fra gli indici di *size* e densità delle LDL sono stati condotti attraverso l'analisi di regressione. I confronti fra i quartili di (13-17):(13-25) sono stati eseguiti mediante ANOVA per le variabili continue e con Chi quadrato nel caso di variabili categoriali.

Le analisi sono state condotte utilizzando il programma JMP® 9 (SAS Institute, Cary, NC).

Risultati

Caratteristiche della popolazione

Sono stati studiati 86 soggetti, 60 maschi e 22 femmine, di età media di $64,9 \pm 7,1$ anni (range 45 - 80); 17 soggetti sono risultati affetti da CVD, 26 da DM, mentre 25 da entrambe le condizioni; 62 erano ipertesi. Le principali caratteristiche della popolazione in studio sono riassunte in Tab.2.

Tab.2 - Caratteristiche della popolazione in studio

| | | |
|-------------------------------|----------------------------------|--------------|
| Genere (M/F) | 60/26 | |
| DM (%) | 30,2 | |
| CVD (%) | 19,8 | |
| DM + CVD (%) | 29,1 | |
| HT (%) | 72,1 | |
| Statine (%) | 59,3 | |
| | Media \pm DS | Range |
| Età (anni) | $64,9 \pm 7,1$ | 45 - 80 |
| BMI (Kg/m²) | $28,3 \pm 3,9$ | 19,6 - 38,3 |
| C-tot (mg/dl) | 185 ± 38 | 107 - 324 |
| C-LDL (mg/dl) | 112 ± 32 | 54 - 240 |
| C-HDL (mg/dl) | 50 ± 12 | 22 - 92 |
| TG (mg/dl) | 133 ± 53 | 61 - 341 |
| apoA (mg/dl) | 150 ± 26 | 87 - 235 |
| apoB (mg/dl) | 92 ± 26 | 51 - 224 |
| Lp(a) (mg/dl) | 29 ± 30 | 3 - 129 |

Caratterizzazione del profilo lipoproteico attraverso DGUC

Riportando su di un grafico i valori di colesterolo ritrovati nelle diverse frazioni in funzione del numero della frazione, è possibile ottenere una curva come quella riportata in Fig.3.

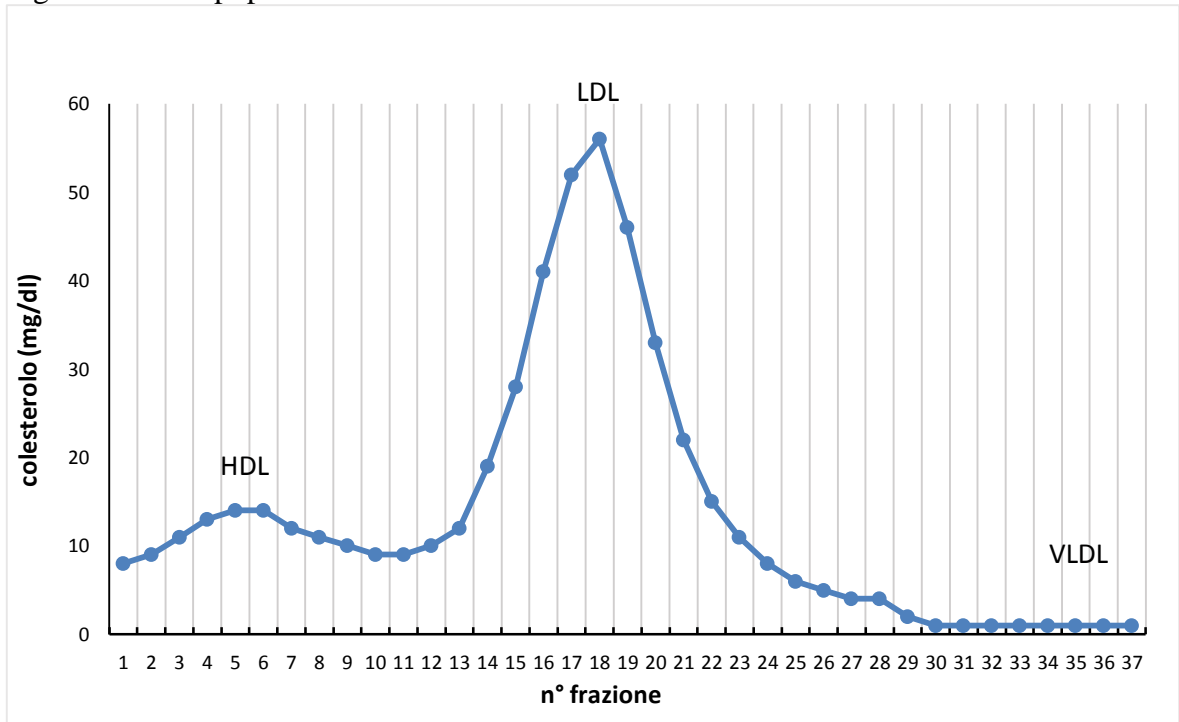
Soggetti diversi possono differenziarsi molto in termini di concentrazioni assolute di colesterolo: allo scopo di poterli meglio confrontare, per ciascun paziente, i valori dosati nelle diverse frazioni sono stati corretti in funzione del colesterolo totale, ricavando valori percentuali, indicativi della quantità relativa di colesterolo per frazione.

Per ciascun soggetto è stato calcolato, dal profilo lipoproteico così ottenuto, il rapporto fra il numero della frazione in cui cadeva il picco del contenuto di colesterolo e il numero delle frazioni ottenute, ricavando il parametro R_f (*Relative flotation*), che rappresenta un indice della *buoyancy* delle particelle LDL.

L'anglosassone *buoyancy* si riferisce a un concetto trasponibile in italiano con il termine 'galleggiabilità': se in un soggetto sono predominanti delle LDL '*less buoyant*', queste, in seguito a UC, tenderanno a spostarsi più in basso, più prossime alla regione dove si sono mosse le HDL, rispetto alle loro controparti '*more buoyant*'; quindi, il picco del contenuto di colesterolo LDL (si veda Fig.2) cadrà in una frazione più prossima alla prima rispetto a un soggetto con LDL caratterizzate da una maggiore *buoyancy*.

Dato uno stesso numero di frazioni totali, il valore del parametro Rf è minore nel primo caso, denotando un inferiore grado di ‘galleggiabilità’ delle LDL.

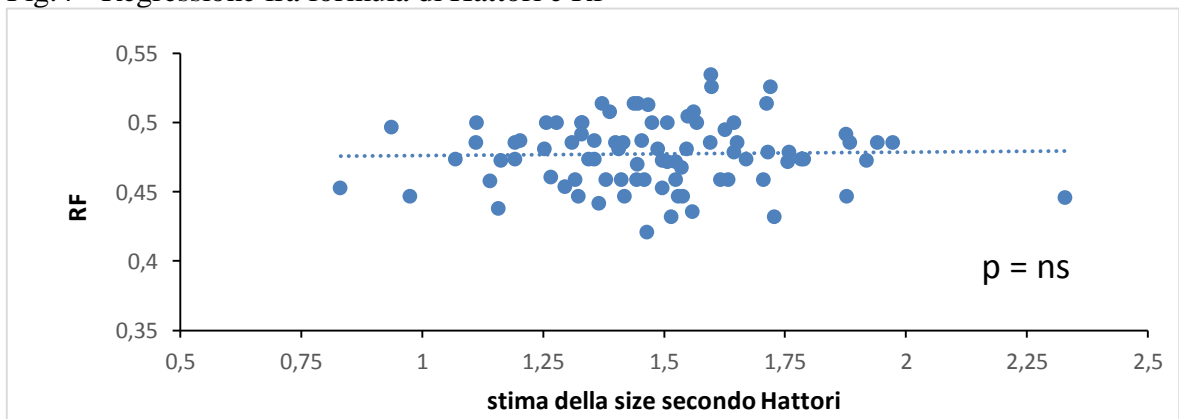
Fig.3 - Profilo lipoproteico ottenuto attraverso DGUC



Confronto fra formula di Hattori e parametro Rf

E' stata analizzata tramite regressione la relazione fra la stima del diametro delle LDL secondo Hattori e l'indice di densità Rf. Non è stata verificata un'associazione significativa (si veda Fig.4).

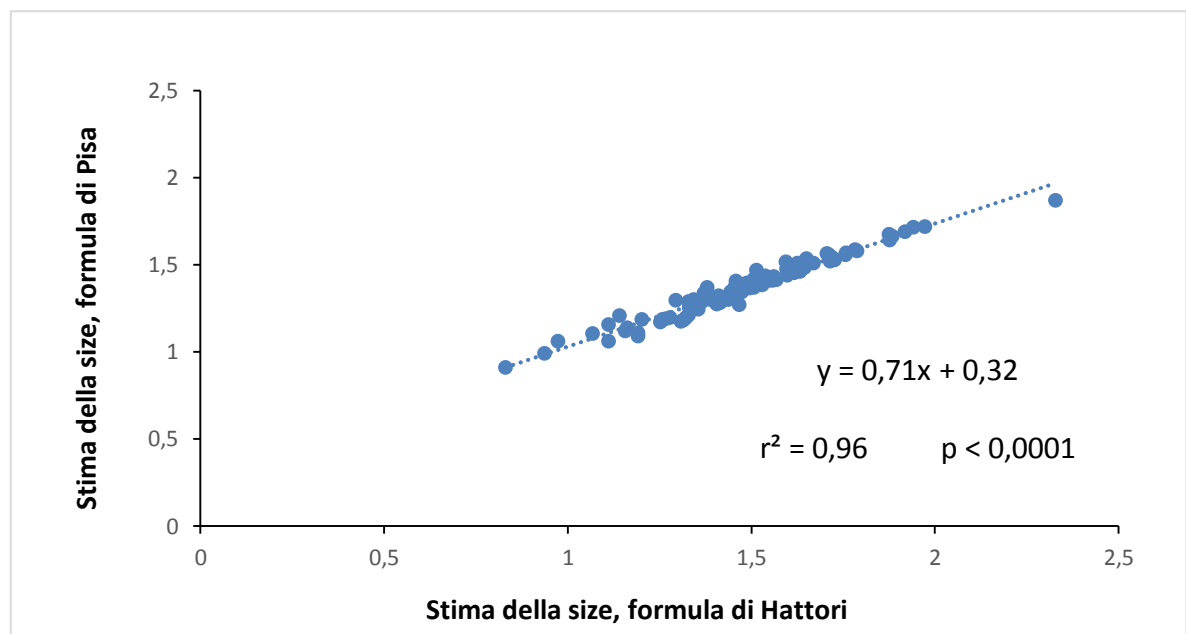
Fig.4 - Regressione fra formula di Hattori e Rf



Confronto fra formula di Hattori e formula di Pisa

Quale premessa alla verifica della convenienza, nella stima della *size* delle LDL, proveniente dall'uso della nostra formula rispetto a quella di Hattori, le due equazioni sono state confrontate attraverso un'analisi di regressione (si veda Fig.5). E' evidente la forte associazione ($r^2 = 0,96$; $p < 0,0001$) tra le distribuzioni dei valori calcolati con le due formule.

Fig.5 - Regressione fra le due formule per la stima della *size*

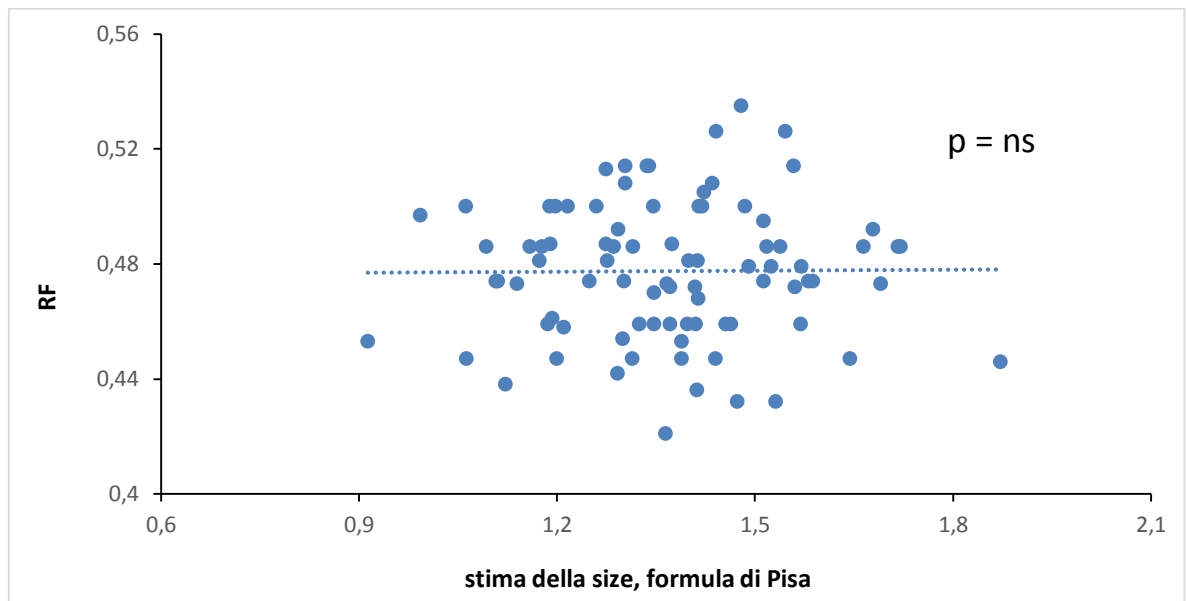


Confronto fra formula di Pisa e parametro Rf

Il passo successivo è stato testare rispetto a Rf, quale innovativo e potenzialmente migliore indice di *size*, la nostra formula.

La regressione ha dimostrato l'assenza di correlazione fra le due variabili (si veda Fig.6).

Fig.6 - Regressione fra misura di size secondo la formula di Pisa e Rf

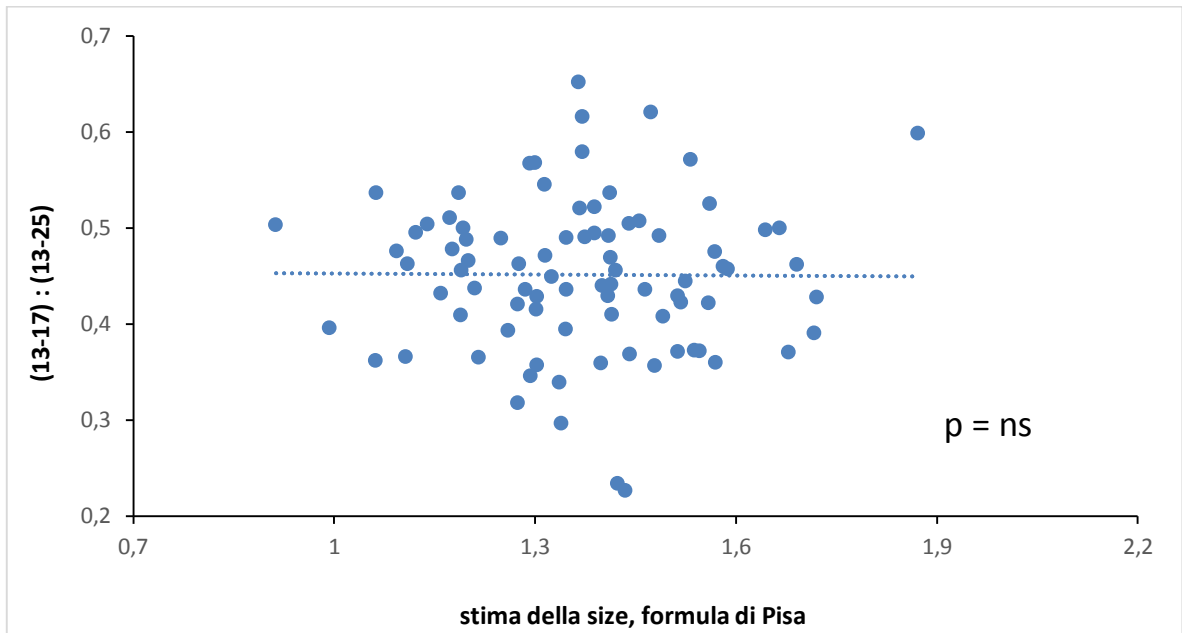


Confronto fra formula di Pisa e parametro (13-17):(13-25)

L'analisi è stata implementata prendendo in considerazione un'ulteriore misura di *buoyancy*, ovvero il parametro (13-17):(13-25), che rappresenta il rapporto fra la somma del colesterolo, in termini di quantità relative, nelle frazioni dalla 13 alla 17 (corrispondenti alla spalla sinistra del picco delle LDL nella curva del profilo lipoproteico) e la somma del colesterolo nelle frazioni dalla 13 alla 25, ritenute quelle comprendenti, nel loro insieme, il C-LDL. Le frazioni dalla 13 alla 15 sono invece quelle in cui viene ad essere contenuto il colesterolo delle LDL più dense.

In Fig.7 sono mostrati i risultati della regressione fra i valori stimati di *size* secondo la nostra formula e il rapporto fra i range di frazioni appena considerato; ne risulta l'assenza di un'associazione significativa.

Fig.7 - Regressione fra misura di size secondo la ns. formula e parametro $(13-17):(13-25)$



Il rapporto fra C-LDL e apoB-LDL, indice teorico di dimensione delle particelle LDL, è sembrato non poter essere messo in correlazione alla densità delle LDL stesse, sia che questa fosse stimata dal fattore Rf o dal parametro $(13-17):(13-25)$.

Confronto fra $(C-LDL + TG-LDL)/apoB-LDL$ e misure di densità

E' stata quindi testata la relazione fra le misure di densità e un parametro di *size* che teneva conto, oltre che del C-LDL, anche dei TG-LDL (la seconda principale costituente lipidica del *core* delle LDL), ovvero il rapporto $(C-LDL + TG-LDL)/apoB-LDL$.

Il valore dei TG-LDL è stato ricavato sottraendo dai TG totali le quote contenute nelle VLDL e HDL:

$$TG_{LDL} = TG_{tot} - TG_{VLDL} - TG_{HDL}$$

Considerando i rapporti in peso fra le diverse componenti delle VLDL (si veda Fig.2) vale la relazione:

$$\frac{TG_{VLDL}}{apoB_{VLDL}} = \frac{50}{8}$$

Quindi:

$$TG_{VLDL} = \frac{25}{4} apoB_{VLDL}$$

Avendo dosato l'apoB totale e avendo ricavato quella delle LDL, ne deriva che:

$$TG_{VLDL} = \frac{25}{4} (apoB_{tot} - apoB_{LDL})$$

Anche i TG-HDL sono calcolabili conoscendo i rapporti medi fra le diversi componenti delle HDL (Fig.2):

$$\frac{TG_{HDL}}{C_{HDL}} = \frac{6}{47}$$

Quindi:

$$TG_{HDL} = \frac{6}{47} (C_{HDL})$$

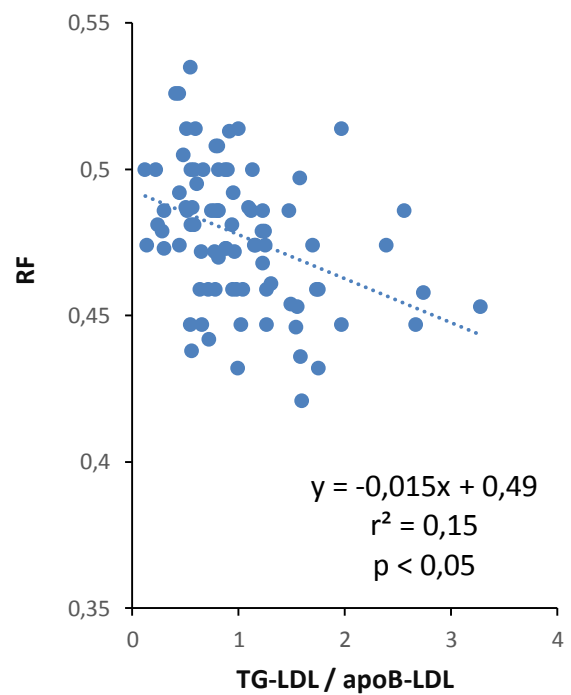
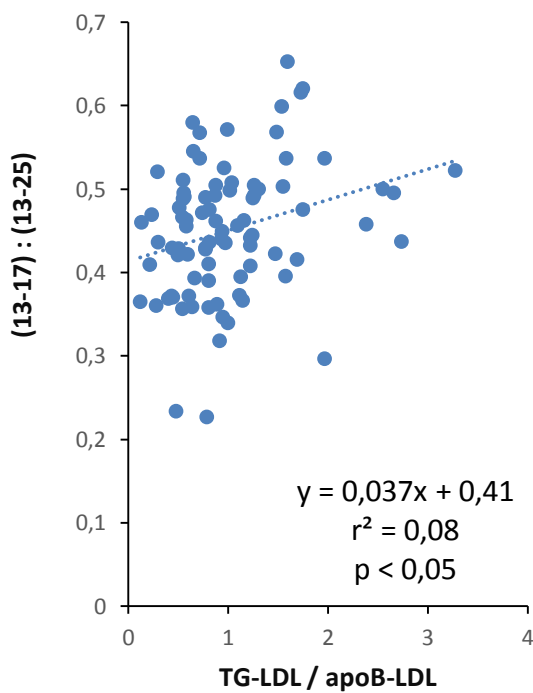
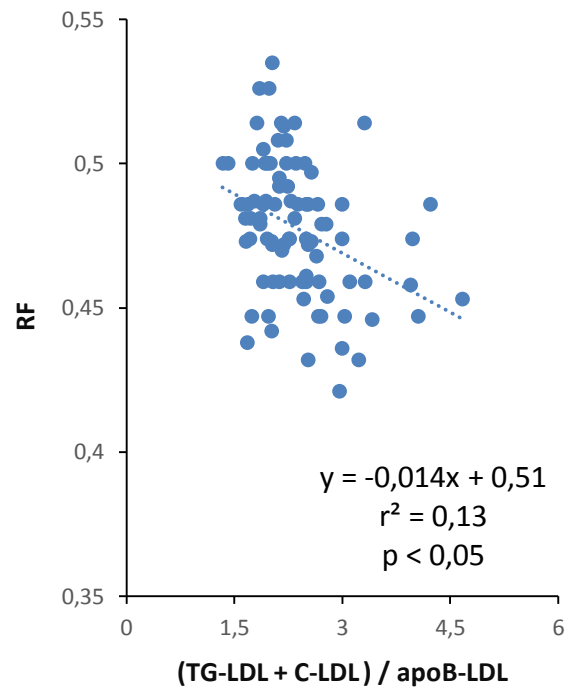
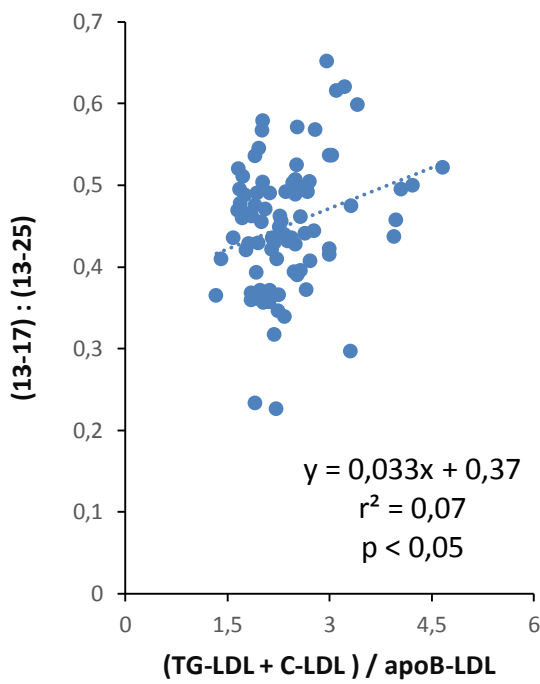
Sostituendo i valori così ricavati nell'equazione iniziale:

$$TG_{LDL} = TG_{tot} - \frac{25}{4} (apoB_{tot} - apoB_{LDL}) - \frac{6}{47} (C_{HDL})$$

L'esito dell'analisi di regressione fra gli indici di densità e il rapporto $(C-LDL + TG-LDL)/apoB-LDL$ è mostrato in Fig.8 , nella quale è considerata, ai fini di completezza, anche la relazione fra gli indici di densità e il rapporto $TG-LDL/apoB-LDL$.

Il neo ipotizzato indice di *size* dimostra una correlazione, anche se modesta, con le misure di densità, in particolare con Rf. Addirittura, è stata verificata un'associazione ancora più forte fra gli indici di densità e il rapporto $TG-LDL/apoB-LDL$.

Fig.8 - Regressioni fra indici di densità e i rapporti: $(C-LDL + TG-LDL)/apoB-LDL$ e $TG-LDL/apoB-LDL$



Divisione in quartili secondo il parametro (13-17):(13-25)

I pazienti sono stati divisi in quartili secondo i valori del rapporto (13-17):(13-25). I valori di (13-17):(13-25) aumentano dal primo all'ultimo quartile, parallelamente alla quantità relativa di sd-LDL.

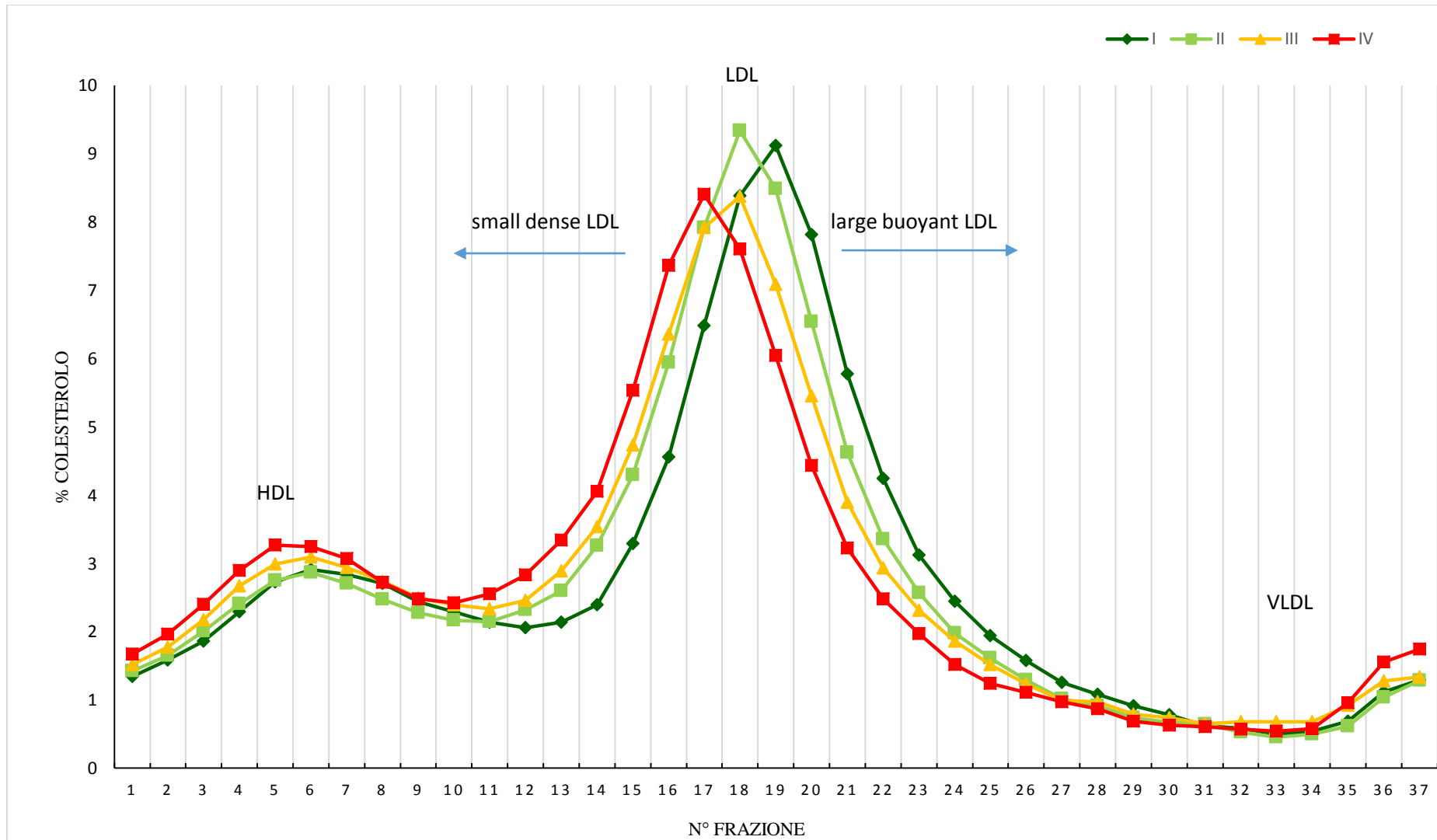
Una descrizione dettagliata dei soggetti dei diversi quartili è esposta in Tab.3, mentre il confronto fra i diversi profili lipoproteici è mostrato in Fig.9.

Tab.3 - Quartili di (13-17):(13-25); la quota relativa di sd-LDL aumenta dal I al IV

| | I quartile | II quartile | III quartile | IV quartile |
|-------------------------------|-------------------|--------------------|---------------------|--------------------|
| Genere (M/F) | 16 / 5 | 15 / 7 | 12 / 10 | 17 / 4 |
| Età (anni) | 64,9 ± 7,2 | 65,3 ± 7,2 | 63,9 ± 7,8 | 65,7 ± 6,5 |
| BMI (Kg/m²) | 28,1 ± 3,8 | 28,4 ± 4,1 | 28,8 ± 4,5 | 27,7 ± 3,8 |
| DM (%) | 33,3 | 22,7 | 27,2 | 38,1 |
| CVD (%) | 23,8 | 22,7 | 9,1 | 19,4 |
| DM + CVD (%) | 14,3 | 27,3 | 36,4 | 38,1 |
| HT (%) | 66,7 | 68,2 | 63,6 | 90,5 |
| Statine (%) | 52,4 | 54,5 | 63,6 | 66,7 |
| C-tot (mg/dl) | 183 ± 27 | 183 ± 41 | 194 ± 50 | 182 ± 27 |
| C-LDL (mg/dl) | 110 ± 24 | 114 ± 33 | 116 ± 43 | 108 ± 23 |
| C-HDL (mg/dl) | 55 ± 12 | 48 ± 13 | 51 ± 12 | 46 ± 12 |
| TG (mg/dl) | 113 ± 42 | 131 ± 47 | 159 ± 75 | 142 ± 44 |
| apoA (mg/dl) | 152 ± 19 | 143 ± 26 | 154 ± 33 | 150 ± 23 |
| apoB (mg/dl) | 87 ± 18 | 90 ± 22 | 98 ± 39 | 91 ± 19 |
| Lp(a) (mg/dl) | 24 ± 28 | 32 ± 30 | 32 ± 33 | 29 ± 33 |

L'analisi statistica ha dimostrato una differenza significativa dei valori di C-HDL fra il primo e quarto quartile ($p = 0,034$), così come dei livelli di TG fra primo e terzo ($p = 0,006$).

Fig.9 - Profili lipoproteici dei quartili secondo DGUC



Discussione

Prima di effettuare il confronto fra i due diversi metodi di stima della dimensione delle lipoproteine a bassa densità, è stato verificato lo stato dell'arte, ovvero sono stati messi in relazione l'indice di *size* presente in letteratura e descritto da Hattori, e la misura di densità offerta dal parametro Rf; dall'analisi non è tuttavia risultata l'associazione significativa e inversa che era ipotizzabile aspettarsi.

Il passo successivo è consistito dunque nell'analisi di regressione fra le due formule, ovvero la nostra rispetto a quella di Hattori; si è dimostrata l'elevata associazione fra le due variabili, che ha rappresentato il preludio alla verifica della nostra equazione quale migliore indice di *size*; questa è stata infatti confrontata al parametro Rf, ma analogamente ad Hattori, la regressione non ha dimostrato un'associazione significativa.

Sospettando che tale risultato potesse dipendere dalla misura di densità considerata finora, al fine di implementare l'analisi, è stato preso in considerazione un ulteriore indice di densità, da noi considerato caratterizzato da una maggiore precisione, ovvero il parametro $(13-17):(13-25)$, confrontandolo con la nostra formula.

Tuttavia, il non aver riscontrato anche in questo caso una relazione significativa, ha lasciato ipotizzare che lo stimare la dimensione delle LDL considerando il solo contenuto di colesterolo rispetto all'apoB rappresenti

verosimilmente un'impresione; per questa ragione, è stato preso in considerazione anche l'altro principale componente lipidico del *core* delle LDL, ovvero i trigliceridi.

In effetti, le analisi di regressione fra questa neo ipotizzata stima di *size*, dove sono considerati rispetto all'apoB sia C-LDL che TG-LDL, rispetto alle misure di densità, hanno restituito una modesta ma significativa associazione ($r^2 = 0,07$ per il parametro (13-17):(13-25), $r^2 = 0,13$ per l'indice Rf; in entrambi i casi $p < 0,05$) lasciando intendere un ruolo importante, anche se poco chiaro, del contenuto di trigliceridi, in associazione a quello di colesterolo, nella determinazione della dimensione LDL; addirittura, il solo contenuto di TG rispetto all'apoB ha dimostrato una relazione ancora più forte con entrambi gli indici di densità, sembrando confermare la necessità di studi volti al chiarimento di come questa componente sia in grado di influenzare sia diametro che *buoyancy* delle LDL.

La divisione della nostra popolazione in quartili secondo i valori del rapporto (13-17):(13-25) è stata effettuata allo scopo di cercare di evidenziare, nei sottogruppi con diversa densità delle LDL, delle differenze cliniche o laboratoristiche sottese a un diverso pattern LDL.

È stata così verificata una differenza statisticamente significativa nei valori di C-HDL e di TG nei quartili con LDL più dense rispetto a quelli con particelle *more buoyant*, e ciò ha confermato l'osservazione frequentemente descritta di come un pattern LDL di tipo B sia molto spesso associato a bassi livelli di

colesterolo HDL e alti valori di TG, a rappresentare quella che è comunemente definita come la *triade aterogenica*.¹⁶⁹⁻¹⁷¹

In conclusione, ci sembra di poter affermare che, data l'accertata bontà dei due parametri indicatori di densità, poichè derivanti dall'oggettiva metodica dell'ultracentrifugazione, nella nostra popolazione costituita da 86 soggetti, si sia potuto legittimamente mettere in discussione l'attendibilità del rapporto fra colesterolo e apoB delle LDL inteso quale stima di *size*, concetto finora dato per scontato in letteratura.

Abbiamo infatti fornito alcune evidenze suggestive che il C-LDL, considerato quale unico costituente lipidico nella particella rispetto all'apoB, non sembri essere in grado di rappresentare un plausibile indice di *size*; a un tale scopo, pare più informativo e conforme alla realtà considerare sia la quota di colesterolo che di trigliceridi rispetto all'apoB.

E' necessario tuttavia sottolineare come lo stesso presupposto, alla base delle formule analizzate, di poter derivare un indice dimensionale delle LDL a partire dalla concentrazione dei loro costituenti, possa in realtà costituire un'eccessiva approssimazione della realtà, tale da condizionare negativamente, indebolendola, la relazione inversa che avrebbe dovuto essere teoricamente osservabile fra gli indici di *size* e di densità.

Per contrasto, assumendo la correttezza concettuale delle formule analizzate quali stimatrici di dimensione, è intrigante confrontarsi con la prospettiva che forse potrebbe non sussistere la data per scontata relazione inversa fra diametro

e densità delle LDL, vista anche la scarsità di studi che abbiano testato allo stesso tempo sia la *size* che la *buoyancy* di queste particelle.

Allo scopo di affrontare definitivamente tale problema, siamo impegnati nella valutazione dei campioni di plasma della nostra popolazione attraverso la metodica FPLC^{172,173} (*Fast Protein Liquid Chromatography*); tale tecnica rappresenta una versione modificata della classica cromatografia liquida, e consente la valutazione diretta delle dimensioni delle particelle lipoproteiche; in questo modo potranno essere confrontati, per ciascun soggetto, il profilo e gli indici di densità ottenuti attraverso DGUC con il pattern dimensionale LDL ricavato dalla FPLC; dunque, potrà anche essere verificata direttamente l'accuratezza delle formule che stimano la *size* delle LDL.

Bibliografia

1. Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation* 2002;106:3143-421.
2. Lewington S, Whitlock G, Clarke R, et al. Blood cholesterol and vascular mortality by age, sex, and blood pressure: a meta-analysis of individual data from 61 prospective studies with 55,000 vascular deaths. *Lancet* 2007;370:1829-39.
3. St-Pierre AC, Cantin B, Dagenais GR, et al. Low-density lipoprotein subfractions and the long-term risk of ischemic heart disease in men: 13-year follow-up data from the Quebec Cardiovascular Study. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2005;25:553-9.
4. Akosah KO, Schaper A, Cogbill C, Schoenfeld P. Preventing myocardial infarction in the young adult in the first place: how do the National Cholesterol Education Panel III guidelines perform? *Journal of the American College of Cardiology* 2003;41:1475-9.
5. Berneis KK, Krauss RM. Metabolic origins and clinical significance of LDL heterogeneity. *Journal of lipid research* 2002;43:1363-79.
6. Rizzo M, Berneis K. The clinical relevance of low-density-lipoproteins size modulation by statins. *Cardiovascular drugs and therapy / sponsored by the International Society of Cardiovascular Pharmacotherapy* 2006;20:205-17.
7. Packard C, Caslake M, Shepherd J. The role of small, dense low density lipoprotein (LDL): a new look. *International journal of cardiology* 2000;74 Suppl 1:S17-22.
8. Rizzo M, Berneis K. Low-density lipoprotein size and cardiovascular risk assessment. *QJM : monthly journal of the Association of Physicians* 2006;99:1-14.

9. Packard CJ, Shepherd J. Lipoprotein heterogeneity and apolipoprotein B metabolism. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 1997;17:3542-56.
10. Ensign W, Hill N, Heward CB. Disparate LDL phenotypic classification among 4 different methods assessing LDL particle characteristics. *Clinical chemistry* 2006;52:1722-7.
11. Gofman JW, Lindgren FT, Elliott H. Ultracentrifugal studies of lipoproteins of human serum. *The Journal of biological chemistry* 1949;179:973-9.
12. Havel RJ, Eder HA, Bragdon JH. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *The Journal of clinical investigation* 1955;34:1345-53.
13. Shen MM, Krauss RM, Lindgren FT, Forte TM. Heterogeneity of serum low density lipoproteins in normal human subjects. *Journal of lipid research* 1981;22:236-44.
14. Krauss RM, Burke DJ. Identification of multiple subclasses of plasma low density lipoproteins in normal humans. *Journal of lipid research* 1982;23:97-104.
15. Swinkels DW, Hak-Lemmers HL, Demacker PN. Single spin density gradient ultracentrifugation method for the detection and isolation of light and heavy low density lipoprotein subfractions. *Journal of lipid research* 1987;28:1233-9.
16. Griffin BA, Caslake MJ, Yip B, Tait GW, Packard CJ, Shepherd J. Rapid isolation of low density lipoprotein (LDL) subfractions from plasma by density gradient ultracentrifugation. *Atherosclerosis* 1990;83:59-67.
17. Griffin BA, Freeman DJ, Tait GW, et al. Role of plasma triglyceride in the regulation of plasma low density lipoprotein (LDL) subfractions: relative contribution of small, dense LDL to coronary heart disease risk. *Atherosclerosis* 1994;106:241-53.
18. Davies IG, Graham JM, Griffin BA. Rapid separation of LDL subclasses by iodixanol gradient ultracentrifugation. *Clinical chemistry* 2003;49:1865-72.

19. Krauss RM, Blanche PJ. Detection and quantitation of LDL subfractions. *Current Opinion in Lipidology* 1992;3:377-83.
20. Austin MA, Breslow JL, Hennekens CH, Buring JE, Willett WC, Krauss RM. Low-density lipoprotein subclass patterns and risk of myocardial infarction. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 1988;260:1917-21.
21. Williams PT, Vranizan KM, Krauss RM. Correlations of plasma lipoproteins with LDL subfractions by particle size in men and women. *Journal of lipid research* 1992;33:765-74.
22. Hirayama S, Miida T. Small dense LDL: An emerging risk factor for cardiovascular disease. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 2012;414:215-24.
23. Hoefner DM, Hodel SD, O'Brien JF, et al. Development of a rapid, quantitative method for LDL subfractionation with use of the Quantimetrix Lipoprint LDL System. *Clinical chemistry* 2001;47:266-74.
24. Banuls C, Bellod L, Jover A, et al. Comparability of two different polyacrylamide gel electrophoresis methods for the classification of LDL pattern type. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 2012;413:251-7.
25. Otvos JD, Jeyarajah EJ, Bennett DW, Krauss RM. Development of a proton nuclear magnetic resonance spectroscopic method for determining plasma lipoprotein concentrations and subspecies distributions from a single, rapid measurement. *Clinical chemistry* 1992;38:1632-8.
26. Witte DR, Taskinen MR, Perttunen-Nio H, Van Tol A, Livingstone S, Colhoun HM. Study of agreement between LDL size as measured by nuclear magnetic resonance and gradient gel electrophoresis. *Journal of lipid research* 2004;45:1069-76.
27. Okazaki M, Usui S, Ishigami M, et al. Identification of unique lipoprotein subclasses for visceral obesity by component analysis of cholesterol profile in high-performance liquid chromatography. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2005;25:578-84.

28. Caulfield MP, Li S, Lee G, et al. Direct determination of lipoprotein particle sizes and concentrations by ion mobility analysis. *Clinical chemistry* 2008;54:1307-16.
29. Musunuru K, Orho-Melander M, Caulfield MP, et al. Ion mobility analysis of lipoprotein subfractions identifies three independent axes of cardiovascular risk. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2009;29:1975-80.
30. Sakurai T, Trirongjitmoah S, Nishibata Y, et al. Measurement of lipoprotein particle sizes using dynamic light scattering. *Annals of clinical biochemistry* 2010;47:476-81.
31. Hirano T, Ito Y, Saegusa H, Yoshino G. A novel and simple method for quantification of small, dense LDL. *Journal of lipid research* 2003;44:2193-201.
32. Ito Y, Fujimura M, Ohta M, Hirano T. Development of a homogeneous assay for measurement of small dense LDL cholesterol. *Clinical chemistry* 2011;57:57-65.
33. Fukushima Y, Hirayama S, Ueno T, et al. Small dense LDL cholesterol is a robust therapeutic marker of statin treatment in patients with acute coronary syndrome and metabolic syndrome. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 2011;412:1423-7.
34. Gaw A, Packard CJ, Lindsay GM, et al. Overproduction of small very low density lipoproteins (Sf 20-60) in moderate hypercholesterolemia: relationships between apolipoprotein B kinetics and plasma lipoproteins. *Journal of lipid research* 1995;36:158-71.
35. Packard CJ, Demant T, Stewart JP, et al. Apolipoprotein B metabolism and the distribution of VLDL and LDL subfractions. *Journal of lipid research* 2000;41:305-18.
36. Chatterton JE, Phillips ML, Curtiss LK, Milne R, Fruchart JC, Schumaker VN. Immunoelectron microscopy of low density lipoproteins yields a ribbon and bow model for the conformation of apolipoprotein B on the lipoprotein surface. *Journal of lipid research* 1995;36:2027-37.

37. Packard CJ, Gaw A, Demant T, Shepherd J. Development and application of a multicompartmental model to study very low density lipoprotein subfraction metabolism. *Journal of lipid research* 1995;36:172-87.
38. Gaw A, Packard CJ, Murray EF, et al. Effects of simvastatin on apoB metabolism and LDL subfraction distribution. *Arteriosclerosis and thrombosis : a journal of vascular biology / American Heart Association* 1993;13:170-89.
39. Gaw A, Packard CJ, Caslake MJ, et al. Effects of ciprofibrate on LDL metabolism in man. *Atherosclerosis* 1994;108:137-48.
40. Krauss RM. Relationship of intermediate and low-density lipoprotein subspecies to risk of coronary artery disease. *American heart journal* 1987;113:578-82.
41. Meyer BJ, Caslake MJ, McConnell MM, Packard CJ. Two subpopulations of intermediate density lipoprotein and their relationship to plasma triglyceride and cholesterol levels. *Atherosclerosis* 2000;153:355-62.
42. Pease RJ, Leiper JM. Regulation of hepatic apolipoprotein-B-containing lipoprotein secretion. *Curr Opin Lipidol* 1996;7:132-8.
43. Shepherd J, Packard CJ, Stewart JM, et al. Apolipoprotein A and B (Sf 100-400) metabolism during bezafibrate therapy in hypertriglyceridemic subjects. *The Journal of clinical investigation* 1984;74:2164-77.
44. Dachet C, Cavallero E, Martin C, Girardot G, Jacotot B. Effect of gemfibrozil on the concentration and composition of very low density and low density lipoprotein subfractions in hypertriglyceridemic patients. *Atherosclerosis* 1995;113:1-9.
45. Musliner TA, Giotas C, Krauss RM. Presence of multiple subpopulations of lipoproteins of intermediate density in normal subjects. *Arteriosclerosis (Dallas, Tex)* 1986;6:79-87.

46. McNamara JR, Campos H, Ordovas JM, Peterson J, Wilson PW, Schaefer EJ. Effect of gender, age, and lipid status on low density lipoprotein subfraction distribution. Results from the Framingham Offspring Study. *Arteriosclerosis (Dallas, Tex)* 1987;7:483-90.
47. Krauss RM, Williams PT, Lindgren FT, Wood PD. Coordinate changes in levels of human serum low and high density lipoprotein subclasses in healthy men. *Arteriosclerosis (Dallas, Tex)* 1988;8:155-62.
48. McNamara JR, Jenner JL, Li Z, Wilson PW, Schaefer EJ. Change in LDL particle size is associated with change in plasma triglyceride concentration. *Arteriosclerosis and thrombosis : a journal of vascular biology / American Heart Association* 1992;12:1284-90.
49. Deckelbaum RJ, Granot E, Oschry Y, Rose L, Eisenberg S. Plasma triglyceride determines structure-composition in low and high density lipoproteins. *Arteriosclerosis (Dallas, Tex)* 1984;4:225-31.
50. McNamara JR, Small DM, Li Z, Schaefer EJ. Differences in LDL subspecies involve alterations in lipid composition and conformational changes in apolipoprotein B. *Journal of lipid research* 1996;37:1924-35.
51. McNamara DJ, Kolb R, Parker TS, et al. Heterogeneity of cholesterol homeostasis in man. Response to changes in dietary fat quality and cholesterol quantity. *The Journal of clinical investigation* 1987;79:1729-39.
52. Musliner TA, Herbert PN, Kingston MJ. Lipoprotein substrates of lipoprotein lipase and hepatic triacylglycerol lipase from human post-heparin plasma. *Biochimica et biophysica acta* 1979;575:277-88.
53. Rizzo M, Pernice V, Frasieri A, et al. Small, dense low-density lipoproteins (LDL) are predictors of cardio- and cerebro-vascular events in subjects with the metabolic syndrome. *Clinical endocrinology* 2009;70:870-5.

54. Kuller LH, Grandits G, Cohen JD, Neaton JD, Prineas R. Lipoprotein particles, insulin, adiponectin, C-reactive protein and risk of coronary heart disease among men with metabolic syndrome. *Atherosclerosis* 2007;195:122-8.
55. Kathiresan S, Otvos JD, Sullivan LM, et al. Increased small low-density lipoprotein particle number: a prominent feature of the metabolic syndrome in the Framingham Heart Study. *Circulation* 2006;113:20-9.
56. Taskinen MR. Diabetic dyslipidaemia: from basic research to clinical practice. *Diabetologia* 2003;46:733-49.
57. Adiels M, Olofsson SO, Taskinen MR, Boren J. Diabetic dyslipidaemia. *Curr Opin Lipidol* 2006;17:238-46.
58. Despres JP. Cardiovascular disease under the influence of excess visceral fat. *Critical pathways in cardiology* 2007;6:51-9.
59. Magkos F, Mohammed BS, Mittendorfer B. Effect of obesity on the plasma lipoprotein subclass profile in normoglycemic and normolipidemic men and women. *International journal of obesity (2005)* 2008;32:1655-64.
60. Rizzo M, Mikhailidis DP. There is more to predicting vascular disease than just established risk factors. *Current pharmaceutical design* 2011;17:3608-10.
61. Hirano T, Ito Y, Koba S, et al. Clinical significance of small dense low-density lipoprotein cholesterol levels determined by the simple precipitation method. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2004;24:558-63.
62. Tsumura M, Kinouchi T, Ono S, Nakajima T, Komoda T. Serum lipid metabolism abnormalities and change in lipoprotein contents in patients with advanced-stage renal disease. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 2001;314:27-37.
63. Alabakovska SB, Todorova BB, Labudovic DD, Tosheska KN. LDL and HDL subclass distribution in patients with end-stage renal diseases. *Clinical biochemistry* 2002;35:211-6.

64. Kim YK, Seo HS, Lee EM, et al. Association of hypertension with small, dense low-density lipoprotein in patients without metabolic syndrome. *Journal of human hypertension* 2012;26:670-6.
65. Phelan N, O'Connor A, Kyaw-Tun T, et al. Lipoprotein subclass patterns in women with polycystic ovary syndrome (PCOS) compared with equally insulin-resistant women without PCOS. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2010;95:3933-9.
66. Vinaixa M, Rodriguez MA, Samino S, et al. Metabolomics reveals reduction of metabolic oxidation in women with polycystic ovary syndrome after pioglitazone-flutamide-metformin polytherapy. *PLoS One* 2011;6:e29052.
67. Makimura H, Feldpausch MN, Stanley TL, Sun N, Grinspoon SK. Reduced growth hormone secretion in obesity is associated with smaller LDL and HDL particle size. *Clinical endocrinology* 2012;76:220-7.
68. Bucher HC, Richter W, Glass TR, et al. Small dense lipoproteins, apolipoprotein B, and risk of coronary events in HIV-infected patients on antiretroviral therapy: the Swiss HIV Cohort Study. *Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999)* 2012;60:135-42.
69. Pont F, Duvillard L, Florentin E, Gambert P, Verges B. Early kinetic abnormalities of apoB-containing lipoproteins in insulin-resistant women with abdominal obesity. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2002;22:1726-32.
70. Chan DC, Watts GF, Redgrave TG, Mori TA, Barrett PH. Apolipoprotein B-100 kinetics in visceral obesity: associations with plasma apolipoprotein C-III concentration. *Metabolism: clinical and experimental* 2002;51:1041-6.
71. Riches FM, Watts GF, Naoumova RP, Kelly JM, Croft KD, Thompson GR. Hepatic secretion of very-low-density lipoprotein apolipoprotein B-100 studied with a stable isotope technique in men with visceral obesity. *International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity* 1998;22:414-23.

72. Verges B. New insight into the pathophysiology of lipid abnormalities in type 2 diabetes. *Diabetes & metabolism* 2005;31:429-39.
73. Lewis GF. Fatty acid regulation of very low density lipoprotein production. *Curr Opin Lipidol* 1997;8:146-53.
74. Toledo FG, Sniderman AD, Kelley DE. Influence of hepatic steatosis (fatty liver) on severity and composition of dyslipidemia in type 2 diabetes. *Diabetes care* 2006;29:1845-50.
75. Cali AM, Zern TL, Taksali SE, et al. Intrahepatic fat accumulation and alterations in lipoprotein composition in obese adolescents: a perfect proatherogenic state. *Diabetes care* 2007;30:3093-8.
76. Lewis GF, Uffelman KD, Szeto LW, Steiner G. Effects of acute hyperinsulinemia on VLDL triglyceride and VLDL apoB production in normal weight and obese individuals. *Diabetes* 1993;42:833-42.
77. Malmstrom R, Packard CJ, Caslake M, et al. Defective regulation of triglyceride metabolism by insulin in the liver in NIDDM. *Diabetologia* 1997;40:454-62.
78. Taghibiglou C, Rashid-Kolvear F, Van Iderstine SC, et al. Hepatic very low density lipoprotein-ApoB overproduction is associated with attenuated hepatic insulin signaling and overexpression of protein-tyrosine phosphatase 1B in a fructose-fed hamster model of insulin resistance. *The Journal of biological chemistry* 2002;277:793-803.
79. Au WS, Kung HF, Lin MC. Regulation of microsomal triglyceride transfer protein gene by insulin in HepG2 cells: roles of MAPK α and MAPK β . *Diabetes* 2003;52:1073-80.
80. Brown AM, Gibbons GF. Insulin inhibits the maturation phase of VLDL assembly via a phosphoinositide 3-kinase-mediated event. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2001;21:1656-61.

81. Andersson L, Bostrom P, Ericson J, et al. PLD1 and ERK2 regulate cytosolic lipid droplet formation. *Journal of cell science* 2006;119:2246-57.
82. Gibbons GF, Wiggins D, Brown AM, Hebbachi AM. Synthesis and function of hepatic very-low-density lipoprotein. *Biochemical Society transactions* 2004;32:59-64.
83. Weyer C, Funahashi T, Tanaka S, et al. Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2001;86:1930-5.
84. Guerre-Millo M. Adiponectin: an update. *Diabetes & metabolism* 2008;34:12-8.
85. Edvardsson U, Ljungberg A, Linden D, et al. PPARalpha activation increases triglyceride mass and adipose differentiation-related protein in hepatocytes. *Journal of lipid research* 2006;47:329-40.
86. Hallan SI, Coresh J, Astor BC, et al. International comparison of the relationship of chronic kidney disease prevalence and ESRD risk. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2006;17:2275-84.
87. Van Biesen W, De Bacquer D, Verbeke F, Delanghe J, Lameire N, Vanholder R. The glomerular filtration rate in an apparently healthy population and its relation with cardiovascular mortality during 10 years. *European heart journal* 2007;28:478-83.
88. Yamamoto S, Kon V. Mechanisms for increased cardiovascular disease in chronic kidney dysfunction. *Current opinion in nephrology and hypertension* 2009;18:181-8.
89. Go AS, Chertow GM, Fan D, McCulloch CE, Hsu CY. Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. *The New England journal of medicine* 2004;351:1296-305.
90. Himmelfarb J, Stenvinkel P, Ikizler TA, Hakim RM. The elephant in uremia: oxidant stress as a unifying concept of cardiovascular disease in uremia. *Kidney international* 2002;62:1524-38.

91. Honda H, Qureshi AR, Heimbürger O, et al. Serum albumin, C-reactive protein, interleukin 6, and fetuin A as predictors of malnutrition, cardiovascular disease, and mortality in patients with ESRD. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation* 2006;47:139-48.
92. Addabbo F, Mallamaci F, Leonardis D, et al. Searching for biomarker patterns characterizing carotid atherosclerotic burden in patients with reduced renal function. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 2007;22:3521-6.
93. Chu M, Wang AY, Chan IH, Chui SH, Lam CW. Serum small-dense LDL abnormalities in chronic renal disease patients. *British journal of biomedical science* 2012;69:99-102.
94. Tsimihodimos V, Dounousi E, Siamopoulos KC. Dyslipidemia in chronic kidney disease: an approach to pathogenesis and treatment. *American journal of nephrology* 2008;28:958-73.
95. Kaysen GA. Lipid and lipoprotein metabolism in chronic kidney disease. *Journal of renal nutrition : the official journal of the Council on Renal Nutrition of the National Kidney Foundation* 2009;19:73-7.
96. Kwan BC, Kronenberg F, Beddhu S, Cheung AK. Lipoprotein metabolism and lipid management in chronic kidney disease. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2007;18:1246-61.
97. Attman PO, Samuelsson O. Dyslipidemia of kidney disease. *Curr Opin Lipidol* 2009;20:293-9.
98. Rajman I, Harper L, McPake D, Kendall MJ, Wheeler DC. Low-density lipoprotein subfraction profiles in chronic renal failure. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 1998;13:2281-7.

99. Deighan CJ, Caslake MJ, McConnell M, Boulton-Jones JM, Packard CJ. Atherogenic lipoprotein phenotype in end-stage renal failure: origin and extent of small dense low-density lipoprotein formation. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation* 2000;35:852-62.
100. Vaziri ND. Molecular mechanisms of lipid disorders in nephrotic syndrome. *Kidney international* 2003;63:1964-76.
101. Panza JA, Quyyumi AA, Brush JE, Jr., Epstein SE. Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. *The New England journal of medicine* 1990;323:22-7.
102. Endemann DH, Pu Q, De Ciuceis C, et al. Persistent remodeling of resistance arteries in type 2 diabetic patients on antihypertensive treatment. *Hypertension* 2004;43:399-404.
103. Perrone-Filardi P, Cuocolo A, Brevetti G, et al. Relation of brachial artery flow-mediated vasodilation to significant coronary artery disease in patients with peripheral arterial disease. *The American journal of cardiology* 2005;96:1337-41.
104. Landmesser U, Spiekermann S, Dikalov S, et al. Vascular oxidative stress and endothelial dysfunction in patients with chronic heart failure: role of xanthine-oxidase and extracellular superoxide dismutase. *Circulation* 2002;106:3073-8.
105. Lerman A, Zeiher AM. Endothelial function: cardiac events. *Circulation* 2005;111:363-8.
106. Ford MA, McConnell JP, Lavi S, et al. Coronary artery endothelial dysfunction is positively correlated with low density lipoprotein and inversely correlated with high density lipoprotein subclass particles measured by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Atherosclerosis* 2009;207:111-5.
107. Ruggiero D, Savarese G, Formisano R, et al. [Endothelial dysfunction in type 2 diabetic patients with normal coronary arteries. A peripheral arterial tonometry study]. *Monaldi archives for chest disease = Archivio Monaldi per le malattie del torace /*

Fondazione clinica del lavoro, IRCCS [and] Istituto di clinica fisiologica e malattie apparato respiratorio, Università di Napoli, Secondo ateneo 2012;78:34-9.

108. Okumura K, Takahashi R, Taguchi N, et al. Small low-density lipoprotein cholesterol concentration is a determinant of endothelial dysfunction by peripheral artery tonometry in men. *Journal of atherosclerosis and thrombosis* 2012;19:897-903.

109. Woodman RJ, Watts GF, Playford DA, Best JD, Chan DC. Oxidized LDL and small LDL particle size are independently predictive of a selective defect in microcirculatory endothelial function in type 2 diabetes. *Diabetes, obesity & metabolism* 2005;7:612-7.

110. Shimabukuro M, Higa N, Asahi T, Oshiro Y, Takasu N. Fluvastatin improves endothelial dysfunction in overweight postmenopausal women through small dense low-density lipoprotein reduction. *Metabolism: clinical and experimental* 2004;53:733-9.

111. Anber V, Griffin BA, McConnell M, Packard CJ, Shepherd J. Influence of plasma lipid and LDL-subfraction profile on the interaction between low density lipoprotein with human arterial wall proteoglycans. *Atherosclerosis* 1996;124:261-71.

112. Griffin BA. Lipoprotein atherogenicity: an overview of current mechanisms. *The Proceedings of the Nutrition Society* 1999;58:163-9.

113. Laggner P, Kostner GM, Rakusch U, Worcester D. Neutron small angle scattering on selectively deuterated human plasma low density lipoproteins. The location of polar phospholipid headgroups. *The Journal of biological chemistry* 1981;256:11832-9.

114. Miserez AR, Keller U. Differences in the phenotypic characteristics of subjects with familial defective apolipoprotein B-100 and familial hypercholesterolemia. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 1995;15:1719-29.

115. Wang X, Pease R, Bertinato J, Milne RW. Well-defined regions of apolipoprotein B-100 undergo conformational change during its intravascular metabolism. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2000;20:1301-8.

116. Goulinet S, Chapman MJ. Plasma LDL and HDL subspecies are heterogenous in particle content of tocopherols and oxygenated and hydrocarbon carotenoids. Relevance to oxidative resistance and atherogenesis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 1997;17:786-96.
117. Tribble DL, Rizzo M, Chait A, Lewis DM, Blanche PJ, Krauss RM. Enhanced oxidative susceptibility and reduced antioxidant content of metabolic precursors of small, dense low-density lipoproteins. *The American journal of medicine* 2001;110:103-10.
118. Liu ML, Ylitalo K, Vakkilainen J, et al. Susceptibility of LDL to oxidation in vitro and antioxidant capacity in familial combined hyperlipidemia: comparison of patients with different lipid phenotypes. *Annals of medicine* 2002;34:48-54.
119. Steinberg D, Witztum JL. Oxidized low-density lipoprotein and atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2010;30:2311-6.
120. Younis N, Charlton-Menys V, Sharma R, Soran H, Durrington PN. Glycation of LDL in non-diabetic people: Small dense LDL is preferentially glycated both in vivo and in vitro. *Atherosclerosis* 2009;202:162-8.
121. Soran H, Durrington PN. Susceptibility of LDL and its subfractions to glycation. *Curr Opin Lipidol* 2011;22:254-61.
122. Younis NN, Soran H, Sharma R, et al. Small-dense LDL and LDL glycation in metabolic syndrome and in statin-treated and non-statin-treated type 2 diabetes. *Diabetes & vascular disease research : official journal of the International Society of Diabetes and Vascular Disease* 2010;7:289-95.
123. Wang X, Bucala R, Milne R. Epitopes close to the apolipoprotein B low density lipoprotein receptor-binding site are modified by advanced glycation end products. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:7643-7.

124. Sobal G, Sinzinger H, Menzel EJ. Binding of long-term glycated low density lipoprotein and AGE-albumin by peripheral monocytes and endothelial cells. *Journal of receptor and signal transduction research* 1999;19:267-81.
125. Miller YI, Choi SH, Wiesner P, et al. Oxidation-specific epitopes are danger-associated molecular patterns recognized by pattern recognition receptors of innate immunity. *Circulation research* 2011;108:235-48.
126. Sacks FM, Campos H. Clinical review 163: Cardiovascular endocrinology: Low-density lipoprotein size and cardiovascular disease: a reappraisal. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2003;88:4525-32.
127. Zeljkovic A, Spasojevic-Kalimanovska V, Vekic J, et al. Does simultaneous determination of LDL and HDL particle size improve prediction of coronary artery disease risk? *Clinical and experimental medicine* 2008;8:109-16.
128. Koba S, Hirano T. Small dense low-density lipoprotein in Japanese men with coronary artery disease. *Annals of internal medicine* 2000;132:762.
129. Ai M, Otokozawa S, Asztalos BF, et al. Small dense LDL cholesterol and coronary heart disease: results from the Framingham Offspring Study. *Clinical chemistry* 2010;56:967-76.
130. Koba S, Yokota Y, Hirano T, et al. Small LDL-cholesterol is superior to LDL-cholesterol for determining severe coronary atherosclerosis. *Journal of atherosclerosis and thrombosis* 2008;15:250-60.
131. Arai H, Kokubo Y, Watanabe M, et al. Small dense low-density lipoproteins cholesterol can predict incident cardiovascular disease in an urban Japanese cohort: the Suita study. *Journal of atherosclerosis and thrombosis* 2013;20:195-203.
132. Grammer TB, Kleber ME, Marz W, et al. Low-density lipoprotein particle diameter and mortality: the Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health Study. *European heart journal* 2014.

133. Nishikura T, Koba S, Yokota Y, et al. Elevated Small Dense Low-Density Lipoprotein Cholesterol as a Predictor for Future Cardiovascular Events in Patients with Stable Coronary Artery Disease. *Journal of atherosclerosis and thrombosis* 2014.
134. Hoogeveen RC, Gaubatz JW, Sun W, et al. Small Dense Low-Density Lipoprotein-Cholesterol Concentrations Predict Risk for Coronary Heart Disease: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2014;34:1069-77.
135. Zhao CX, Cui YH, Fan Q, et al. Small dense low-density lipoproteins and associated risk factors in patients with stroke. *Cerebrovascular diseases (Basel, Switzerland)* 2009;27:99-104.
136. Zeljkovic A, Vekic J, Spasojevic-Kalimanovska V, et al. LDL and HDL subclasses in acute ischemic stroke: prediction of risk and short-term mortality. *Atherosclerosis* 2010;210:548-54.
137. Cure MC, Tufekci A, Cure E, et al. Low-density lipoprotein subfraction, carotid artery intima-media thickness, nitric oxide, and tumor necrosis factor alpha are associated with newly diagnosed ischemic stroke. *Annals of Indian Academy of Neurology* 2013;16:498-503.
138. Norata GD, Raselli S, Grigore L, et al. Small dense LDL and VLDL predict common carotid artery IMT and elicit an inflammatory response in peripheral blood mononuclear and endothelial cells. *Atherosclerosis* 2009;206:556-62.
139. Shoji T, Hatsuda S, Tsuchikura S, et al. Small dense low-density lipoprotein cholesterol concentration and carotid atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2009;202:582-8.
140. Faggin E, Zambon A, Puato M, et al. Association between the -514 C->T polymorphism of the hepatic lipase gene promoter and unstable carotid plaque in patients with severe carotid artery stenosis. *Journal of the American College of Cardiology* 2002;40:1059-66.

141. Spagnoli LG, Mauriello A, Sangiorgi G, et al. Extracranial thrombotically active carotid plaque as a risk factor for ischemic stroke. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 2004;292:1845-52.
142. Puato M, Faggin E, Rattazzi M, et al. Atorvastatin reduces macrophage accumulation in atherosclerotic plaques: a comparison of a nonstatin-based regimen in patients undergoing carotid endarterectomy. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 2010;41:1163-8.
143. Zambon A, Puato M, Faggin E, et al. Common hepatic lipase gene promoter variant predicts the degree of neointima formation after carotid endarterectomy: impact of plaque composition and lipoprotein phenotype. *Atherosclerosis* 2006;185:121-6.
144. Zambon A, Puato M, Faggin E, Grego F, Rattazzi M, Pauletto P. Lipoprotein remnants and dense LDL are associated with features of unstable carotid plaque: a flag for non-HDL-C. *Atherosclerosis* 2013;230:106-9.
145. Karalis DG, Ishisaka DY, Luo D, Ntanos F, Wun CC. Effects of increasing doses of atorvastatin on the atherogenic lipid subclasses commonly associated with hypertriglyceridemia. *The American journal of cardiology* 2007;100:445-9.
146. Bays H, Conard S, Leiter LA, et al. Are post-treatment low-density lipoprotein subclass pattern analyses potentially misleading? *Lipids in health and disease* 2010;9:136.
147. Rosenson RS, Otvos JD, Freedman DS. Relations of lipoprotein subclass levels and low-density lipoprotein size to progression of coronary artery disease in the Pravastatin Limitation of Atherosclerosis in the Coronary Arteries (PLAC-I) trial. *The American journal of cardiology* 2002;90:89-94.
148. Masana L, Villoria J, Sust M, et al. Treatment of type IIb familial combined hyperlipidemia with the combination pravastatin-piperazine sultosilate. *European journal of pharmacology* 2004;496:205-12.

149. Kazama H, Usui S, Okazaki M, Hosoi T, Ito H, Orimo H. Effects of bezafibrate and pravastatin on remnant-like lipoprotein particles and lipoprotein subclasses in type 2 diabetes. *Diabetes research and clinical practice* 2003;59:181-9.
150. Sirtori CR, Calabresi L, Pisciotta L, et al. Effect of statins on LDL particle size in patients with familial combined hyperlipidemia: a comparison between atorvastatin and pravastatin. *Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases : NMCD* 2005;15:47-55.
151. Vega GL, Ma PT, Cater NB, et al. Effects of adding fenofibrate (200 mg/day) to simvastatin (10 mg/day) in patients with combined hyperlipidemia and metabolic syndrome. *The American journal of cardiology* 2003;91:956-60.
152. Bays HE, McGovern ME. Once-daily niacin extended release/lovastatin combination tablet has more favorable effects on lipoprotein particle size and subclass distribution than atorvastatin and simvastatin. *Preventive cardiology* 2003;6:179-88.
153. Wakatsuki A, Okatani Y, Ikenoue N. Effects of combination therapy with estrogen plus simvastatin on lipoprotein metabolism in postmenopausal women with type IIa hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 2000;150:103-11.
154. van Tits LJ, Smilde TJ, van Wissen S, de Graaf J, Kastelein JJ, Stalenhoef AF. Effects of atorvastatin and simvastatin on low-density lipoprotein subfraction profile, low-density lipoprotein oxidizability, and antibodies to oxidized low-density lipoprotein in relation to carotid intima media thickness in familial hypercholesterolemia. *Journal of investigative medicine : the official publication of the American Federation for Clinical Research* 2004;52:177-84.
155. Winkler K, Abletshauser C, Friedrich I, Hoffmann MM, Wieland H, Marz W. Fluvastatin slow-release lowers platelet-activating factor acetyl hydrolase activity: a placebo-controlled trial in patients with type 2 diabetes. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2004;89:1153-9.

156. O'Keefe JH, Jr., Captain BK, Jones PG, Harris WS. Atorvastatin reduces remnant lipoproteins and small, dense low-density lipoproteins regardless of the baseline lipid pattern. *Preventive cardiology* 2004;7:154-60.
157. Wagner AM, Jorba O, Bonet R, Ordonez-Llanos J, Perez A. Efficacy of atorvastatin and gemfibrozil, alone and in low dose combination, in the treatment of diabetic dyslipidemia. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2003;88:3212-7.
158. Ai M, Otokozaawa S, Asztalos BF, et al. Effects of maximal doses of atorvastatin versus rosuvastatin on small dense low-density lipoprotein cholesterol levels. *The American journal of cardiology* 2008;101:315-8.
159. Otvos JD, Collins D, Freedman DS, et al. Low-density lipoprotein and high-density lipoprotein particle subclasses predict coronary events and are favorably changed by gemfibrozil therapy in the Veterans Affairs High-Density Lipoprotein Intervention Trial. *Circulation* 2006;113:1556-63.
160. Ayaori M, Momiyama Y, Fayad ZA, et al. Effect of bezafibrate therapy on atherosclerotic aortic plaques detected by MRI in dyslipidemic patients with hypertriglyceridemia. *Atherosclerosis* 2008;196:425-33.
161. Vakkilainen J, Steiner G, Ansquer JC, et al. Relationships between low-density lipoprotein particle size, plasma lipoproteins, and progression of coronary artery disease: the Diabetes Atherosclerosis Intervention Study (DAIS). *Circulation* 2003;107:1733-7.
162. Agouridis AP, Kostapanos MS, Tsimihodimos V, et al. Effect of rosuvastatin monotherapy or in combination with fenofibrate or omega-3 fatty acids on lipoprotein subfraction profile in patients with mixed dyslipidaemia and metabolic syndrome. *International journal of clinical practice* 2012;66:843-53.
163. Kalogirou M, Tsimihodimos V, Gazi I, et al. Effect of ezetimibe monotherapy on the concentration of lipoprotein subfractions in patients with primary dyslipidaemia. *Current medical research and opinion* 2007;23:1169-76.

164. Nakou ES, Filippatos TD, Georgoula M, et al. The effect of orlistat and ezetimibe, alone or in combination, on serum LDL and small dense LDL cholesterol levels in overweight and obese patients with hypercholesterolaemia. *Current medical research and opinion* 2008;24:1919-29.
165. Tomassini JE, Mazzone T, Goldberg RB, et al. Effect of ezetimibe/simvastatin compared with atorvastatin on lipoprotein subclasses in patients with type 2 diabetes and hypercholesterolaemia. *Diabetes, obesity & metabolism* 2009;11:855-64.
166. Stojakovic T, de Campo A, Scharnagl H, et al. Differential effects of fluvastatin alone or in combination with ezetimibe on lipoprotein subfractions in patients at high risk of coronary events. *European journal of clinical investigation* 2010;40:187-94.
167. Winkler K, Jacob S, Muller-Schewe T, Hoffmann MM, Konrad T. Ezetimibe alone and in combination lowers the concentration of small, dense low-density lipoproteins in type 2 diabetes mellitus. *Atherosclerosis* 2012;220:189-93.
168. Hattori Y, Suzuki M, Tsushima M, et al. Development of approximate formula for LDL-chol, LDL-apo B and LDL-chol/LDL-apo B as indices of hyperapobetalipoproteinemia and small dense LDL. *Atherosclerosis* 1998;138:289-99.
169. Rizzo M, Berneis K. Lipid triad or atherogenic lipoprotein phenotype: a role in cardiovascular prevention? *Journal of atherosclerosis and thrombosis* 2005;12:237-9.
170. Nesto RW. Beyond low-density lipoprotein: addressing the atherogenic lipid triad in type 2 diabetes mellitus and the metabolic syndrome. *American journal of cardiovascular drugs : drugs, devices, and other interventions* 2005;5:379-87.
171. Bestehorn K, Smolka W, Pittrow D, Schulte H, Assmann G. Atherogenic dyslipidemia as evidenced by the lipid triad: prevalence and associated risk in statin-treated patients in ambulatory care. *Current medical research and opinion* 2010;26:2833-9.

172. Wiesner P, Leidl K, Boettcher A, Schmitz G, Liebisch G. Lipid profiling of FPLC-separated lipoprotein fractions by electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of lipid research* 2009;50:574-85.
173. Scherer M, Bottcher A, Schmitz G, Liebisch G. Sphingolipid profiling of human plasma and FPLC-separated lipoprotein fractions by hydrophilic interaction chromatography tandem mass spectrometry. *Biochimica et biophysica acta* 2011;1811:68-75.

Ringraziamenti

Desidero ringraziare il Prof. Andrea Natali per avermi permesso di svolgere questa tesi di laurea e per avermi seguito durante la sua realizzazione; la Dott.ssa Simona Baldi, che mi ha sostenuto e incoraggiato nella parte pratica e nella stesura.

Un grazie speciale alla mia famiglia, che mi ha alleggerito il cuore quando questo si faceva pesante, e ridato passione quando veniva la voglia di arrendersi.

Grazie a tutti gli amici che mi sono stati vicino in questi anni, con loro ho vissuto momenti di vera comunione.