



UNIVERSITÀ DI PISA

Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale  
Direttore: Prof. Mario Petrini

---

**CORSO DI LAUREA SPECIALISTICA IN  
MEDICINA E CHIRURGIA**

**TESI DI LAUREA**

*Messa a punto di un metodo per la valutazione  
delle proprietà antiossidanti delle HDL*

**RELATORE:**

**CHIAR.MO PROF. Andrea Natali**

**CANDIDATO:**

**Lorenzo Nesti**

**Anno Accademico 2013-2014**

*Quando ci entri dentro, la scienza, come le altre cose che la gente fa per vivere, non è molto complicata. Quello che devi fare è risolvere un enigma. E con gli enigmi, quello che devi fare è rifletterci un po', considerare tutti i fatti che puoi scoprire e poi formulare un'ipotesi. Proporre una soluzione. Il passo successivo è fare quanto possibile per confutarla. Mostrare che i pezzi non si incastrano nel modo in cui avevi proposto: se ci riesci, proponi un'altra soluzione. E poi riprovi.*

*La realtà è un puzzle ingannevole*

*Kary Mullis*

# RIASSUNTO

Le proprietà antiaterosclerotiche delle lipoproteine ad alta densità (HDL) non sono legate esclusivamente alla loro concentrazione plasmatica; è stato dimostrato, infatti, che le HDL possiedono una notevole variabilità di funzione, che si associa ad alterazioni della struttura e/o della composizione biochimica, e che sono strettamente collegate alle loro proprietà antiaterosclerotiche. Nella funzione ateroprotettiva le proprietà antiossidanti delle HDL giocano un ruolo di particolare importanza, poiché rallentando il danno ossidativo delle LDL bloccano lo stadio più precoce di sviluppo dell'aterosclerosi. Queste funzioni risultano essere alterate in condizioni patologiche quali la malattia cardiovascolare e il diabete mellito, e in generale si associano a condizioni di infiammazione cronica e aumentato stress ossidativo. E' stato proposto che le alterazioni delle proprietà delle HDL possano essere responsabili dell'eccesso di rischio cardiovascolare non spiegato dai tradizionali fattori di rischio; per questi motivi metodi di valutazione delle proprietà biologiche di queste lipoproteine rivestiranno sempre maggiore importanza clinica. Abbiamo applicato a 82 soggetti il metodo biochimico fluorimetrico per la valutazione delle proprietà antiossidanti delle HDL proposto da Kelesidis et al. nel 2011, il quale, nelle nostre condizioni sperimentali, risultava poco sensibile: le differenze interindividuali risultavano appiattite, e le medie dei gruppi studiati pressoché identiche. Abbiamo quindi deciso di riesaminare ogni singolo passaggio del metodo, valutando e comparando per ciascuno eventuali alternative, individuando le modifiche efficaci nell'aumentarne la sensibilità. Siamo così riusciti ad ottenere condizioni ideali dal punto di vista analitico ed una sensibilità complessiva soddisfacente; abbiamo valutato il metodo testando una popolazione di 108 pazienti afferenti alla clinica della Medicina III Universitaria ad Indirizzo Metabolico,

suddivisi in quattro gruppi in base alla patologia: controlli, non diabetici con malattia cardiovascolare (MCV), diabetici (DM) e diabetici con malattia cardiovascolare (DM+MCV). Grazie alla superiore sensibilità i dati preliminari da noi ottenuti hanno evidenziato alcuni aspetti inattesi: la AOF% (Anti-Oxydant Function %), il parametro da noi utilizzato per stimare le proprietà antiossidanti delle HDL, risulta paradossalmente inferiore nei controlli rispetto ai pazienti esaminati ( $\text{AOF\%}_{\text{controlli}} = 59\% \pm 8\%$ ;  $\text{AOF\%}_{\text{MCV}} = 67\% \pm 8\%$ ,  $\text{AOF\%}_{\text{DM}} = 67\% \pm 6\%$ ;  $\text{AOF\%}_{\text{DM+MCV}} = 66\% \pm 7\%$ ,  $p < 0,002$ ). Dall'analisi dei dati risulta che tale parametro è correlato con le concentrazioni plasmatiche di HDL-c ( $p < 0,0001$ ): ciò potrebbe essere indice di un effetto antiossidante del sistema siero+HDL. Questa ipotesi è avvalorata dalla correlazione tra AOF% e concentrazioni plasmatiche di acido urico ( $p < 0,0001$ ). Il fatto che il metodo possa risultare sensibile anche all'effetto antiossidante di altre sostanze disciolte nel siero, oltre all'effetto antiossidante proprio delle HDL, pone un dubbio sul substrato biologico dell'effetto antiossidante misurato dalla AOF%; inoltre mette in dubbio anche la legittimità del suo utilizzo in clinica come marcatore precoce di aterosclerosi.

# INDICE

<b>INDICE DELLE ABBREVIAZIONI</b> .....	7
<b>INTRODUZIONE</b> .....	9
<b>1. Struttura e metabolismo delle HDL</b> .....	9
1.1. Apoproteine e altre componenti proteiche.....	9
1.2. Composizione lipidica e maturazione enzimatica.....	11
1.3. Sottoclassificazione.....	14
1.4. Metabolismo e “ciclo vitale”.....	18
<b>2. Dalla “ipotesi HDL” alla “ipotesi funzioni delle HDL”</b> .....	22
2.1. HDL e rischio residuo: l’”ipotesi HDL”.....	22
2.2. Studi di popolazione e di intervento: il “paradosso HDL”.....	23
2.3. Dalla “ipotesi HDL” alla “ipotesi funzioni delle HDL”.....	25
2.4. HDL fisiologiche e disfunzionanti: l’”ipotesi funzioni delle HDL”.....	28
<b>3. Funzioni fisiologiche delle HDL</b> .....	30
3.1. Trasporto inverso del colesterolo.....	31
3.2. Funzione antinfiammatoria.....	35
3.3. Funzione antiossidante.....	38
3.4. Effetti sull’endotelio.....	39
3.5. Altre funzioni.....	41
3.6. HDL e aterosclerosi.....	42
<b>4. HDL disfunzionanti</b> .....	48
4.1. Condizioni cliniche associate ad HDL disfunzionanti.....	49
4.2. Generazione di HDL disfunzionanti.....	52
4.3. Alterazioni strutturali.....	55

4.4. Alterazioni funzionali.....	58
4.5. Un ruolo fisiologico per le HDL disfunzionanti.....	60
<b>5. Test per valutare le proprietà antiossidanti delle HDL.....</b>	<b>62</b>
5.1. Test cellulari.....	62
5.2. Test biochimici.....	63
5.3. Il metodo di partenza.....	64
<b>MESSA A PUNTO DI UN METODO PER LA VALUTAZIONE DELLE PROPRIETA' ANTIOSSIDANTI DELLE HDL.....</b>	<b>66</b>
<b>1. Scopo della tesi.....</b>	<b>66</b>
<b>2. Materiali e metodi.....</b>	<b>67</b>
2.1. Protocollo sperimentale.....	67
2.2. Analisi matematiche e statistiche.....	69
<b>3. Risultati.....</b>	<b>70</b>
3.1. Applicazione del metodo.....	70
3.2. Modifiche al metodo.....	71
3.3. Dati preliminari di validazione del metodo.....	75
<b>4. Discussione.....</b>	<b>78</b>
<b>5. Conclusioni.....</b>	<b>84</b>
<b>6. Prospettive future.....</b>	<b>84</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>85</b>

# INDICE DELLE ABBREVIAZIONI

AAPH	2,2'-Azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride
ABC	ATP-Binding Cassette
AOF%	Anti-Oxidant Function %
Apo	Apolipoproteina
BMI	Body Mass Index
CETP	Cholesteril-Ester Transfer Protein
DHR	Di-Hydro Rhodamine
DM	Diabete Mellito
DOR	DHR Oxidation Rate
eNOS	endothelial Nitric Oxyde sintase
GPX	Glutathione Seleno-Perossidasi
HDL	High-Density Lipoproteins
HDL-c	Colesterolo legato alle HDL
HPETE	hydroperoxyeicosatetraenoic acid
HPODE	hydroperoxyoctadecadienoic acid
ICAM	I C Adesion Molecule
IL1	Inter Leuchina 1
LCAT	Lecithin-cholesterol Acyl Transferase
LDL	Low-Density Lipoproteins
LDL-c	Colesterolo legato alle LDL
MCA	Monocyte Chemoattractant Assay

MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein
MCV	Malattia Cardio-Vascolare
NFkB	Nuclear Factor kB
NO	Ossido nitrico
Ox-LDL	LDL ossidate
PAF	Platelet-Activated Factor
PAF-AH	Platelet-Activated Factor Acetyl-Hydrolase
PEG	Poly-Ethilene Glycole
PGI <sub>2</sub>	Prostaglandina I <sub>2</sub> (prostaciclina)
PLTP	PhosphoLipid Transfer Protein
PON1	Paraoxonasi
RCT	Reverse Cholesterol Transport
S1P	Sfingosina-1-fosfato
sPLA <sub>2</sub> -IIA	fosfolipasi A <sub>2</sub> secretoria di gruppo IIA
SR-B1	Scavenger Receptor-B1
TICE	Trans-Intestinal Cholesterol Excretion
TNF	Tumor-Necrosis Factor
VCAM	Vascular C Adesion Molecule
VLDL	Very Low Density Lipoprotein



# INTRODUZIONE

## 1. Struttura e metabolismo delle HDL

### 1.1. Apoproteine e altre componenti proteiche

Quella delle HDL è una classe di particelle lipoproteiche molto vasta ed eterogenea, addetta a numerose funzioni; lo studio della loro struttura biochimica, delle loro sottodivisioni e del loro metabolismo costituisce la base teorica imprescindibile per comprenderne la fisiologia e i principali correlati clinici. La principale apoproteina presente all'interno delle HDL è la ApoA-I, che costituisce circa il 70% dell'intera particella e ne determina le principali funzioni e proprietà [1]; entra a far parte delle HDL già al momento della loro secrezione, e mentre la composizione lipidica va incontro a modificazioni anche molto imponenti, essa resta all'interno delle lipoproteine durante tutto il loro ciclo vitale [2]. ApoA-I è una proteina di 28 kDa composta da una porzione esterna idrofila e 8 domini anfipatici ad  $\alpha$ -elica di 22 amminoacidi ciascuno, che presentano la capacità di modificare la loro struttura in base alla composizione lipidica dell'aggregato lipoproteico [3]: è grazie a questa sua capacità di adattarsi e modificare la propria struttura che la ApoA-I lega molto avidamente i lipidi ed è in grado di restare all'interno della lipoproteina nonostante le ampie variazioni di composizione lipidica a cui va incontro ogni singola particella di HDL durante la sua maturazione metabolica. La ApoA-I viene sintetizzata e secreta nel plasma dagli epatociti e dagli enterociti, e la sua sintesi è regolata principalmente a livello trascrizionale [4]: la sequenza promotrice presente prossimalmente al gene della ApoA-I determina il livello di trascrizione del gene, e sembra essere sotto il controllo di fattori endogeni ed esogeni. Tra i fattori endogeni si annoverano fattori endocrini come estrogeni, androgeni, glucocorticoidi e retinoidi, mentre i fattori esogeni sono costituiti

da fattori dietetici, come l'assunzione di alcol o la composizione lipidica della dieta, e fattori farmacologici, come statine, niacina, fibrati e eventuali farmaci ormonali [5]. Accanto a questa complessa regolazione a livello trascrizionale, i livelli di ApoA-I sembrano essere dipendenti anche dalla velocità di rimozione della proteina dal plasma: ciò potrebbe rendere conto delle differenze interindividuali di livelli di HDL-c, poiché le particelle più piccole e dense sono catabolizzate nel rene, quindi un alterato rapporto tra le differenti sottoclassi con prevalenza di HDL piccole conduce ad una riduzione dei livelli globali di HDL. Tuttavia questa non è una regola assoluta, infatti in alcune classi di individui, ad esempio tra i diabetici, sembra che la rimozione renale non abbia un ruolo significativo sui livelli di HDL e ApoA-I, e che quindi sia la regolazione della sintesi il principale determinante dei livelli di HDL [5]. Recentemente è stata scoperta una variante naturale della ApoA-I detta ApoA-I<sub>Milano</sub>, individuata tra gli individui di una popolazione residente nei pressi di Milano: la mutazione consiste nella sostituzione di un solo amminoacido, la arginina-173, con una cisteina. Il suo effetto fenotipico è interessante perché si associa a ridotti livelli di HDL-c e modesta ipertrigliceridemia, nonostante un rischio cardiovascolare non aumentato rispetto alla popolazione generale. Una seconda variante della ApoA-I, detta ApoA-I<sub>Paris</sub>, si associa anch'essa a ridotti livelli di HDL e normale rischio cardiovascolare, e questa proprietà è correlata con la sostituzione dell'arginina-151 con una cisteina [6], per cui si crede che queste mutazioni "cisteiniche" siano in grado di potenziare alcune funzioni biologiche delle HDL incrementandone le proprietà ateroprotettive, giustificando così la concomitanza di bassi livelli di HDL-c e di rischio normale.

Oltre alla ApoA-I, alla composizione delle HDL concorrono anche altre apoproteine tra le quali ApoA-II, ApoA-IV, ApoC-I, ApoC-II, ApoD, ApoE, ApoJ, ApoL-I, ApoM, le cui funzioni restano in parte ancora poco conosciute [3], e altre proteine con funzione

enzimatica come LCAT, CETP, PLTP, fondamentali nella maturazione delle HDL, il cui ruolo nella maturazione della componente lipidica delle HDL verrà affrontato nel paragrafo 1.2; altri enzimi svolgono invece un ruolo chiave nel determinare le funzioni biologiche delle HDL, prime tra tutte la Paraoxonasi-1 (PON1), ad attività antiossidante, la Glutathione seleno-perossidasi (GPX), che rigenerando il glutathione protegge dallo stress ossidativo, la PAF-AH (Platelet Activated Factor Acetylhydrolase), che degradando il PAF svolge azione anti-infiammatoria, e la fosfolipasi secretoria A<sub>2</sub> di classe IIA (sPLA<sub>2</sub>-IIA) che idrolizza lipidi ossidati [7]. Infine, sono presenti alcune proteine come Siero-amiloide A, transferrina, ceruloplasmina, che attualmente non sembrano rivestire un ruolo specifico, ma che se presenti in eccesso sembrano implicate nella disfunzione delle HDL (vedi paragrafo 2.). Ciò che è importante da sottolineare, è che con i differenti metodi di quantificazione delle componenti proteiche delle HDL, è emerso che la quantità di molecole proteiche non è sufficientemente elevata da far sì che vi sia almeno una copia di ogni singola proteina per ciascuna particella HDL [8]: ne deriva che diverse particelle di HDL presentano una composizione proteico-enzimatica specifica che verosimilmente ne differenzia non solo la struttura biochimica, ma anche la funzionalità e le funzioni biologiche; le cosiddette “sottoclassi” di HDL si configurano come gruppi omogenei di particelle di HDL che presentano struttura e funzioni proprie, differenti tra le diverse sottoclassi [5].

## **1.2. Composizione lipidica e maturazione enzimatica**

La determinazione della composizione lipidica delle HDL è un compito complesso, poiché durante il loro ciclo vitale le singole particelle di HDL vanno incontro a numerose modificazioni della componente lipidica, riflesso della complessità del

metabolismo generale di queste lipoproteine. I fosfolipidi e gli esteri del colesterolo costituiscono la componente lipidica fondamentale delle HDL lungo tutto il loro ciclo vitale, infatti sono presenti da soli insieme alla ApoA-I all'interno delle HDL nascenti, e solo successivamente le particelle si arricchiscono di colesterolo libero, trigliceridi e altri lipidi [3]. Alcuni lipidi sono importanti poiché presentano funzioni biologiche specifiche: la sfingosina-1-fosfato (S1P) è uno sfingolipide che ha molte azioni omeostatiche che comprendono soprattutto azioni di vasodilatazione e vasocostrizione a livello arterioso, che è presente nel plasma in alte concentrazioni, e che si ritrova in grande quantità all'interno della componente lipidica delle HDL; la ragione del suo avido legame con le HDL può essere interpretata come un modo per ridurre le concentrazioni della forma attiva di questo lipide, legandolo alla lipoproteina, una azione necessaria per impedire una attivazione impropria dei suoi recettori specifici, e per bloccarne l'attivazione alla fine del processo infiammatorio che ne ha richiesto l'attivazione [9]. Inizialmente la particella di HDL nascente è costituita da due molecole di ApoA-I, che formano il 90% della lipoproteina, mentre i lipidi costituiscono il restante 10%, di cui solo una quantità esigua è rappresentata dal colesterolo libero, mentre la maggior parte sono fosfolipidi [5]; successivamente si ha la maturazione e il rimodellamento delle HDL grazie a 3 meccanismi principali: la secrezione cellulare di colesterolo, la redistribuzione di lipidi da e ad altre lipoproteine, e l'azione catalitica di alcuni enzimi lipolitici plasmatici [1]. Le cellule con eccesso di colesterolo, per mantenere l'omeostasi di questo lipide, secernono nel plasma la quantità in eccesso sotto forma di colesterolo libero ed esteri del colesterolo, grazie al complesso sistema dell'RCT (vedi paragrafo 3.1); questo quantitativo di colesterolo viene captato dalle HDL e accumulato all'interno della massa centrale della particella, il cosiddetto *core* lipofilico, prevalentemente sotto forma di esteri del colesterolo. L'enzima LCAT (Lecithin-Cholesterol Acyl-transferase) gioca un ruolo fondamentale nella maturazione

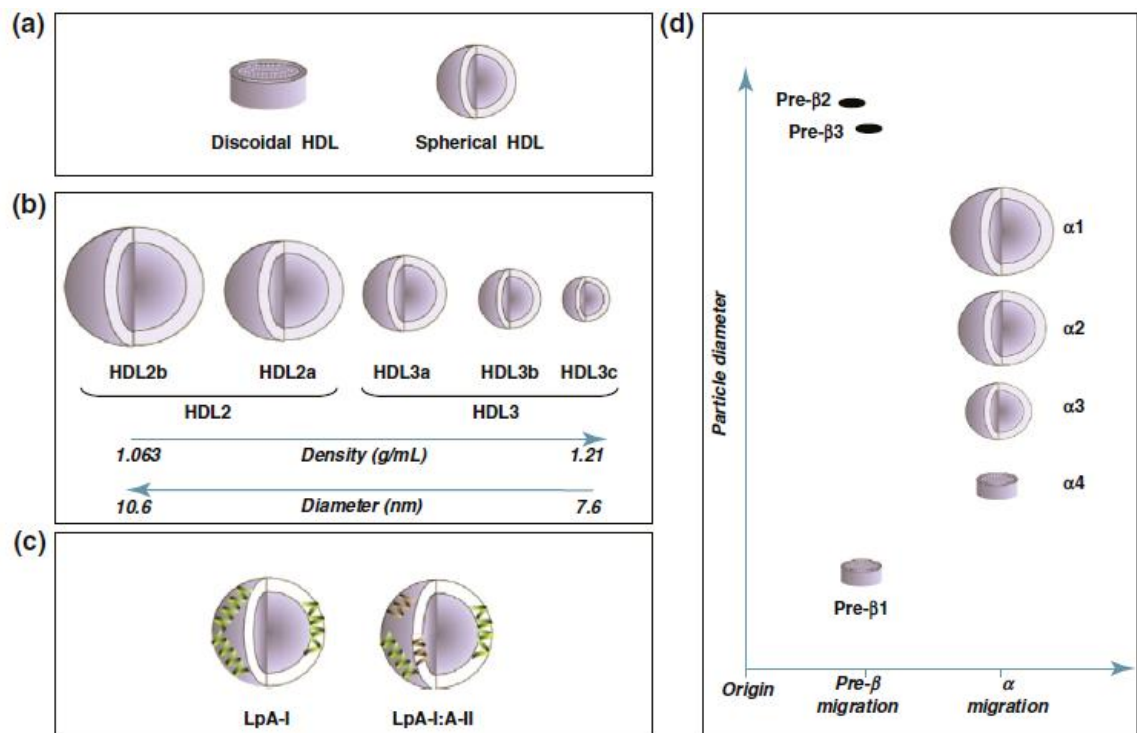
delle HDL, esterificando il colesterolo libero, quindi generando gli esteri del colesterolo che andranno a costituire il *core* delle HDL mature; LCAT catalizza il trasferimento di due gruppi acilici dalla lecitina (fosfatidilcolina) al colesterolo libero, formando esteri del colesterolo e lisolecitina. L'attività della LCAT risulta essere fondamentale per la corretta maturazione delle HDL, poiché individui con mutazioni di questo enzima presentano bassi livelli di HDL e una più rapida rimozione delle particelle di ApoA-I povere di esteri del colesterolo [5]. L'enzima CETP (Cholesterol-Ester Transfer Protein) circola nel plasma legato alle lipoproteine, e il suo ruolo è quello di ridistribuire la componente lipidica più idrofobica tra le differenti lipoproteine, in particolare trigliceridi e esteri del colesterolo [3]; la sua azione principale è quella di catalizzare lo scambio tra esteri del colesterolo, che dalle HDL passano all'interno delle lipoproteine ricche di trigliceridi (VLDL e chilomicroni), e trigliceridi, che effettuano il percorso inverso. L'effetto complessivo di questa attività enzimatica consiste in una riduzione della dimensioni delle HDL e in una loro modificazione composizionale, due eventi che ne permettono una più rapida rimozione da parte degli epatociti, favorendo quindi l'RCT; inoltre, trasferendo esteri del colesterolo dalle HDL alle lipoproteine contenenti ApoB, quando le LDL sono degradate dal fegato trasportano anche colesterolo proveniente dai tessuti periferici, potenziando così l'RCT in maniera indiretta [10]. CETP sembra svolgere anche un ruolo fondamentale all'interno della funzione ateroprotettiva delle HDL normali, poiché risulta in grado di catalizzare il trasferimento di esteri del colesterolo ossidati, considerati una classe di molecole che permettono l'ossidazione delle LDL (ox-LDL), dalle LDL alle HDL, riducendo così il grado di ossidazione delle LDL e quindi il rischio aterogenetico [11].

Vi sono ancora incertezze riguardo alla funzione dell'enzima PLTP (PhosphoLipid Transfer Protein), il quale sembra rendere le HDL più povere di fosfolipidi con l'effetto

di diminuirne le dimensioni e la densità, verosimilmente trasferendo i fosfolipidi ed altri lipidi dalle HDL più grandi a target non ancora identificati; secondo altre osservazioni sarebbe un enzima chiave nella maturazione delle HDL grazie ad un trasporto di fosfolipidi in senso inverso, cioè dalle lipoproteine ricche in trigliceridi alle HDL, determinandone l'ingrandimento e un rallentamento del catabolismo [12]. PLTP sarebbe anche in grado di catalizzare la fusione di due particelle di HDL mature con liberazione di ApoA-I povere in lipidi, che sarebbero così disponibili per iniziare la formazione di una nuova particella di HDL [5].

### **1.3. Sottoclassificazione**

Le HDL sono estremamente eterogenee in struttura, composizione e funzioni biologiche: presentano densità che variano tra 1,063 e 1,21 g/ml, dimensioni variabili tra 7 e 12 nm di diametro [3], ed inoltre presentano differenti mobilità elettroforetiche; queste caratteristiche fisico-chimiche, insieme alle correlate proprietà biologiche, permettono di individuare le cosiddette “sottoclassi” di HDL [4]. Un argomento di particolare interesse, sia biologico che clinico, è la possibilità che alcune sottopopolazioni di HDL siano più strettamente correlate allo sviluppo di malattia aterosclerotica e al rischio cardiovascolare rispetto ad altre [12]. La loro classificazione (fig. 1), che si basa sull'utilizzo di tecniche differenti, non possiede ancora una definizione ufficiale e universalmente condivisa che permetta ai ricercatori e ai clinici di



**Fig. 1.** Sottoclassi di HDL. Possono essere suddivise in base alla forma (a), alle sottofrazioni individuate alla ultracentrifugazione analitica (b), sulla base della presenza o assenza di ApoA-I e ApoA-II (c); infine, in base alla mobilità elettroforetica 2D (d). (modificato da Camont, Chapman, Kontush, *Trends in Molecular Medicine* xx (2011) 1–10)

utilizzare efficacemente i dati relativi alle differenti sottopopolazioni, ma alcuni studi stanno tentando di rendere meno confusa e più uniforme tale suddivisione.

Innanzitutto, possono essere divise in base alla presenza o assenza di ApoA-I e ApoA-II, in particelle che contengono solo una o entrambe le molecole; inoltre tramite la ultracentrifugazione sequenziale analitica è possibile individuare tre profili di velocità di precipitazione, definiti HDL1, HDL2 e HDL3, ma successivamente è stato osservato che all'interno della classe "HDL1" rientra solamente una quantità non significativa che

è presente in una minoranza di soggetti [13]. Quindi le principali due sottofrazioni individuate sulla base della densità sono le HDL2, grandi, ricche di lipidi e quindi meno dense, e le HDL3, più piccole e più dense, ricche di proteine; queste due sottofrazioni possono essere ulteriormente suddivise grazie all'elettroforesi su gel, in base alle dimensioni [4], in 5 sottofrazioni: in ordine di dimensioni decrescenti e densità crescente, sono HDL2b, le più grandi e le meno dense, HDL2a, HDL3a, HDL3b e HDL3c, che sono invece le più piccole e le più dense [12]. Un differente approccio elettroforetico, l'elettroforesi-2D, permette di suddividere le HDL sulla base delle dimensioni e della carica elettrica, ed è stato capace di individuare fino a 10 sottoclassi differenti, formanti 5 gruppi [8]:

- particelle piccole e di forma discoidale con mobilità pre- $\beta$ , che costituiscono precursori delle HDL, contenenti ApoA-I e fosfolipidi; prendono il nome di pre- $\beta$ -1 HDL.
- particelle piccole e discoidali con mobilità  $\alpha$ , contenenti ApoA-I, fosfolipidi e colesterolo libero, che prendono il nome di  $\alpha$ -4 HDL.
- Particelle piccole e sferiche di mobilità  $\alpha$  che contengono ApoA-I, ApoA-II, fosfolipidi, colesterolo libero, esteri del colesterolo e trigliceridi, dette  $\alpha$ -3 HDL.
- Particelle più grandi e sferiche di mobilità  $\alpha$ , con le stesse componenti delle  $\alpha$ -3 ma di dimensioni maggiori, dette  $\alpha$ -2.
- Particelle con le stesse caratteristiche delle  $\alpha$ -3 e  $\alpha$ -2, dalle quali si differenziano per le dimensioni maggiori e la quasi assenza di ApoA-II, dette  $\alpha$ -1.

Inoltre vi sono altre sottopopolazioni meno rappresentate e non presenti in tutti i soggetti, che sono pre- $\alpha$  HDL, simili alle  $\alpha$ -HDL ma senza ApoA-II, e le pre- $\beta$ 2, particelle grandi e discoidali di dubbia funzione [4; 8; 12].



I diversi metodi di classificazione pongono una serie di problemi nello sviluppare una classificazione univoca di queste particelle, e ciò porta ad una non completa comprensione dell'entità nosologica delle differenti sottoclassi e una difficoltà notevole nel correlare ciascuna classe alle loro specifiche funzioni biologiche. Ad esempio, le particelle che esprimono sia ApoA-I che ApoA-II sono concentrate all'interno dei valori di densità delle HDL3, mentre quelle esprimenti solo ApoA-I sono presenti sia tra le HDL2 che tra le HDL3; le  $\alpha$ -HDL predominano in entrambe le sottofrazioni HDL2 e HDL3, mentre le pre- $\beta$ 1 HDL sono presenti solamente all'interno delle HDL3 [8]. Un problema viene posto dalle piccole e dense HDL3c, che corrispondono in modo variabile a sottoclassi individuate con altri mezzi: in individui normali costituiscono una piccola porzione di HDL, fino al 6%, e fino al 10% del totale di ApoA-I; se suddivise con l'elettroforesi 2D rivelano una grande eterogeneità al loro interno, essendo costituite dalle piccole  $\alpha$ 3, pre $\beta$ 3 e pre $\beta$ 1-HDL, le quali nel plasma totale rendono conto invece, rispettivamente, del 37%, 4% e 12% dell'espressione totale di ApoI [4]. E' evidente come vi sia una sovrapposizione tra queste classi di lipoproteine e probabilmente con altre ancora. Per ovviare a questa classificazione multipla e ai relativi problemi che ne derivano, è stata proposta nel 2011, da Rosenson e colleghi, una prima prova di unificazione che suddivide le sottoclassi in base alle dimensioni e alla densità delle differenti classi di particelle, in cui si distinguono 5 classi di HDL: molto grandi (Very Large: HDL-VL), che corrispondono alle HDL2b dell'ultracentrifugazione e alla mobilità  $\alpha$ 1 all'elettroforesi 2D; grandi (Large: HDL-L), che corrispondono alle HDL2a e a mobilità  $\alpha$ 2; medie (Medium: HDL-M), cioè HDL3a e mobilità  $\alpha$ 3; piccole (Small: HDL-S), corrispondenti alle HDL3b e mobilità  $\alpha$ ; infine le molto piccole (Very Small: HDL-VS), che rendono conto delle HDL3c, comprese le pre $\beta$ 1 HDL [8].

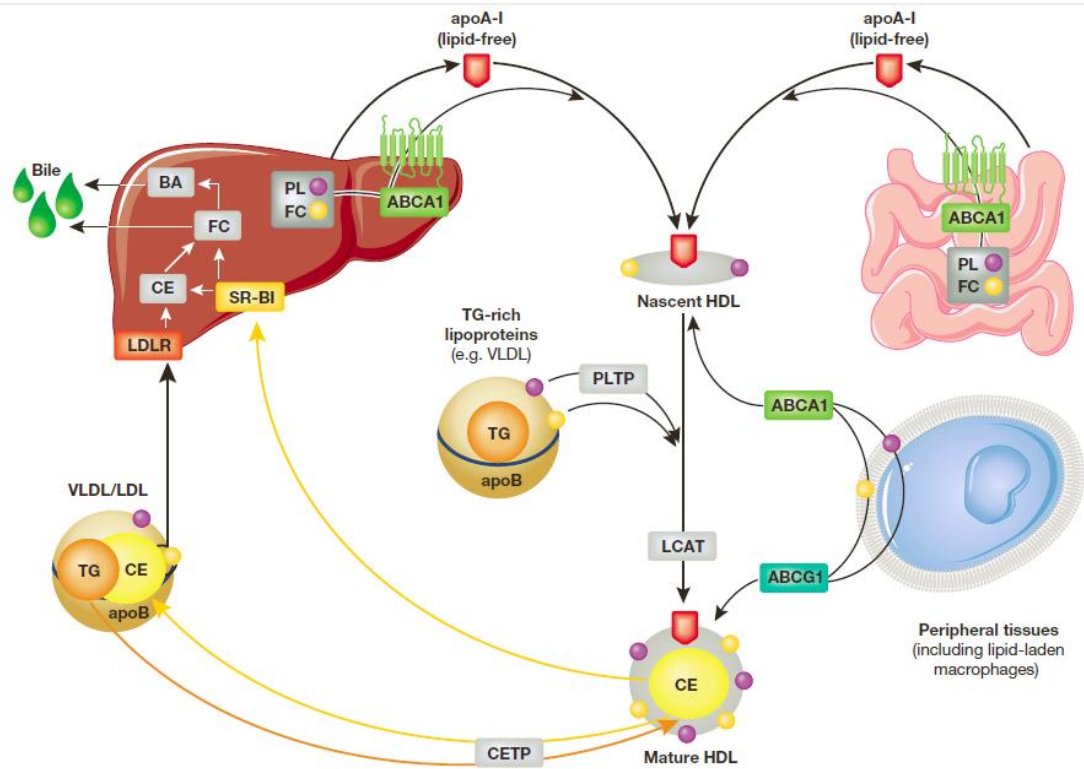
#### 1.4. Metabolismo e “ciclo vitale”

Le HDL sono una popolazione di particelle lipoproteiche che presenta un ciclo vitale formato da tre fasi: la nascita delle particelle, la loro maturazione a particelle mature, e il loro catabolismo o riciclo. Le HDL sono le sole lipoproteine che presentano un metabolismo complesso e un ciclo vitale, e ciò è strettamente correlato sia alla loro particolare composizione fisico-chimica, in particolare grazie alla struttura altamente dinamica della ApoA-I, sia alle funzioni biologiche alle quali sono destinate. La “vita” di una particella HDL nasce all’interno degli epatociti e degli enterociti, con la sintesi e secrezione di due molecole di ApoA-I, che vengono assemblate nel plasma con una quota esigua di fosfolipidi, mentre il contenuto di colesterolo resta minimo: questa piccola particella viene detta “HDL nascente” [14]. Queste HDL nascenti sono altamente instabili, quindi immediatamente iniziano a legare ed accumulare lipidi, in particolare colesterolo libero e fosfolipidi, che ricevono grazie a due meccanismi: primo, dall’efflusso cellulare di fosfolipidi e colesterolo in eccesso nei tessuti periferici, tramite il trasportatore ABCA1 [15] (vedi paragrafo 3.1.), e secondo, dalle lipoproteine contenenti ApoB (chilomicroni e VLDL) grazie alla lipolisi intravascolare da parte della lipoproteina-lipasi e di LCAT [3]. A questo punto le HDL nascenti si sono trasformate in pre $\beta$ 1-HDL [16] e costituiscono la forma di HDL più attiva nel ricevere il colesterolo in eccesso dai tessuti tramite il trasportatore ABCA1 [17], e accumulando ancora lipidi all’interno del *core* idrofobico mutano la loro forma, che da discoidale diventa sferica, trasformandosi nelle HDL-VS e HDL-S; inoltre è in questo passaggio che dal plasma acquisiscono la proteina ApoE [18]. La successiva maturazione delle HDL-S nelle più grandi e meno dense HDL-L e HDL-VL avviene soprattutto grazie al trasferimento di lipidi da altre lipoproteine, in particolare un ruolo chiave è svolto dagli enzimi LCAT e CETP: LCAT, oltre a ricoprire un ruolo di primaria importanza nella maturazione delle

HDL nascenti nelle pre $\beta$ -HDL, continua la sua azione di arricchimento di esteri del colesterolo all'interno del *core* ingrandendo la particella e riducendone la densità, trasformandole cioè in HDL2; infatti, individui con deficit di LCAT presentano bassi livelli di HDL e di ApoA-I, poiché risulta ridotta la maturazione delle pre $\beta$ -HDL e da queste alle HDL2, per cui si accumulano le particelle piccole e immature, le quali vanno più facilmente incontro a catabolismo renale [5; 18]. Al contrario, l'enzima CETP tende a determinare una riduzione degli esteri di colesterolo ed un aumento dei trigliceridi, con un effetto totale di riduzione di dimensioni ed aumento di densità delle HDL, un effetto diametralmente opposto a quello della LCAT; infatti individui carenti di questo enzima presentano livelli estremamente elevati di HDL-c e un turnover rallentato della ApoA-I [14]. Finemente bilanciati, gli enzimi LCAT e CETP in condizioni fisiologiche agiscono di concerto per maturare le HDL dalle forme HDL-S a quelle HDL-L, e queste particelle sono catabolizzate principalmente a livello epatico; qui la ApoA-I, liberata dalla componente lipidica, viene secreta di nuovo dagli epatociti per costituire nuove HDL nascenti [3]. Accanto a questa via principale di maturazione sono state scoperte altre interrelazioni tra le differenti classi e sottoclassi di HDL: una via alternativa di maturazione delle HDL è possibile grazie all'azione dell'enzima PLTP, che determina la fusione di due particelle mature, dalla cui unione si verifica il rilascio di nuove HDL nascenti [5]. Inoltre, sembra possibile che le grandi HDL2 possano essere convertite in HDL3, più piccole e dense, grazie all'azione combinata di CETP e LPL che determinano spostamento alle HDL, dopo idrolisi dei trigliceridi in esse presenti, di lipidi e apoproteine in eccesso che si trovano sulla superficie delle lipoproteine contenenti ApoB [12], e della lipasi epatica, che catalizza l'estrazione selettiva del *core* idrofobico delle HDL; in condizioni di ipetrigliceridemia questa via sembra essere potenziata, con riduzione delle dimensioni delle HDL e aumento delle HDL nascenti dal catabolismo delle HDL2 e HDL3 [8].

Anche il catabolismo delle HDL presenta delle caratteristiche uniche e molto complesse: infatti nella maggior parte dei casi le due componenti lipidica e proteica sono catabolizzate in modi e in tempi differenti; in alternativa la particella di HDL può essere endocitata e catabolizzata per intero, un processo noto come “estrazione olo-particellare delle HDL”. Gli epatociti e le cellule steroidogeniche delle gonadi e della corticale surrenale esprimono il recettore SR-B1, della superfamiglia dei recettori *scavenger*, che lega con elevata affinità le HDL e permette il passaggio selettivo dei lipidi del *core* idrofobico delle HDL mature al citoplasma delle cellule, con una costante di trasferimento più alta per colesterolo libero e suoi esteri, mentre fosfolipidi e trigliceridi sono trasferiti più lentamente [5]. Questo passaggio selettivo dei lipidi avviene in due fasi: la prima consiste nell’endocitosi mediata dal recettore SR-B1 di proteine e lipidi, mentre la seconda fase consiste nella separazione dei lipidi dalle proteine: mentre le proteine vengono riciclate e ri-immesse nel plasma, i lipidi vengono separati tra di loro grazie alla polarizzazione cellulare che permette la rapida secrezione di colesterolo e dei suoi esteri al polo biliare dell’epatocita, mentre fosfolipidi e trigliceridi sarebbero utilizzati a fini metabolici [19]. In seguito a questo prelievo selettivo di lipidi si formano particelle piccole e dense, che vengono metabolizzate per tornare a HDL2 mature; in questo processo si ha il distacco di molecole di ApoA-I dalla superficie, che si rendono così disponibili per iniziare un nuovo ciclo vitale [12]. L’estrazione olo-particellare delle HDL avviene a livello renale ed epatico: le piccole HDL nascenti e le pre $\beta$ 1 HDL sono filtrate attraverso il glomerulo e metabolizzate all’interno delle cellule tubulari probabilmente grazie al sistema cubilina/megalina [20], mentre per quanto riguarda il fegato sembra che sia possibile l’estrazione anche di particelle di HDL più grandi, forse ancora attraverso l’interazione con il sistema cubilina/megalina oppure tramite altri recettori non ancora ben caratterizzati [3], o più probabilmente grazie alla possibilità delle HDL di assumere molecole ApoE, che

permette al recettore per le LDL (LDLR) di riconoscere e legare le HDL e di innescare l'endocitosi da parte degli epatociti [5]. La figura 2 mostra una panoramica del metabolismo delle HDL.



**Fig. 2.** Metabolismo delle HDL. *PL: fosfolipidi; FC: colesterolo libero; CE: esteri del colesterolo; TG: trigliceridi; BA: acidi biliari (modificato da Besler C. et al, EMBO Mol Med 4, 251–268).*

## **2. Dalla “ipotesi HDL” alla “ipotesi funzioni delle HDL”**

### **1.1. HDL e rischio residuo: l’“ipotesi HDL”**

Numerosi fattori di rischio concorrono allo sviluppo della malattia aterosclerotica, in particolare i livelli di colesterolo LDL giocano un ruolo fondamentale nella predizione del rischio cardiovascolare complessivo, ma nonostante i numerosi sforzi ancora non siamo in grado di definire il livello di rischio del singolo individuo in maniera soddisfacente [21]. Infatti un numero significativo di soggetti vanno incontro ad eventi cardiovascolari maggiori e minori nonostante un livello di rischio non elevato; definito “rischio residuo”, esso consiste nella componente di rischio presente nonostante la correzione dei fattori di rischio modificabili, primo tra tutti un profilo lipidico pro-aterogenico [22]. Il ruolo delle HDL nello sviluppo dell’aterosclerosi è ancora in via di approfondimento, e tale rapporto è stato definito studiando da un lato le evidenze epidemiologiche, dall’altro grazie alla definizione delle loro funzioni biologiche in vitro ed in vivo: l’appellativo di colesterolo “buono” riflette la nozione ormai diffusa che le HDL abbiano funzioni anti-aterosclerotiche. Secondo tale ipotesi basse concentrazioni di HDL-c sarebbero responsabili di buona parte del rischio residuo, la cosiddetta “ipotesi HDL”, mentre concentrazioni elevate di HDL-c sarebbero protettive nei confronti dell’aterosclerosi [23]. Tale ipotesi però non è stata confermata, e sempre maggiori evidenze sperimentali stanno conducendo ad abbandonare la “ipotesi HDL” in favore della cosiddetta “ipotesi funzioni delle HDL” [24]. Nei paragrafi seguenti di questo capitolo saranno esposti gli studi chiave nell’evoluzione della ricerca sul rapporto tra HDL e aterosclerosi.

## 1.2. Studi di popolazione e di intervento: il “paradosso HDL”

Numerosi studi epidemiologici sono stati condotti per indagare il legame tra malattia aterosclerotica e concentrazione di HDL-c, rivelando che ridotte concentrazioni di HDL-c costituiscono un fattore di rischio indipendente, anche in concomitanza con LDL-c basso, un risultato confermato da numerosi lavori tra cui il recente studio PROCAM [25]; considerando ad aumentato rischio livelli inferiori a 40 mg/dl per i maschi e 50 mg/dl per le femmine, è stato calcolato che elevando le HDL il rischio cardiovascolare si riduca dal 2 al 3% per ogni mg/dl in più [26]. L'aumento delle concentrazioni plasmatiche di HDL sembra essere correlata ad una maggiore riduzione del rischio in soggetti con livelli basali di HDL-c più bassi, rispetto ai soggetti che riescono ad innalzare la concentrazione di HDL-c avendo livelli basali più elevati [27]: questo perché partendo da un rischio maggiore risulta essere maggiore anche la riduzione di rischio relativo, ma è un dato non confermato da tutti gli studi. Il rapporto tra concentrazioni di HDL-c e sviluppo di aterosclerosi in realtà non è così semplice come potrebbe sembrare, infatti la letteratura non è univoca al riguardo. Infatti, a dispetto di quanto confermato dallo studio PROCAM, è stato riportato che soggetti con difetto genetico dell'enzima LCAT presentano un rischio cardiovascolare globale sovrapponibile a quello della popolazione generale a fronte di concentrazioni estremamente basse di HDL-c [28]. Anche le varianti ApoA-I<sub>Milano</sub> e ApoA-I<sub>Paris</sub> contraddicono l'“ipotesi HDL”, poiché gli individui portatori della mutazione presentano concentrazioni di HDL-c significativamente più basse rispetto alla popolazione generale, ma ciò non si associa ad un aumentato rischio cardiovascolare. Inoltre il *Framingham Study* riporta che molti eventi cardiovascolari si verificano in soggetti con elevati livelli di HDL: addirittura il 44% degli eventi cardiovascolari sono avvenuti in pazienti maschi con concentrazioni di HDL superiori a 40 mg/dl e il 43% in

femmine con HDL maggiori di 50 mg/dl [29]. Quindi nonostante in molti studi di popolazione gli eventi cardiovascolari correlino con bassi livelli di HDL-c, la letteratura non conferma una relazione così stretta tra i due fattori: infatti individui con livelli estremamente ridotti di HDL-c possono presentare rischio cardiovascolare globale non aumentato rispetto alla popolazione generale, mentre quasi la metà degli uomini e delle donne che sono andati incontro ad un evento cardiovascolare maggiore presentano livelli di HDL considerati non a rischio.

Per far luce sulle incertezze derivanti dagli studi osservazionali, sono stati eseguiti alcuni studi di intervento: popolazioni in cui venivano aumentate le concentrazioni di HDL-c sono state confrontate con popolazioni di controllo, cercando di dimostrare il ruolo protettivo di concentrazioni maggiori di HDL-c; i risultati hanno disatteso le aspettative della “ipotesi HDL”, rendendo questa ipotesi ancora meno solida. Recentemente è emerso addirittura che il marcato aumento dei livelli di HDL-c totale e in particolare della frazione di HDL molto grandi è stato associato, paradossalmente, ad un aumentato rischio di malattia coronarica [30], invece che ad una riduzione di tale rischio. Questa correlazione paradossale è stata riscontrata anche dal *trial* “ILLUMINATE”, che studiava gli effetti del farmaco *torcetrapib*, un inibitore enzimatico della CETP, efficace nell’aumentare i livelli di HDL dal 50 al 100% rispetto ai valori basali: il *trial*, che aveva l’intento di dimostrare gli effetti protettivi di un aumento delle concentrazioni di HDL-c, è stato interrotto precocemente per dimostrato aumento della morbilità e della mortalità cardiovascolari [31]. Questi dati fanno intuire come non vi sia un rapporto univoco tra livelli di HDL-c e rischio cardiovascolare, tanto che qualcuno ha parlato addirittura, in risposta alla “ipotesi HDL”, di “paradosso HDL” [32]. In difesa della “ipotesi HDL”, alcuni Autori suggeriscono che la ragione di tale incongruenza sarebbe da attribuire principalmente alla presenza dei numerosi fattori di



confondimento difficilmente eliminabili, come fumo, BMI, attività fisica, assunzione di alcol ed altri, presenti in tutti gli studi epidemiologici analizzati, che altererebbero il rapporto tra HDL-c e aterosclerosi [31];

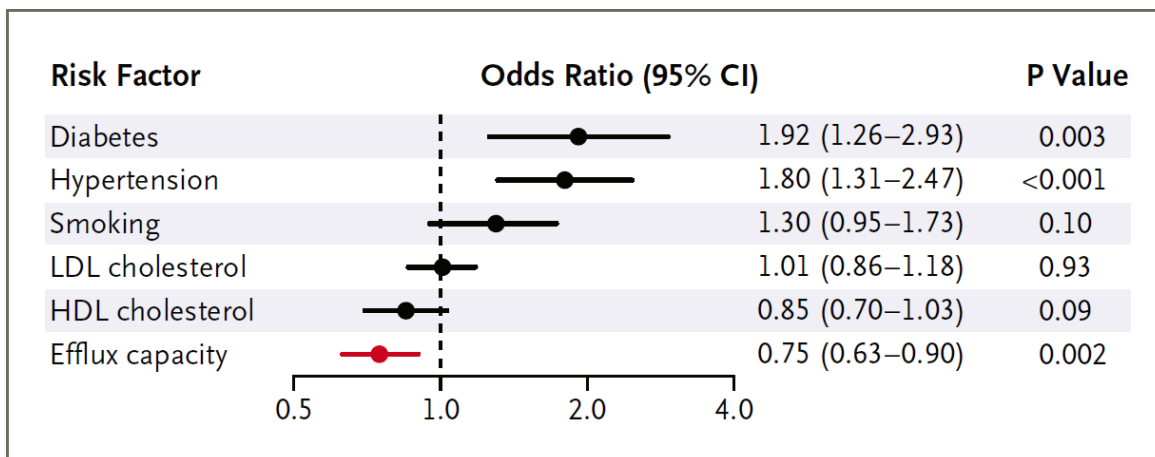
### **1.3. Dalla “ipotesi HDL” alla “ipotesi funzioni delle HDL”**

Gli studi epidemiologici evidenziano una correlazione positiva tra alte concentrazioni di HDL-c e basso rischio di eventi cardiovascolari, ma esistono numerose evidenze che mettono in dubbi tale relazione. Gli studi epidemiologici non riescono distinguere tra una relazione causale e una mera associazione statistica: la tecnica della randomizzazione mendeliana invece è in grado di individuare una relazione causale, indipendentemente da ogni fattore confondente [33]. Questa tecnica si basa sul presupposto che se un particolare marcatore plasmatico è correlato causalmente con un processo fisiopatologico, allora mutazioni genetiche associate a modificazioni delle concentrazioni plasmatiche di tale marker dovrebbero essere correlate ad una diminuzione o ad un aumento del rischio di sviluppare la malattia nella direzione e in valore predetti dalla variazione plasmatica. Uno studio recente ha segnato il definitivo tramonto della “teoria HDL”: utilizzando l’approccio detto genome-wide association, il gruppo di B. F. Voight [34] ha individuato un allele, codificante per la lipasi endoteliale (LIPG), presentante una serina (Asn396Ser), presente nel 2-6% della popolazione; i soggetti portatori dell’allele mutato presentano un incremento isolato della concentrazione plasmatica di HDL-c di circa 0,008-0,28 mmol/L per ogni copia presente dell’allele mutato, e tale differenza in HDL-c risulta significativa. Tale allele risulta non essere associato ad alcun altro fattore di rischio cardiovascolare ne’ ad altre modificazioni del profilo lipidico, per cui soddisfa tutti i criteri per l’analisi di

randomizzazione mendeliana. Considerando il modello secondo cui le concentrazioni plasmatiche di HDL-c sono correlate con lo sviluppo di infarto del miocardio, gli individui portatori della mutazione genetica associata ad un incremento isolato di HDL-c dovrebbero presentare un rischio ridotto rispetto alla popolazione generale, una riduzione calcolata dover essere in media del 13%. Sia uno studio prospettico con una popolazione di 70653 individui, sia uno studio caso-controllo di quasi 16000 pazienti e più di 48000 controlli, hanno dimostrato l'assenza di una qualsiasi correlazione causale tra concentrazione di HDL-c e infarto del miocardio. Anche la combinazione di altre 14 variante genetiche a singolo nucleotide (SNPs) correlate ad elevati livelli di HDL-c non ha mostrato alcun ruolo protettivo nei confronti dello sviluppo dell'infarto del miocardio. Questo studio conferma così l'incapacità della sola concentrazione plasmatica di HDL-c di rendere conto delle proprietà ateroprotettive delle HDL, e fa tramontare la cosiddetta "ipotesi HDL".

Se la concentrazione plasmatica di HDL-c non è predittiva di malattia, può esserlo viceversa la funzionalità delle HDL [35]: sono stati messi a punto alcuni metodi che sono in grado di misurare alcune funzioni fisiologiche di queste lipoproteine, e i risultati sono incoraggianti. Misure indirette dell'RCT nei topi, attraverso iniezione intraperitoneale di colesterolo marcato e misura delle concentrazioni di colesterolo marcato nel sangue e degli steroli marcati nelle feci, correlano molto bene con lo sviluppo di aterosclerosi, predicendone il rischio in maniera più accurata rispetto alle misurazioni dell'HDL-c [36]. E' stato possibile misurare l'entità dell'RCT anche nell'uomo in vivo [37], e ciò ha permesso di correlare per la prima volta una misura della funzionalità delle HDL allo sviluppo di aterosclerosi. Il risultato ha condotto ad accreditare sempre più la "teoria funzioni delle HDL": è risultato infatti che l'RCT è inversamente correlato sia a coronaropatia ostruttiva, sia all'aterosclerosi subclinica, espressa come spessore medio intima-media della carotide, e che ciò è indipendente

dalla concentrazione plasmatica di HDL-c [38]. Gli odds-ratio per HDL-c e entità dell'RCT (fig. 3) indicano infatti che il primo, nei confronti dello sviluppo di aterosclerosi sia clinica che subclinica, non è informativo, mentre il secondo è significativamente associato ad un effetto protettivo [38].



**Fig. 3.** La misura dell'RCT è significativamente correlata allo sviluppo di aterosclerosi, mentre non lo è la misura dell'HDL-c. (modificato da Khera et al, *N Engl J Med* 2011;364:127-35.)

Da questi studi ne risulta quindi che mentre le concentrazioni plasmatiche di HDL-c non sono associate a sviluppo di malattia aterosclerotica, la funzionalità delle HDL è un potente predittore di malattia: occorre quindi accantonare l'ipotesi HDL ed approfondire l'ipotesi funzioni delle HDL".

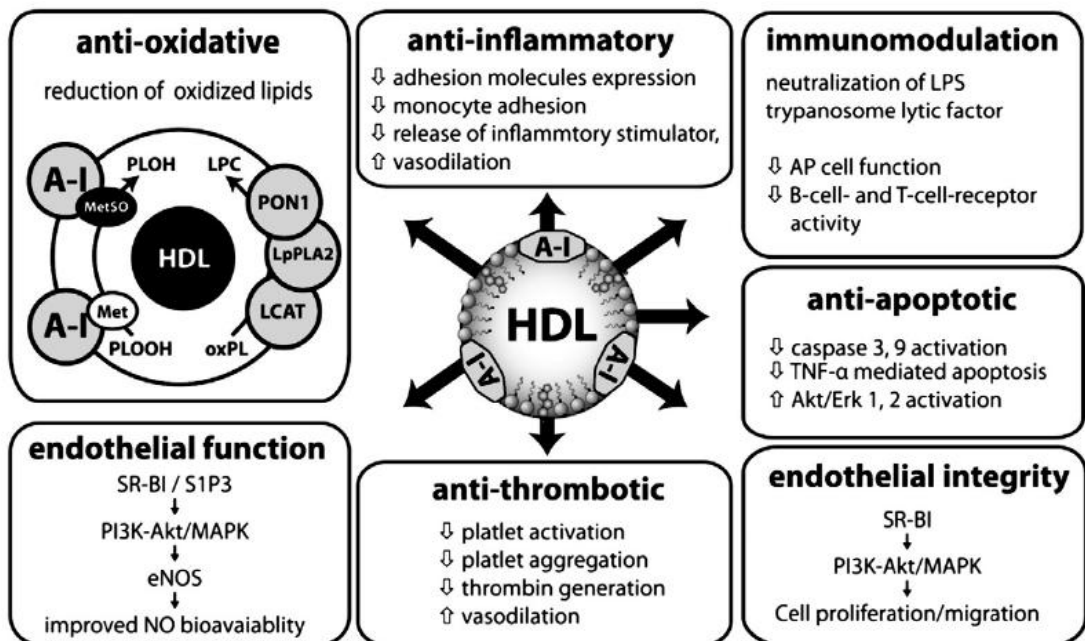
#### **1.4. HDL fisiologiche e disfunzionanti**

Recentemente è emersa una nuova concezione delle HDL, a cui non si guarda più come a un fattore protettivo o un fattore di rischio solamente in base alle quantità di HDL-c, ma come un insieme eterogeneo di particelle dalle molte funzioni biologiche, che possono variare da soggetto a soggetto, tra condizioni patologiche differenti, e addirittura tra particella e particella all'interno dello stesso soggetto, le cui proprietà non sono deducibili solamente dalla quantità di colesterolo che trasportano [39]. La ricerca nel campo delle HDL e del loro rapporto con l'aterosclerosi si sta impegnando soprattutto sull'individuazione e sulla misurazione delle proprietà biologiche fisiologiche e fisiopatologiche di queste stupefacenti particelle, concentrandosi nel mettere a punto metodi sempre più efficaci per valutare le funzioni delle HDL. Sulla scia delle scoperte delle funzioni "non convenzionali" delle HDL, a metà degli anni '90, hanno iniziato ad emergere termini come "HDL con funzione difettiva", "HDL disfunzionanti", "HDL non-fisiologiche", che hanno aperto la strada ad una nuova era: è stato reso possibile un radicale cambio di direzione delle ricerche, dalla "ipotesi HDL" verso la "ipotesi funzioni delle HDL" [40]. Se la quantità di HDL-c non correla con il rischio cardiovascolare se non per valori molto bassi, per spiegare i rapporti controversi tra HDL in range fisiologico e malattia aterosclerotica è verosimile che sia piuttosto la qualità delle HDL e la modificazione del loro metabolismo e del rapporto tra le sottofrazioni, a determinare un maggiore o un minore rischio, poiché influirebbero sulle funzioni delle HDL. Oltre a spiegare i dati controversi sul rapporto tra HDL e malattia aterosclerotica, e a proporre un nuovo approccio all'aterosclerosi, l'ipotesi della funzione prova anche a rendere ragione della genesi del rapporto contraddittorio evidenziato dagli studi epidemiologici. Infatti, è plausibile che la apparente duplice capacità delle HDL di essere, alla stessa concentrazione plasmatica, in un individuo un

fattore di rischio, e in altri un fattore protettivo, sia la conseguenza di una possibile variabilità di funzioni delle HDL: le HDL “fisiologiche” o “funzionanti”, che conservando le proprietà tipicamente correlate a questa classe di lipoproteine, agiscono in senso ateroprotettivo, ma se, in seguito ad alcune modificazioni patologiche, perdono le loro funzioni possono diventare non solo non-ateroprotettive, ma addirittura pro-aterogeniche; in questo caso si parla di HDL “disfunzionanti” [41]. Queste modificazioni funzionali sono slegate dalle concentrazioni plasmatiche di HDL-c, per cui la semplice misurazione di questi livelli non sarebbe indicativa del rischio collegato alle HDL, ma soltanto di una modificazione strutturale correlata allo stato funzionale [39]. I meccanismi attraverso cui le HDL normali svolgono le loro funzioni anti-aterogeniche sono in corso di studio, e sono stati ottenuti i primi risultati, tanto che oggi alcuni dei fattori principali dell’azione ateroprotettiva di queste lipoproteine sono ben noti; molto meno conosciute sono le condizioni in cui si creano le HDL che definiamo “disfunzionali”, così come non sono noti i meccanismi attraverso i quali le HDL diventando disfunzionali passano da essere un fattore protettivo a diventare un rischio per l’aterogenesi. Prima di analizzare le funzioni fisiologiche delle HDL e le loro modificazioni fisiopatologiche, occorre avere chiaro il rapporto che queste lipoproteine intrattengono con la placca lipidica: il prossimo paragrafo tratterà una panoramica delle attuali conoscenze circa le interazioni molecolari tra HDL, endotelio e componenti della placca aterosclerotica.

### 3. Funzioni delle HDL

Alla luce dell'ipotesi “funzione delle HDL”, nello studio su patogenesi e prevenzione dell'aterosclerosi l'attenzione viene attualmente spostata, dalla semplice misura della quantità di colesterolo contenuto all'interno delle HDL, verso le loro funzioni biologiche, responsabili dell'attività anti-aterosclerotica delle HDL e di altre loro proprietà. La funzione tutt'oggi più nota resta la prima ad essere stata scoperta, che ha conferito a queste particelle il soprannome invalso nel grande pubblico di “colesterolo buono”: si tratta del trasporto inverso del colesterolo (RCT, Reverse Cholesterol Transport); accanto all'RCT negli ultimi anni sono state evidenziate molte altre funzioni “nuove” delle HDL, tra cui proprietà antiossidanti, anti-tinfiammatorie, vasodilatatorie e protettive sul'endotelio, anti-trombotiche e anti-infettive [12]. La figura 4 mostra un



**Fig. 4.** Funzioni biologiche delle HDL oltre all'RCT (modificato da Marsche et al, *Pharmacology & Therapeutics* 137 (2013) 341–351)

quadro d'insieme delle funzioni biologiche che presentano HDL fisiologiche oltre all'RCT. Queste funzioni biologiche meritano di essere studiate approfonditamente per il loro peso nella patogenesi dell'aterosclerosi, permettendo forse di spiegare la genesi e il significato del cosiddetto rischio residuo meglio rispetto alla mera misurazione dell'HDL-c, e permettendo di identificare nuovi interventi terapeutici e di prevenzione.

### **3.1. Trasporto inverso del colesterolo**

L'omeostasi del colesterolo è fondamentale per le funzioni di membrana e per la sopravvivenza cellulare, e per questo è regolato da meccanismi multipli, che agiscono sul suo assorbimento, sintesi, immagazzinamento e efflusso cellulare; mentre sono disponibili numerose informazioni circa l'assorbimento, la sintesi e l'immagazzinamento del colesterolo, il suo efflusso cellulare, cioè il meccanismo che rimuove il colesterolo in eccesso dai tessuti resta meno conosciuto nell'uomo. Nota con il nome di RCT, questa funzione delle HDL ha rilevanza di primo piano nell'omeostasi, perchè, con l'importante eccezione degli epatociti e delle cellule steroidogenetiche, le cellule umane non sono in grado di metabolizzare il colesterolo: l'RCT permette di rimuovere la quantità di colesterolo in eccesso dalle cellule periferiche, prevenendone un accumulo potenzialmente tossico, e di trasportarlo al fegato, dove sarà escreto nella bile sotto forma di acidi biliari, permettendone contemporaneamente la *clearance* e lo svolgimento di importanti funzioni digestive. Le HDL, se normalmente funzionanti, rimuovono dai tessuti il colesterolo in eccesso per permetterne l'escrezione epatica, e si crede che, rimuovendo il colesterolo accumulato all'interno delle strie lipidiche e delle placche aterosclerotiche, questo stesso meccanismo giochi un ruolo centrale nella prevenzione dell'aterosclerosi.

Schematicamente, è possibile suddividere idealmente il processo dell'RCT in tre fasi distinte:

- 1) Efflusso cellulare di colesterolo dai tessuti periferici nello spazio extra-cellulare;
- 2) Trasporto plasmatico, grazie all'esterificazione del colesterolo libero e trasporto all'interno del compartimento plasmatico sotto forma di lipoproteine;
- 3) Escrezione fecale, secondaria alla captazione epatica e alla secrezione biliare sotto forma di steroli neutri e acidi biliari.

Il passaggio transmembranario di colesterolo è regolato da almeno quattro processi specifici [38; 42]:

- Un passaggio unidirezionale ATP-dipendente mediato dal trasportatore di membrana ABCA1;
- Un passaggio unidirezionale ATP-dipendente mediato dal trasportatore di membrana ABCG1 e probabilmente da ABCG4; questi due trasportatori possono formare eterodimeri;
- Un passaggio bidirezionale, non-ATP-dipendente, mediato dal recettore SR-B1;
- Diffusione passiva (non mediata da recettori) secondo il gradiente di concentrazione.

Questi quattro meccanismi agiscono in modo sinergico in tutti i tessuti dell'organismo, ma risultano essere particolarmente attivi nelle cellule principalmente implicate nell'aterosclerosi, le cellule muscolari lisce e i macrofagi [16]. Essendo i trasportatori più attivi nell'efflusso di colesterolo [15], numerosi studi si sono concentrati sui trasportatori della classe ABC (ATP-Binding Cassette): essi sono complesse proteine transmembrana costituite da dodici domini, che permettono alle HDL di arricchirsi di colesterolo e fosfolipidi, e questa loro attività si verifica allorché si abbia l'interazione tra uno specifico dominio extracellulare del trasportatore ABC e le



proteine ApoA-I e ApoA-II. L'energia necessaria per trasferire colesterolo e fosfolipidi è fornita dal legame di una molecola di ATP con due domini intracellulari dedicati [15]. Rivestendo un ruolo di primissimo piano nell'intero RCT, l'espressione dei trasportatori ABC è sottoposta ad una regolazione nucleare e citoplasmatica estremamente fine, che si articola a livello trascrizionale, post-trascrizionale, del *trafficking* intracellulare e della sua degradazione, e in cui intervengono anche specifici micro-RNA [43]. La trascrizione è regolata da recettori intranucleari residenti che sono sensibili alla concentrazione di lipidi e in particolare di colesterolo, detti Liver X Receptors (LXR), che formando dimeri con i recettori dei retinoidi (RXR) permettono la trascrizione del trasportatore ABCA1; le modifiche post-trascrizionali sembrano influenzate invece che dal colesterolo, da alcuni acidi grassi [15]. Il loro meccanismo di azione non è ancora completamente chiarito, ma l'ipotesi più accreditata prevede un contatto, mediato dai recettori ABC e le ApoA, tra la superficie cellulare e le HDL, che permette l'efflusso di lipidi che si inseriscono all'interno del *core* lipidico della lipoproteina [42]. Il ruolo dei diversi trasportatori ABC è diversificato all'interno del ciclo vitale delle HDL, costituendone alcune tappe fondamentali: ABCA1 è attivo nel permettere l'efflusso cellulare di colesterolo e fosfolipidi alle particelle di HDL povere in lipidi, in particolare le cosiddette "HDL nascenti", determinandone così la maturazione a pre $\beta$ -HDL, ma non ne permette l'efflusso alle HDL mature; il trasportatore ABCG1, invece, è il principale responsabile dell'efflusso di colesterolo e fosfolipidi alle HDL mature, ma non lo rende possibile alle HDL nascenti [16]. L'importanza dei trasportatori ABC nell'RCT è dimostrata dai casi di malattia di Tangier, in cui il trasportatore ABCA1 è difettoso: indipendentemente dal sesso, gli individui affetti in maniera omozigote presentano livelli di HDL fortemente ridotti, fino al 5% dei valori normali [15], per mancato arricchimento del loro pool lipidico dovuto proprio alla carenza del trasportatore ABCA1; inoltre, dopo i trenta anni di età, presentano un rischio di malattia

cardiovascolare sei volte più elevato rispetto alla popolazione generale [18], probabilmente da ascrivere alla quasi assente azione dell'RCT di rimozione del colesterolo. Accanto alle osservazioni sulla malattia di Tangier sono stati svolti alcuni studi per verificare il rapporto esistente tra ABC e aterosclerosi. Studi su animali hanno confermato che l'assenza di ABCA1 e/o ABCG1 si associa sia a ridotti livelli di HDL sia ad accelerata aterosclerosi, mentre altri hanno smentito che ciò si accompagni ad un maggiore rischio, nonostante l'HDL-c fosse basso [44]; topi iperesprimenti il gene *Abca1* mostrano tuttavia lesioni di minori dimensioni e di minore complessità. Paradossalmente, il *knock-out* del gene *Abcg1* determina aumentato efflusso di colesterolo nei macrofagi [36]: ciò è probabilmente da mettere in correlazione con un aumento compensatorio dell'attività di ABCA1.

Il trasportatore SR-B1 è un recettore della famiglia “*scavenger*”, in grado di riconoscere numerosi ligandi, tra i quali oxLDL, cellule apoptotiche, fosfolipidi anionici, ed HDL [45]: tra tutti i ligandi, le HDL presentano quello a più alta specificità di legame [5; 45]. SR-B1 permette un passaggio bidirezionale di colesterolo e fosfolipidi tra le cellule e le HDL, sulla base del gradiente di concentrazione di colesterolo tra le HDL e la membrana cellulare, configurandosi dunque come un trasporto facilitato [46]; questo recettore risulta implicato sia nell'efflusso cellulare di colesterolo, probabilmente giocando un ruolo di minore importanza rispetto ai trasportatori ABC, sia nella rimozione cellulare di colesterolo dalle HDL, suggerito dalla sua localizzazione epatica e nelle cellule steroidogenetiche non-placentali [42]. L'iperespressione di SR-B1 determina riduzione delle lesioni aterosclerotiche, parallelamente ad una riduzione dei livelli di HDL-c e del numero di particelle HDL, mentre topi *knock-out* per *Sr-b1* presentano livelli significativamente aumentati [36]: la spiegazione di questo comportamento risiede nella sua doppia attività, sia nella fase dell'RCT di efflusso cellulare, sia nella fase di metabolismo epatico delle HDL. SR-B1 permette il passaggio

del colesterolo libero, degli esteri del colesterolo e dei fosfolipidi da e verso il *core* idrofobico delle HDL, lasciando immutate le proteine e una piccola quota di fosfolipidi e di colesterolo [45]. Quando il passaggio di colesterolo avviene tra le HDL e gli epatociti, si ha l'*uptake* di colesterolo mentre nel plasma restano particelle di HDL deplete di lipidi pronte per iniziare un nuovo ciclo vitale [42].

L'RCT non si avvale solamente del trasporto diretto del colesterolo da parte delle HDL, ma comprende anche altri due meccanismi che giocano ruoli la cui importanza deve essere ancora definita. Il primo meccanismo consiste nel trasporto di esteri del colesterolo dai tessuti periferici al fegato tramite le lipoproteine contenenti ApoB grazie all'azione dell'enzima CETP, che permette di rimuovere e trasportare molto colesterolo in più rispetto a quello che sarebbe possibile grazie solamente alle HDL; il secondo meccanismo consiste nella secrezione intestinale di colesterolo (TICE: Trans-Intestinal Cholesterol Excretion), un meccanismo recentemente proposto sulla base di osservazioni in topi in cui la secrezione biliare di colesterolo era abolita e in cui i livelli di steroli neutri fecali non risultavano adeguatamente ridotti [42], per cui è stata proposta una secrezione trans-intestinale diretta di colesterolo. Mentre il trasporto di colesterolo CETP-mediato tramite le lipoproteine Apo-B è ormai accertato, la TICE deve ancora essere confermata nell'uomo, ma se fosse presente, potrebbe rappresentare un futuro target per nuove terapie ipocolesterolemizzanti.

### **3.2. Funzione antiossidante**

Le HDL devono gran parte della loro funzione ateroprotettiva alle loro intrinseche proprietà antiossidanti [47]; inizialmente suggerite da studi epidemiologici, in cui l'innalzamento delle concentrazioni di HDL riduceva l'incidenza di eventi

cardiovascolari in quantità significativamente maggiore nel gruppo di pazienti fumatori rispetto al gruppo di pazienti non fumatori, riducendo lo stress ossidativo [26], le capacità antiossidanti delle HDL successivamente sono state osservate e confermate sia in vitro che in vivo. Le HDL possiedono la capacità di ridurre l'ossidazione delle LDL da parte di metalli di transizione, di prevenire la formazione di idroperossidi, e di fungere da accettori di lipidi ossidati rimuovendo lipidi ossidati dalle LDL prevenendone la ulteriore ossidazione a oxLDL [48]. L'attività antiossidante delle HDL è diretta in particolare nei confronti delle oxLDL, le molecole che innescano lo sviluppo delle lesioni aterosclerotiche. Questa attività antiossidante nei confronti delle LDL necessita di due passaggi: il primo momento prevede il trasferimento dei lipidi ossidati dalle LDL alle HDL [49], un movimento che sembra essere favorito dalla rigidità dello strato lipidico più esterno delle HDL [11], mentre il secondo passaggio consiste nella neutralizzazione di tali lipidi, eliminandone il potere ossidante [49]. Alle proprietà antiossidanti delle HDL partecipano sia proteine strutturali, come le apoproteine, sia enzimi con attività antiossidante diretta, sia lipidi. Un ruolo di primaria importanza è interpretato dalla ApoA-I, mentre la ApoA-II avrebbe una minore capacità antiossidante [50]. Interessante risulta lo studio delle funzioni delle ApoA-I<sub>Milano</sub> e ApoA-I<sub>Paris</sub>, che si associano a livelli estremamente bassi di HDL-c in assenza di un aumentato rischio cardiovascolare: le proteine mutate presentano attività antiossidante significativamente superiore rispetto alla ApoA-I *wildtype* [51]. L'infusione di ApoA-I<sub>Milano</sub> in soggetti affetti da aterosclerosi determina riduzione degli indici di placca e della loro area [6], indicando un futuro possibile utilizzo di queste molecole per rallentare o addirittura invertire la progressione dell'aterosclerosi. La ceruloplasmina, che è normalmente presente all'interno delle HDL, può agire come chelante di ioni metallici liberi, i quali in acqua costituiscono potenti generatori di radicali liberi per cui la chelazione di tali ioni da parte delle HDL riduce lo stress ossidativo; tuttavia l'effettiva importanza in

vivo di questa azione non è chiara. All'interno delle HDL vi sono anche alcuni enzimi con attività antiossidante diretta, primo tra tutti PON1: presente normalmente all'interno delle HDL, questa esterasi-lattinasi è capace di idrolizzare gli acidi grassi ossidati [7]. L'enzima PAF-AH, inattivando il PAF contribuisce a ridurre lo stress ossidativo generato dalla risposta infiammatoria e dalle cellule del sistema immunitario [52]. Anche LCAT e la sPLA<sub>2</sub>-IIA intervengono nelle funzioni antiossidanti delle HDL, idrolizzando fosfolipidi ossidati in liso-fosfatidilcolina [53].

Recenti evidenze suggeriscono che vi possano essere differenze tra le varie sottoclassi di lipoproteine, in quanto a capacità antiossidanti: la sottofrazione più attiva nella rimozione dei lipidi ossidati dalle LDL sembra essere quella delle piccole e dense HDL3, mentre le più grandi e leggere HDL2 avrebbero una capacità antiossidante minore [50]. Le HDL3, piccole e dense, sono più attive nel rimuovere e neutralizzare radicali generati dall'ossidazione secondaria dei lipidi, come aldeidi e fosfolipidi a catena corta ossidati, rispetto alle HDL2 [54]. Ciò può essere dovuto a differenze sia nella composizione lipidica, per la quale le HDL2 presentano un monostrato superficiale più fluido e quindi acquisterebbero lipidi ossidati meno facilmente, sia nella composizione proteica: la ApoA-I infatti, all'interno delle HDL3, presenta una conformazione tridimensionale che potenzia la sua capacità di catalizzare reazioni di ossido-riduzione [14], ed inoltre sia PON1 che PAF-AH, insieme alle ApoA-I e ApoA-II, sembrano essere maggiormente rappresentate all'interno delle HDL3 rispetto alle HDL2, e anche questo aspetto può rendere conto della maggiore capacità antiossidante nei confronti delle LDL delle prime rispetto alle seconde [50].

### **3.3. Funzione anti-infiammatoria**

Le HDL presentano azioni anti-infiammatorie multiple, che agiscono a livelli differenti: sono capaci di inibire l'espressione di molecole di adesione da parte dell'endotelio in risposta a citochine infiammatorie e di inibire l'adesione dei monociti all'endotelio [23]; inoltre bloccano l'attivazione dei monociti, ne riducono la secrezione di citochine pro-infiammatorie e inibiscono l'attivazione e la diapedesi dei neutrofilii [55]. Queste capacità antiinfiammatorie dirette sono affiancate e potenziate dalle loro funzioni antiossidanti, grazie alle quali rimuovendo lipidi ossidati e neutralizzando alcune sostanze ossidanti riducono anche la risposta infiammatoria locale. Incubando cellule endoteliali con TNF $\alpha$  viene stimolata l'espressione di molecole di adesione come ICAM-1, VCAM-1, E-selectina e P-selectina, che determinano l'adesione e la diapedesi dei monociti ed altri leucociti all'interno della parete arteriosa; aggiungendo HDL, è possibile osservare una riduzione significativa dell'espressione di queste molecole, riducendo quindi l'infiltrazione di monociti all'interno della parete arteriosa [23], e questo effetto è dose-dipendente e presenta la massima capacità inibente a concentrazioni fisiologiche di HDL [56]; analoghi studi in vivo nel coniglio e nel topo hanno dimostrato che la ridotta espressione di molecole di adesione si associa a ridotto infiltrato monocitario e ridotto spessore della neointima [23]. Tra tutte le sottoclassi di HDL, le HDL3 presentano la maggiore capacità di inibizione dell'espressione delle molecole di adesione: ciò è da associarsi probabilmente alla loro maggiore capacità antiossidante, poiché essendo capaci di neutralizzare l'ossidazione e rimuovere i lipidi ossidati, riducono uno dei principali stimoli all'innescamento della cascata infiammatoria [14; 54]. Questi effetti pleomorfi sembrano essere mediati dall'interazione di ApoA-I con i recettori cellulari per l'efflusso di colesterolo, ABCA1 e SR-BI, e in parte da lisofingolipidi che interagiscono con il recettore per il S1P [9]. Nonostante le HDL

possano legare citochine come TNF $\alpha$ , non risulta che questo sia il meccanismo attraverso il quale inibiscono l'*up-regulation* delle molecole di adesione, e si crede che siano interessate modifiche di segnali cellulari post-recettoriali, probabilmente grazie all'inibizione della traslocazione o dell'attivazione di NF-kB [56]. Inoltre un effetto di riduzione dell'espressione di molecole di adesione è portato avanti anche dall'enzima PAF-AH, che idrolizza il PAF bloccandone gli effetti di stimolazione dell'adesione cellulare, aumento della permeabilità vascolare, aggregazione piastrinica e contrazione delle cellule muscolari lisce [56].

Le HDL presentano anche effetti anti-infiammatori diretti, oltre alle loro capacità di ridurre gli stimoli infiammatori: cellule come monociti, macrofagi e cellule dendritiche, quando esposte direttamente alle HDL, presentano ridotta secrezione di citochine pro-infiammatorie, riduzione dell'espressione di molecole co-stimolatorie e riduzione della presentazione dell'antigene [53]; il meccanismo con cui vengono indotte queste modificazioni non è noto, ma una interessante ipotesi prevede che sia la modificazione della composizione lipidica di membrana secondaria all'interazione con i lipidi delle HDL, che determinando modificazione della struttura e funzione delle cosiddette "placche lipidiche" (*lipid rafts*), indurrebbe modificazioni dei segnali intracellulari che regolano l'espressione dei sistemi sopra citati [53].

### **3.4. Effetti sull'endotelio**

Le HDL presentano alcune proprietà che le rendono capaci di mantenere le funzioni fisiologiche dell'endotelio normale e di contrastare l'insorgenza e la progressione della disfunzione endoteliale; inoltre stimolano la riparazione dell'endotelio danneggiato tramite attivazione di cellule progenitrici endoteliali [7]. L'attività principale delle HDL

nel preservare la normale attività delle cellule endoteliali consiste nella stimolazione del rilascio di ossido nitrico e di prostaciclina (PGI<sub>2</sub>), opponendosi perciò all'instaurarsi di disfunzione endoteliale e favorendo la vasodilatazione. ApoA-I presenta due azioni principali: da una parte stabilizza la prostaciclina, prodotta dalle cellule endoteliali, aumentandone la durata di azione e quindi prolungandone l'azione vasodilatatoria e l'attività di inibizione dell'aggregazione piastrinica [7]; dall'altra, stimola la secrezione di ossido nitrico. Infatti, la sintesi di NO è dovuta all'attivazione dell'enzima NO-sintasi endoteliale (eNOS) da parte della chinasi Akt e delle MAP-chinasi, che vengono attivate dalla fosfatidil-inositolo-3-chinasi (PI3K), attivata a sua volta dal recettore SR-BI dall'interazione con la ApoA-I legante lipidi [57]; questa via è modulata dal recettore per S1P, la cui assenza riduce la sintesi di NO fino al 50% nel topo [9]. Singole molecole di ApoA-I, delipidate, non sono in grado di stimolare l'attivazione della eNOS [56], per cui non è una proprietà propria solamente della ApoA-I ma della particella di HDL in toto; tuttavia non è chiaro come le HDL attivino SR-BI e la eNOS. Le HDL2 presentano proprietà vasodilatanti più spiccate rispetto alle HDL3, nonostante queste ultime siano più ricche di S1P e quindi teoricamente più capaci di co-stimolare la eNOS [57]: questa differenza in capacità vasodilatanti risiederebbe in un effetto delle due classi di HDL sul rilascio del trombossano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>), che è vasocostrittore e promuove l'aggregazione piastrinica. Infine, le HDL sono attive nel prevenire l'apoptosi delle cellule endoteliali danneggiate e nello stimolarne la proliferazione [58]: S1P, che è implicato nell'angiogenesi, nella riparazione delle ferite, nell'apoptosi e nella proliferazione cellulare, grazie alle HDL è trasportato alle cellule endoteliali danneggiate dalle oxLDL, dove attraverso i recettori associati a proteine G detti SP<sub>1</sub> e SP<sub>3</sub>, stimola la migrazione e la sopravvivenza delle cellule endoteliali attivando ERK, Akt, p38-chinasi, recettori la cui inibizione si associa ad aumentata apoptosi e ridotta proliferazione delle cellule endoteliali [59]; l'effetto anti-apoptotico si esplica grazie al



blocco sia della via attivata dalla caspasi-3, sia della via mitocondriale dell'apoptosi [56]. Le HDL3c risultano due volte più potenti rispetto alle HDL2b nell'inibire l'apoptosi delle cellule endoteliali e nello stimolarne la proliferazione [12].

### **3.5. Altre funzioni**

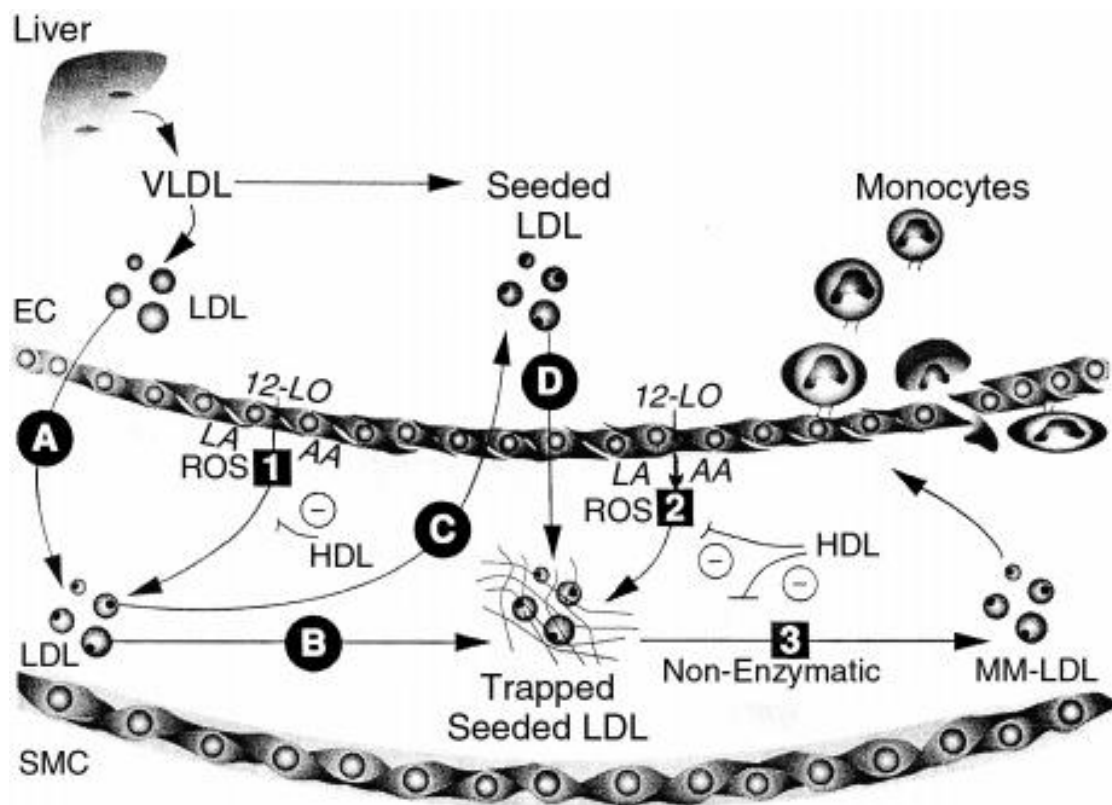
Le HDL presentano anche altre funzioni biologiche, attualmente meno caratterizzate rispetto alle loro funzioni antiossidante, anti-infiammatoria e di protezione sull'endotelio, ma non necessariamente meno importanti: le HDL presentano anche attività antitrombotiche e anti-infettive. Per quanto riguarda la prima, quella antitrombotica è una proprietà che potenzia la loro capacità protettiva nei confronti degli eventi cardiovascolari occlusivi dovuti all'aterosclerosi; questa loro attività si avvale di due differenti meccanismi: da un lato, le HDL inibiscono l'attivazione piastrinica, un effetto dimostrato dalla loro capacità di inibirne l'aggregazione indotta da agonisti, di ridurre la degranolazione, il legame al fibrinogeno e la sintesi di trombossano A<sub>2</sub> [60], mentre dall'altro bloccano la coagulazione, inibendo i fattori X, VIIa e VIIIa [3]. Questi effetti sembrano essere mediati dal recettore SR-BI e dal recettore per la ApoE, che determinano attivazione della protein-chinasi C e alcalinizzazione del citoplasma delle piastrine [3; 60]. Inoltre, grazie all'enzima PAF-AH, inibiscono l'effetto di stimolazione dell'aggregazione piastrinica dovuto al PAF [56].

L'attività anti-infettiva si esplica mediante la capacità delle HDL di legare e inibire il lipopolisaccaride (LPS) batterico, e di convogliarlo al fegato dove può essere rimosso dal circolo: ciò si traduce in una ridotta endotossinemia e nella riduzione della risposta cellulare all'LPS, mediata dalla ApoA-I [53]. Inoltre, una particolare sottoclasse di HDL presenta azione litica nei confronti dei tripanosomi, e questa attività anti-elmintica

è catalizzata da complessi proteici comprendenti ApoL-I, la proteina legante l'emoglobina, la proteina correlata all'aptoglobina, ApoA-I, ApoA-II, ApoC-I, ApoC-II e ApoC-III [61].

### **3.6. HDL e aterosclerosi**

Il rapporto tra HDL e aterosclerosi non può essere compreso solamente alla luce delle concentrazioni plasmatiche di HDL-c, ma è necessario studiare la relazione funzionale tra HDL e placca aterosclerotica, analizzando come le funzioni fisiologiche delle HDL intervengano all'interno del complesso sviluppo delle lesioni ateromatose. L'aterosclerosi risulta da una complessa interazione tra fattori circolanti e vari tipi cellulari residenti all'interno della parete arteriosa, stimolata da una esposizione cronica del vaso ad alcuni fattori patogenetici, tra i quali un ruolo di fondamentale importanza nell'inizio e nella progressione dello sviluppo delle lesioni aterosclerotiche è attribuito alle LDL [62]. La figura 5 presenta un quadro riassuntivo delle tappe fondamentali dello sviluppo delle lesioni aterosclerotiche, e rappresenta anche le funzioni antiossidanti che le HDL svolgono nel rallentare tali processi. Il momento patogenetico iniziale sembra risiedere in una alterata permeabilità dell'endotelio alle LDL normali, le quali iniziano così a penetrare all'interno dello spazio subendoteliale; perché si verifichi questa migrazione sono necessari due fattori: la disfunzione endoteliale, che aumenta la permeabilità dell'endotelio alle LDL, e concentrazioni plasmatiche elevate e sostenute nel tempo di LDL, ed in particolare si crede che possa essere in particolare la ApoB responsabile di tale danno all'endotelio [63]. La disfunzione endoteliale consiste in un'alterata risposta vasodilatatoria a stimoli come l'acetilcolina, dovuta ad una ridotta sintesi e rilascio di ossido nitrico, che si verifica in molte condizioni patologiche e che,



**Fig 5.** Aterosclerosi e danno ossidativo. L'endotelio danneggiato permette l'ingresso delle LDL, le quali sono arricchite di lipidi ossidati ("molecole insemenzanti") (1), all'interno dello spazio subendoteliale (A), dove restano legate dai glicosamminoglicani della matrice extracellulare (B); successivamente le LDL insemenzate vanno incontro ad un'ulteriore ossidazione (2) da parte di sostanze ossidanti e lipidi ossidati; infine, ormai massivamente ossidate, sono sottoposte a ossidazione non enzimatica (3) che le rende capaci di innescare la fase cellulare dell'aterosclerosi. Le LDL insemenzate che non sono legate alla matrice possono fuoriuscire dallo spazio subendoteliale (C) e spostarsi in un punto differente della parete vasale (D). Le HDL fisiologiche sono in grado di bloccare ognuno dei tre passaggi fondamentali del danno ossidativo responsabile dello sviluppo dell'aterosclerosi (-). (Modificato da Navab et al, J. Lipid Res. 2000. 41: 1495-1508)

nel caso dell'aterosclerosi, può instaurarsi secondariamente a livelli elevati e sostenuti nel tempo di LDL [64]; una volta penetrate all'interno dello spazio subendoteliale, le LDL sono destinate a rimanervi a causa di due processi, che avvengono sequenzialmente: dapprima l'interazione con i glicosamminoglicani della matrice extracellulare, e successivamente la loro fagocitosi da parte di macrofagi attivati e di cellule muscolari lisce migrate dalla tonaca media [62]. Il legame delle LDL alla matrice extracellulare determina il loro intrappolamento all'interno della parete del vaso, e permette l'azione di sostanze ossidanti, enzimi proteolitici, lipolitici ed idrolitici che trasformano le LDL in LDL ossidate (oxLDL) e LDL aggregate (agLDL), le quali costituiscono il principale ligando di recettori espressi da macrofagi e cellule muscolari lisce, rispettivamente dei recettori CD36, della famiglia dei recettori *scavenger*, e dei recettori LRP1, della famiglia dei recettori delle LDL (LDL-R) [64]. L'ossidazione delle LDL è una tappa fondamentale nella patogenesi dell'aterosclerosi, ed avviene secondo gradi successivi di modificazione ossidativa delle lipoproteine, articolati in almeno tre stadi [66; 67]: il primo avviene prima che le LDL penetrino all'interno della parete vasale o durante questo passaggio, e consiste in un "inseminamento" da parte di specie reattive dell'ossigeno (ROS) che generano lipidi ossidati all'interno delle LDL, in particolare HPODE e HPETE, metaboliti dell'acido linoleico e arachidonico rispettivamente, e idroperossidi di colesterolo; il secondo passaggio consiste nel trasferimento delle LDL "inseminate" attraverso l'endotelio disfunzionante all'interno dello spazio sub-endoteliale, dove si verifica un'ulteriore ossidazione dei lipidi del *core*, resa possibile dalla presenza di HPODE e HPETE che stimolano l'ossidazione delle LDL, legate alla matrice extracellulare, da parte delle cellule presenti nello spazio subendoteliale; l'ultimo passaggio consiste nella ossidazione massiva delle LDL, che avviene all'interno della parete vasale quando viene raggiunta una concentrazione di sostanze pro-ossidanti tale da innescare l'ossidazione non enzimatica dei lipidi. Questi

tre passaggi successivi sono i responsabili dell'ossidazione delle LDL, un passaggio centrale nel successivo sviluppo delle lesioni aterosclerotiche; infatti, mentre fino ad adesso la patogenesi delle lesioni vasali ha riconosciuto una genesi puramente biochimica, da questo punto in poi gli attori principali dello sviluppo dell'aterosclerosi saranno le cellule. Infatti, l'ossidazione massiva rende le oxLDL e le agLDL capaci di indurre fagocitosi e la risposta infiammatoria all'interno delle lesioni aterosclerotiche [66]; parallelamente anche i fosfolipidi, quando ossidati in un particolare atomo di carbonio, possono innescare e mantenere la reazione infiammatoria all'interno dello spazio subendoteliale [11]. L'internalizzazione delle LDL modificate determina l'accumulo di colesterolo all'interno di macrofagi e cellule muscolari lisce, che per l'aspetto vacuolato che assumono vengono dette "cellule schiumose"; queste cellule innescano una risposta infiammatoria all'interno della parete vasale portando all'espressione di citochine ed altri fattori chemiotattici che determinano l'ingresso di monociti, i quali si differenziano in macrofagi, e altre cellule immunitarie che perpetuano la risposta infiammatoria [64]. Questo continuo richiamo di cellule immunitarie innesca un circolo autorigenerante che determina maggiore ossidazione delle LDL e ulteriore formazione di cellule schiumose, le quali tendono ad aumentare la componente infiammatoria, che perpetua il ciclo. Si formano così le lesioni aterosclerotiche più precoci, che vengono dette "strie lipidiche" ("*fatty streaks*"), ripiene di cellule schiumose, quindi ricche di colesterolo e lipidi, e di cellule immunitarie; in questa fase anche le cellule muscolari lisce giocano un ruolo importante, poichè sono responsabili non solo dell'accumulo di colesterolo trasformandosi in cellule schiumose, ma sono anche responsabili della progressione delle lesioni verso la formazione della cosiddetta "placca": migrando nello spazio sub endoteliale, acquisendo un fenotipo proliferativo e sintetizzante, sono responsabili della deposizione di tessuto connettivo e

fibroso [62] all'interno e all'esterno della placca, in base alla cui quantità si distinguono, nei riguardi di rotture acute, placche di differenti tipi e stabilità.

Le HDL presentano, nei confronti dell'aterosclerosi, capacità protettive pleiotropiche, che possono essere distinte in quattro gruppi: trasporto inverso del colesterolo, proprietà antiossidanti e anti-infiammatorie, azione sulla funzione endoteliale, azione anti-trombotica. Considerando la natura prevalentemente ossidativa della fase biochimica dello sviluppo delle lesioni ateromatose, si crede che le HDL debbano la gran parte del loro potere anti-aterogenico alle loro funzioni antiossidanti [11]; la loro azione antiossidante si esplicherebbe a livello di ciascuno dei tre passaggi di ossidazione delle LDL che portano alla formazione delle oxLDL che innescano e mantengono la risposta infiammatoria [66; 67]. Le proprietà antiossidative della ApoA-I, rimuovendo le molecole "inseminzanti", quindi riducendo l'ossidazione intravascolare, permettono di rendere le LDL resistenti alla "seconda" ossidazione, quella all'interno dello spazio sub endoteliale; in particolare è stato dimostrato che le HDL prendono su di se HPODE ed HPETE, rimuovendole dalle LDL [66]. L'incubazione di colture di arterie umane con HDL previene l'ossidazione delle LDL all'interno della cocoltura, e ciò significa che le HDL sono in grado di prevenire anche il secondo passaggio ossidativo, un'osservazione confermata dalla misurazione dei lipidi ossidati presenti all'interno delle LDL; infine, PON1 è in grado di inibire il terzo passaggio, prevenendo l'ossidazione ulteriore delle LDL modicamente ossidate a oxLDL [64; 66].

Un'altra proprietà protettiva nei confronti dell'aterosclerosi che possiedono le HDL è quella anti-infiammatoria: è stato dimostrato che le HDL sono in grado di ridurre l'espressione di molecole di adesione come ICAM-1 e VCAM-1, riducendo così la diapedesi e quindi il passaggio di cellule immunitarie all'interno delle lesioni, infatti sono stati osservati gradi minori di infiltrazione neutrofila all'interno di lesioni

aterosclerotiche [58]; si crede tuttavia che buona parte degli effetti anti-infiammatori siano secondari all'effetto antiossidante [11]. Le HDL inoltre sembrano ridurre la sintesi delle principali citochine infiammatorie al livello della parete arteriosa, come  $TNF\alpha$  e  $IL1\beta$  [62], e sono in grado anche di sopprimere l'espressione di molecole di adesione come la E-selectina in risposta alla  $IL-1\alpha$  [64]. In conclusione, le HDL interromperebbero quel circolo vizioso di produzione di ossidanti, stimolazione della risposta infiammatoria, e produzione di nuovi ossidanti da parte delle cellule infiammatorie, che caratterizza la progressione della lesione iniziale verso la placca vera e propria, rallentando così la progressione dell'aterosclerosi. Per quanto riguarda l'ultimo gruppo di proprietà anti-ateromasiche delle HDL, cioè la loro influenza sulla funzionalità endoteliale, vi sono evidenze di azioni pleiotropiche sull'endotelio indipendentemente dalle azioni antiossidante ed anti-infiammatoria: innanzitutto le HDL presentano una capacità vasodilatante mediata dall'ossido nitrico, di cui queste lipoproteine ne stimolano direttamente la sintesi, e aumentano la risposta vasodilatatoria nelle arterie di maggiore calibro al NO [58]; non è chiaro se questo meccanismo sia da mettere in relazione principalmente con il recettore SR-B1 oppure se è dipendente dall'interazione di lisofosfolipidi come S-1-P con specifici recettori. Inoltre, accanto al loro effetto sul rilascio di ossido nitrico, le HDL stimolano anche la sintesi e il rilascio di prostaciclina attivando la ciclossigenasi endoteliale [68]: in questo modo le HDL preverrebbero l'instaurarsi della disfunzione endoteliale, la condizione che aumentando la permeabilità dell'endotelio alle LDL, ne permette l'ingresso all'interno dello spazio sub-endoteliale. La riparazione dell'endotelio danneggiato avverrebbe o attraverso la stimolazione diretta della proliferazione di cellule endoteliali, o grazie ad un reclutamento di progenitori midollari delle cellule endoteliali, e sarebbero corresponsabili del rallentamento dell'evoluzione a placca aterosclerotica [62; 64].

Infine, le proprietà anti-trombotiche delle HDL risultano rilevanti nel ridurre l'adesione e attivazione piastrinica in caso di rottura di placca.

L'attività antiaterosclerotica delle HDL si avvale di numerose loro funzioni, tuttavia considerando la genesi primariamente ossidativa dell'aterosclerosi, possiamo dire che la maggior parte dell'effetto protettivo delle HDL si esplica grazie alle loro proprietà antiossidanti, essendo capaci di bloccare le fasi più precoci di sviluppo dell'aterosclerosi. Le pleomorfe proprietà ateroprotettive delle HDL qui esposte, dimostrate in soggetti sani, non sono pienamente efficaci in pazienti affetti da malattie come diabete, complicanze cardiovascolari acute, sindrome metabolica, in cui le HDL sarebbero quindi disfunzionanti [62; 67].

#### **4. HDL disfunzionanti**

La “ipotesi funzioni delle HDL”, supportata in particolare dagli studi di Voight et al [34] e di Khera et al [38], ha definitivamente soppiantato la cosiddetta “ipotesi HDL”, per cui risulta informativa la funzionalità, piuttosto che la quantità, di HDL, nata dall'osservazione che la funzionalità delle HDL fosse variabile [68]. Era stato dimostrato che durante la risposta di fase acuta, quindi dopo stress chirurgici o durante stati infiammatori acuti, le funzioni fisiologiche delle HDL venivano perse, o addirittura potevano divenire pro-infiammatorie [69]. Successivamente questa osservazione fu estesa da infiammazioni acute a condizioni infiammatorie croniche, e fu dimostrato che in corso di infiammazione, sia di fase acuta sia cronica, le proprietà fisiologiche delle



HDL vengono perse, potendo essere rimpiazzate da proprietà pro-infiammatorie [70]. Venne coniato il termine di “HDL disfunzionanti” [69], che sono cioè incapaci di svolgere le loro funzioni fisiologiche, e che guadagnano invece proprietà pro-infiammatorie; la loro caratterizzazione è ancora in via di definizione, poiché molti quesiti restano tutt’ora senza risposta. In questo capitolo sarà mostrata una panoramica sulle attuali conoscenze circa la disfunzione delle HDL.

#### **4.1. Condizioni cliniche associate ad HDL disfunzionanti**

La disfunzione delle HDL è presente in tutte le condizioni in cui uno stato infiammatorio sistemico altera le loro funzioni fisiologiche [71]; la risposta di fase acuta consiste in una reazione infiammatoria sistemica a insulti di tipo infettivo e non infettivo di distruzione tissutale, ed è mediata da adattamenti fisiologici multipli, tra i quali spicca la modificazione del pattern di sintesi proteica epatica, con aumento sostanziale della sintesi e rilascio in circolo di proteine dette per l’appunto “proteine di fase acuta”; questa condizione, a discapito del nome, può diventare cronica, conducendo così ad una disfunzione permanente delle HDL. La relazione tra stato infiammatorio e disfunzione delle HDL è stata studiata e confermata in numerose condizioni cliniche, caratterizzate da una significativa infiammazione sistemica, come la convalescenza post-chirurgica, le infezioni acute, ma anche condizioni in cui l’infiammazione sistemica tende a diventare cronica, come nel diabete, nelle coronaropatie, nella sindrome metabolica. Anche il fumo di sigaretta è associato a disfunzione delle HDL [72]. Inizialmente lo stato infiammatorio acuto che determina disfunzione delle HDL è stato studiato in corso di infezioni acute e stress chirurgico, sia in modelli animali che in umani; sia nel coniglio che nell’uomo, dopo interventi di cardiocirurgia la funzionalità

delle HDL nell'inibire la migrazione dei monociti non solo si riduce, ma tra secondo e terzo giorno dopo l'intervento, cioè nel momento di massima attivazione della risposta di fase acuta, addirittura l'aggiunta delle HDL alla cocoltura di endotelio e monociti aumentava la tras migrazione, ovvero effetto pro-infiammatorio [69]. Più recentemente è stata testata anche l'infezione da HIV, ed in uno studio del 2011 è stato dimostrato che in pazienti sottoposti a terapia anti-retrovirale efficace nel mantenere soppressa la viremia, nonostante il contenimento dell'infezione le HDL hanno funzioni pro-infiammatorie. Infatti, le HDL, anziché ridurla come farebbero in soggetti normali, stimolavano la sintesi di molecole di adesione per monociti su colture di endotelio umano, indicando così che le HDL in corso di infezione da HIV sono disfunzionanti [73]. Anche malattie reumatologiche nella loro fase attiva costituiscono condizioni cliniche in cui l'imponente infiammazione sistemica determina disfunzione delle HDL: è stato dimostrato che le HDL rallentano l'ossidazione delle LDL, e che questa proprietà è rimpiazzata dalla capacità di aumentare l'ossidazione delle LDL in pazienti affetti da lupus eritematoso sistemico e artrite reumatoide [74], rendendo forse conto dell'accelerata aterosclerosi che è riportata in soggetti affetti da queste patologie. Anche le sindromi coronariche acute sono caratterizzate da elevati indici di infiammazione e da disfunzione delle HDL [75] e l'insufficienza cardiaca [76]

Anche condizioni di infiammazione cronica meno eclatante sono associate a disfunzione delle HDL, prime tra tutte le coronaropatie: l'aterosclerosi, come le altre malattie cardiovascolari, si associa a livelli cronicamente elevati di PCR [49], costituendo quindi una condizione di infiammazione sistemica cronica, e anche in assenza di eventi acuti che possano giustificare una risposta infiammatoria acuta, è caratterizzata da HDL disfunzionanti. Infatti le HDL di pazienti con coronaropatia, non fumatori, non

dislipidemici e in assenza di altri fattori acuti di disfunzione, mostrano proprietà pro-infiammatorie [11], conducendo così ad un circolo vizioso.

Nei soggetti obesi le HDL risultano disfunzionanti, poiché l'intero metabolismo delle lipoproteine è profondamente alterato, sia da alterazioni primarie del metabolismo dei lipidi, sia secondariamente da alterazioni del metabolismo del glucosio e dell'omeostasi calorica; i livelli elevati di trigliceridi che si riscontrano sia a digiuno, sia soprattutto nel periodo post-prandiale, si associano ad elevate concentrazioni di LDL, VLDL e chilomicroni, che competono per gli enzimi lipolitici, i quali risultano invece difettivi, a causa del fatto che le elevate concentrazioni plasmatiche di acidi grassi liberi determinano il distacco dall'endotelio della lipoprotein-lipasi: ciò causa competizione per gli stessi enzimi tra chilomicroni, post-prandiali, e le VLDL che sono costantemente iperrappresentate [77]. La conseguenza è, oltre agli altri deleteri effetti metabolici dell'obesità, un aumento dei livelli di LDL piccole e dense dall'elevato potere pro-aterogenico, a causa della ridotta lipolisi, dell'attivazione di CETP e della ridotta captazione tissutale ed epatica di VLDL e chilomicroni; l'attivazione di CETP in presenza di ipertrigliceridemia determina accumulo di trigliceridi all'interno delle HDL e impoverimento di esteri del colesterolo e fosfolipidi. Queste modificazioni della componente lipidica si riflettono in una ridotta affinità della ApoA-I per le particelle di HDL, dalle quali si distacca, riducendo infine i livelli di HDL totali, che associate alle loro ridotte funzioni biologiche, aumentano significativamente il rischio cardiovascolare [77].

La sindrome metabolica è una condizione patologica caratterizzata da insulino-resistenza, dislipidemia pro-aterogenica, obesità centrale, ipertensione e elevato rischio cardiovascolare [78]; in soggetti affetti da tale sindrome è stato riscontrato uno stato di stress ossidativo, e le HDL che sono associate a bassi livelli di HDL-c, risultano

disfunzionanti: le loro proprietà antiossidanti sono significativamente ridotte, in particolare le sottoclassi che normalmente presentano questa proprietà maggiormente rispetto alle altre, cioè le HDL3a, HDL3b e HDL3c [79]. Inoltre le HDL prelevate da soggetti affetti da sindrome metabolica presentano ridotta capacità citoprotettiva nei riguardi dell'endotelio, risultando meno efficaci rispetto ai controlli nell'inibire l'apoptosi [80]. Similmente, ma con un rischio assai più elevato, le HDL risultano disfunzionanti nel diabete mellito: la combinazione di alterazioni del metabolismo del glucosio, del metabolismo del colesterolo e dei trigliceridi, di stress ossidativo e di iperglicemia cronica determinano alterazioni strutturali e funzionali delle HDL che le rendono incapaci di svolgere le funzioni antiossidanti, sia per disfunzione della ApoA-I che per riduzione dell'attività della PON1 [81]; conseguentemente risultano ridotte anche le loro funzioni anti-infiammatorie [82]. In corso di diabete, inoltre, l'insulino-resistenza e l'ipertrigliceridemia determinano aumento dell'attività di CETP che aumenta il contenuto di trigliceridi delle HDL, le quali grazie al potenziamento dell'attività della lipasi epatica da parte dell'iperglicemia cronica, vanno incontro a idrolisi accelerata, con produzione di HDL piccole e dense che vanno rapidamente incontro a clearance [83], riducendone così drasticamente i livelli circolanti.

Anche in corso di insufficienza renale cronica in stadio terminale, in cui il rischio cardiovascolare è fortemente aumentato dalla copresenza di dislipidemia, stato ossidativo e pro-infiammatorio sistemico cronico, le HDL mostrano, indipendentemente da una riduzione dell'HDL-c, una disfunzione significativa [84], confermata da studi di proteomica che ne hanno confermato modificazioni di struttura compatibili con proprietà biologiche disfunzionanti [85].

## 4.2. Generazione di HDL disfunzionanti

Considerando le condizioni cliniche nel corso delle quali si riscontrano HDL disfunzionanti, sono state indagate alcune plausibili cause di disfunzione delle HDL, con risultati variabili; l'attenzione è stata posta soprattutto sugli effetti dell'infiammazione sulle proteine e sui lipidi delle HDL, quindi sul danno ossidativo e sulla modificazione da parte di enzimi espressi da cellule infiammatorie; inoltre è stato proposto anche un ruolo per la glicosilazione non enzimatica delle HDL nella genesi della loro disfunzione. Alcuni esperimenti su roditori e su umani in cui l'endotossinemia induceva disfunzione delle HDL e loro alterazioni strutturali [86] hanno definitivamente confermato il ruolo dell'infiammazione nella genesi di HDL disfunzionanti, e nel complesso i meccanismi che sono stati proposti possono essere classificati in quattro gruppi:

1) **Danno ossidativo diretto.** Le HDL sono state trattate in vitro con agenti fortemente ossidanti, ed è stata testata successivamente la loro capacità antiossidante e anti-infiammatoria, le quali risultavano significativamente ridotte. Sono stati fatti tentativi di ossidazione tramite LDL fortemente ossidate che contengono radicali liberi [87] e ossidazione mediante solfato di rame [88], ossidazione tramite esposizione ad un ossidante sintetico, la AAPH [50]. I metodi di ossidazione utilizzati sono, essendo saggi in vitro, particolarmente attivi nell'ossidare le HDL, probabilmente molto più aggressivi rispetto ai fisiologici stimoli ossidativi a cui vanno incontro le lipoproteine in condizioni fisiologiche, per cui sono solo parzialmente utili per comprendere la genesi *in vivo* di HDL disfunzionanti.

2) **Modificazioni indotte dalle proteine di fase acuta.** L'ingente sintesi epatica di proteine di fase acuta in risposta a citochine infiammatorie circolanti determina

modificazioni strutturali della componente proteica e lipidica delle HDL, grazie sia alle modificate concentrazioni di queste proteine, sia alla loro elevata affinità per le HDL; in particolare la proteina siero-amiloide A (SAA), la (sPLA<sub>2</sub>-IIA) e la ceruloplasmina si accumulano all'interno delle HDL riducendo così il contenuto di proteine normalmente presenti come ApoA-I e PON1 [69; 89].

3) **Modificazioni enzimatiche.** Nel corso della risposta di fase acuta si assiste ad un'attivazione massiccia di alcune attività enzimatiche da parte delle cellule immunitarie coinvolte nella risposta infiammatoria, che possono attivarsi anche nei confronti delle HDL, che in questo modo andrebbero incontro a disfunzione. Tre enzimi in particolare, che sono sintetizzati in grande quantità durante la risposta di fase acuta, sono stati riconosciuti coinvolti nella disfunzione delle HDL: la chimasi-tripasi ed altri enzimi proteolitici, che degradando probabilmente i residui C-terminali della ApoA-I ne impedisce il corretto legame con ABCA1, con il risultato di ridurre sensibilmente l'efflusso cellulare di colesterolo e fosfolipidi verso le pre $\beta$ 1-HDL [17]; il secondo enzima è la lipasi endoteliale, che determina interessanti alterazioni nella composizione lipidica e nella carica elettrica globale delle HDL, e ne riduce sensibilmente la capacità di indurre l'efflusso cellulare di colesterolo mediato da SR-BI [90]. L'importanza di queste modificazioni in vivo non è stata ancora provata. L'importanza del terzo enzima nella disfunzione delle HDL è sostenuta invece da più evidenze, secondo le quali vi sarebbe una effettiva relazione con le HDL in vivo: la mielo-perossidasi o MPO, la cui funzione in vivo è stata testata grazie al rilievo di residui amminioacidici ossidati all'interno della ApoA-I di HDL disfunzionanti in vivo, generate da ossidanti derivati dall'ossido nitrico e dall'alogenazione catalizzata dalla MPO [53, 91].

4) **Glicosilazione non enzimatica.** L'incubazione di HDL in mezzo acquoso altamente e persistentemente iperglicemico determina glicosilazione non enzimatica

delle proteine e generazione di lipoperossidi, la cui entità è direttamente correlata all'entità e durata dell'iperglicemia e all'attività della PON1: una ridotta attività di questo enzima infatti determina maggiore suscettibilità allo sviluppo di perossidi secondariamente alla glicosilazione, e questa attività sembra essere ulteriormente ridotta da prolungate esposizioni al glucosio [92].

Complessivamente non è nota in vivo la relativa importanza dei singoli meccanismi di generazione di HDL disfunzionanti individuati, ed è possibile che agiscano di concerto in differenti condizioni cliniche; in particolare i primi tre meccanismi, cioè l'ossidazione diretta, la modificazione enzimatica e le modificazioni indotte dalle proteine di fase acuta, sono meccanismi generali presenti in ogni stato infiammatorio acuto o cronico, mentre la glicosilazione sembrerebbe limitata agli stati iperglicemici cronici.

### **4.3. Alterazioni strutturali**

Le HDL durante infiammazione presentano alcune modificazioni strutturali che ne riflettono le alterate funzioni biologiche, tanto che è stato coniato il termine "HDL di fase acuta" [69], caratterizzate da modifiche sia nella composizione proteica sia in quella lipidica, e il loro ruolo nel determinare modificazioni funzionali non è chiarito, ma l'analisi delle modifiche strutturali può condurci ad una migliore comprensione sia delle cause, sia delle conseguenze, della disfunzione delle HDL.

In condizioni infiammatorie il contenuto di ApoA-I delle HDL si riduce [69], sia per ridotta sintesi epatica della proteina a causa della ingente sintesi di proteine di fase acuta, sia per arricchimento delle HDL di altre apoproteine che determinano la rimozione delle ApoA-I. La principale apoproteina di cui si arricchiscono le HDL è la SAA [93], una proteina di fase acuta i cui livelli durante l'infiammazione acuta possono

aumentare fino a cento volte i valori basali, sotto lo stimolo di citochine infiammatorie come IL-1, TNF $\alpha$ , IL-6 [70]; la SAA possiede numerose attività anti-infiammatorie, dirette e indirette, che risultano fondamentali durante le risposte di fase acuta, ma se la sua sintesi resta elevata in modo persistente, si verifica il suo accumulo nei tessuti determinando l'insorgenza di amiloidosi AA, ed inoltre si crede che abbia anche un ruolo nello sviluppo dell'aterosclerosi [94]. La SAA presenta una particolare affinità per le HDL, in particolare le HDL3, in cui determina aumento del diametro medio delle particelle, riduzione del contenuto di ApoA-I e probabilmente interferisce con le funzioni degli enzimi LCAT e CETP [95]. Il legame della SAA alle HDL, di cui può arrivare a costituirne fino all'88% della componente proteica totale, determina quindi riduzione della quantità di ApoA-I all'interno delle HDL, e di conseguenza ne aumenta la concentrazione plasmatica come proteina libera, una condizione confermata anche in pazienti con malattia coronarica e HDL disfunzionanti, in cui sia la PCR sia la SAA risultano essere marker predittivi di malattia [94]. Altre due proteine di fase acuta, la lipasi endoteliale e la sPLA<sub>2</sub>-IIA, modificano la composizione delle HDL, idrolizzando preferenzialmente fosfolipidi e determinando sia la riduzione dei livelli di HDL-c, sia la riduzione dell'attività e della massa totale della CETP, mantenendo però il rapporto HDL-c/CETP inalterato, riflettendo quindi probabilmente una riduzione del numero totale di particelle di HDL [96]. Anche la ceruloplasmina si localizza all'interno delle HDL durante la fase acuta, e questo fatto determina una ridotta capacità delle HDL di ridurre l'ossidazione delle oxLDL [69]. L'arricchimento di proteine di fase acuta determina riduzione del contenuto di altre proteine oltre alla già citata ApoA-I: si ha infatti una riduzione dell'attività della PON1 [93], che potrebbe rendere conto delle ridotte capacità antiossidanti delle HDL disfunzionanti. La ApoC-III è una apolipoproteina che si trova normalmente all'interno delle lipoproteine ricche di trigliceridi, e che può essere scambiata da queste alle HDL durante la lipolisi: un



aumentato e anormale arricchimento di ApoC-III delle HDL è associato a aumentato rischio di sviluppare aterosclerosi [97], rendendo le HDL disfunzionanti riducendone le funzioni anti-aterosclerotiche [98]. Inoltre, durante stati infiammatori importanti, all'interno della componente proteica delle HDL risultano significativamente aumentate le quantità relative di fattori del complemento, apoJ,  $\alpha_1$ -antitripsina, serpina e catene pesanti delle immunoglobuline [99]. Oltre alla presenza di proteine differenti dalla normalità che si aggiungono e spiazzano le proteine normalmente presenti, si ha anche modificazione delle proteine native: l'ossidazione della ApoA-I da parte della MPO determina riduzione significativa dell'RCT e della sintesi di ossido nitrico, alterazioni che risultano correlate tra loro in pazienti affetti da malattia coronarica [44]. La glicosilazione non enzimatica della ApoA-I ne riduce l'affinità per i lipidi e ne riduce l'attività antiossidante [83].

Le modificazioni della componente lipidica sono più difficilmente studiabili rispetto a quelle della componente proteica, e per questo motivo vi sono minori quantità di informazioni al riguardo; le HDL prelevate da pazienti con malattia aterosclerotica e infiammazione presentano aumentati livelli di fosfatidilcolina, liso-fosfatidilcolina, fosfatidil-etanolamina e di prodotti alogenati della fosfatidil-etanolamina [53]; inoltre si riconosce una riduzione della quantità totale di esteri di colesterolo e un arricchimento del *core* di trigliceridi rispetto alle HDL normali [79], un effetto da attribuire forse alla presenza di proteine e di lipidi differenti dalla norma. Interessante risulta l'analisi delle alterazioni strutturali lipidiche nelle differenti sottoclassi di HDL in presenza di dislipidemie, poiché nella maggior parte dei casi queste alterazioni si associano a disfunzione; in condizioni di ipertrigliceridemia pura o mista le HDL tendono ad accumulare trigliceridi e a impoverirsi di colesterolo, ma nonostante queste modificazioni tendano a ridurre la densità delle lipoproteine, in generale si osserva un

aumento della quota di HDL disfunzionanti appartenenti alla classe di HDL piccole e dense, probabilmente conseguenza di una ridotta efficacia dell'RCT che non permette una normale maturazione verso le HDL più grandi e meno dense [100].

Le modificazioni strutturali esposte in questo paragrafo sono correlate con la ridotta funzionalità delle HDL, ma occorre sottolineare che vi sono alcuni limiti nello stabilire questa relazione diretta: innanzi tutto la correlazione causa-effetto tra modificazione strutturale e modificazione della funzione biologica della particella di HD non sempre è così netta; secondariamente occorre considerare che le modificazioni individuate solo in alcuni studi sono riferibili a particolari sottoclassi di HD, mentre nella maggior parte non viene fatta questa differenza, perdendo così la possibilità di individuare sottoclassi mutate e che presentano alterazioni di specifiche attività biologiche, da altre modificazioni che avvengono contemporaneamente all'interno delle altre sottoclassi. Sarebbe interessante poter separare le differenti frazioni di HDL e studiarne le singole e specifiche modificazioni strutturali e funzionali, un approccio sicuramente più complesso, ma certamente più proficuo nella comprensione delle HDL disfunzionanti.

#### **4.4. Alterazioni funzionali**

Le HDL disfunzionanti si definiscono proprio per la loro ridotta o assente capacità ateroprotettiva, che deriva da una riduzione più o meno equivalente di tutte le funzioni tipiche delle HDL fisiologiche; risulta quindi carente non solo l'RCT, ma anche le loro funzioni antiossidante, anti-infiammatoria e protettiva sull'endotelio.

L'RCT appare ridotto in condizioni di infiammazione importante come nelle fasi attive dell'artrite reumatoide [53], e ciò è da ricondurre a modificazioni plurime dei suoi componenti e meccanismi; innanzi tutto la composizione lipidica e proteica delle HDL,

modificata rispetto alle condizioni fisiologiche, determina ridotto efflusso di colesterolo da parte dei tessuti periferici; a ciò si aggiunge una ridotta espressione di ABCA1 da parte dei macrofagi attivati [18] e un ridotto *uptake* epatico delle HDL ricche in SAA e povere di ApoE [69], determinando così riduzione della quantità di colesterolo e fosfolipidi trasportati dalle HDL disfunzionanti e un loro aumento del tempo di permanenza in circolo. Ciò che determina ridotto efflusso cellulare di colesterolo è da ascrivere sia a modificazioni della componente proteica, sia a modificazioni di quella lipidica [101]: l'ossidazione della ApoA-I da parte della MPO determina riduzione dell'affinità per ABCA1 e quindi ridotto efflusso [44], e parimenti una riduzione dell'RCT è stata associata all'arricchimento delle HDL di trigliceridi e ad un impoverimento di alcuni fosfolipidi, condizioni che determinano anche modifiche nella distribuzione delle differenti sottoclassi di HDL [102]. Alla modificazione funzionale delle HDL contribuisce anche una modificazione del metabolismo, in particolare una ridotta attività dell'enzima CETP [103]. La riduzione dell'RCT tuttavia sembra rivestire un ruolo minore nella disfunzionalità delle HDL, rispetto alle altre funzioni lese; infatti la riduzione dell'entità dell'RCT sembra essere minima, mentre in altri casi l'RCT sembra essere normale [104]. La riduzione dell'attività della PON1 dimostrata nei pazienti con aterosclerosi complicata rispetto ai controlli [87] si associa ad un incremento di addotti di MDA-lisina all'interno delle HDL, i quali inducono nelle cellule endoteliali l'attivazione della protein-chinasi C beta III (PKC $\beta$ III) attraverso il recettore LOX-1: questa serie di modificazioni funzionali si traduce in una ridotta attivazione della eNOS endoteliale [44], suggerendo così un ruolo per le HDL disfunzionanti nella genesi o nell'aggravamento della disfunzione endoteliale. Modifiche della composizione in fosfolipidi delle HDL determinano modificazioni delle loro proprietà anti-infiammatorie sull'endotelio [55], perciò è probabile che le modificazioni che sono state riscontrate nel lipidoma delle HDL si associ a loro

disfunzione, in particolare a ridotte capacità anti-infiammatorie. Le HDL disfunzionanti prelevate da pazienti con malattia renale cronica e psoriasi presentano ridotte capacità di ridurre l'espressione di molecole di adesione e di ridurre la secrezione di citochine da parte dei leucociti, e che addirittura diventino pro-infiammatorie quando sono arricchite di SAA nello stadio di uremia terminale [53]. HDL provenienti da pazienti con malattia coronarica stabile o acuta riducono invece che aumentare il rilascio di ossido nitrico da parte dell'endotelio, e perdono la capacità di promuovere la proliferazione delle cellule endoteliali nelle zone di endotelio danneggiato [44]. La glicosilazione non enzimatica, infine, della ApoA-I, si associa a ridotta attività antiossidante della ApoA-I e a ridotta affinità per i lipidi, ma anche a ridotta attività di PON1 e di LCAT; le conseguenze consistono in una riduzione sia delle capacità antiossidanti, sia di quelle anti-infiammatorie, sia dell'RCT, il quale risulta alterato e ridotto [83].

#### **4.5. Un ruolo fisiologico per le HDL disfunzionanti**

Le modificazioni a cui vanno incontro le HDL durante l'infiammazione sono correlate con una riduzione delle loro funzioni ateroprotettive e all'assunzione di un fenotipo pro-infiammatorio e pro-aterogenico, e questa condizione si verifica in tutti i soggetti così come in molte altre specie di mammiferi: sembra verosimile quindi che questa risposta integrata allo stato infiammatorio non sia una risposta puramente patologica, ma che verosimilmente possa essere considerata un meccanismo adattativo alle *noxae* patogene, che in relazione all'evento stressante costituisce un vantaggio per l'organismo, ma che come in tutti i casi di cronicizzazione di un meccanismo adattativo o compensatorio, ciò si tramuti a lungo tempo in un effetto negativo [105]. La ricerca del significato adattativo delle "HDL di fase acuta" si è indirizzata verso l'effetto della modificazione

del metabolismo del colesterolo sulla risposta cellulare innata dell'inflammatione, dimostrando che le HDL disfunzionanti possono essere utili all'immunità e alla riparazione tissutale nei siti di inflammatione. Le HDL arricchite di SAA presentano affinità per il recettore SR-BI epatico due volte minore rispetto alle HDL fisiologiche, e parallelamente sviluppano una affinità per i macrofagi attivati da tre a quattro volte maggiore rispetto alle HDL normali, mentre i recettori per le HDL si riducono a livello epatico ed aumentano sui macrofagi attivati [106]: questi dati suggeriscono che la riduzione quantitativa dell'RCT dai tessuti periferici al fegato potrebbe non rispecchiare una riduzione assoluta del trasporto di colesterolo da parte delle HDL, ma si potrebbe verificare un rimodellamento plastico delle vie dell'RCT, con trasporto preferenziale di colesterolo e fosfolipidi ai macrofagi presenti nei siti di inflammatione. Questo dato ha generato due tipi di interpretazione: la prima considera il re-indirizzamento di pre-β-HDL modificate create dall'interazione tra SAA e sPLA<sub>2</sub>-IIA verso i macrofagi attivati, determinando così un aumento preferenziale dell'RCT nei tessuti infiammati [96]; l'altra, più accreditata, considera invece il trasporto delle HDL nei siti di inflammatione come meccanismo per rifornire i tessuti danneggiati, in via di rigenerazione, di materiale lipidico e proteico in modo tale da favorire la guarigione [91]. Queste due interpretazioni renderebbero conto sia del motivo finalistico della generazione delle "HDL di fase acuta", che giocherebbero cioè un ruolo positivo nella risoluzione dell'inflammatione e nella guarigione dei tessuti danneggiati, sia spiegherebbe come queste HDL di fase acuta si possano trasformare in HDL disfunzionanti in condizioni cliniche in cui vi sia una condizione infiammatoria persistentemente elevata: il meccanismo adattativo, diventando cronico, determina deposizione incontrollata di colesterolo non soltanto nei tessuti danneggiati, ma anche nei tessuti sani, e questa caratteristica spiegherebbe l'attività pro-aterogena osservata nelle HDL disfunzionanti presenti in condizioni cliniche di inflammatione cronica. Nonostante sia una ipotesi

interessante, non vi sono attualmente dati che la confermino, per cui questa interpretazione resta puramente speculativa.

Considerando le conoscenze attualmente acquisite circa le HDL disfunzionanti, risulta sempre più chiara l'importanza che riveste e che rivestirà la determinazione della causa e dei modi di disfunzione di queste lipoproteine e le dirette conseguenze funzionali; riuscire a mettere a punto metodi che permettano di avere una stima della funzionalità delle HDL potrebbe permettere di definire il rischio residuo e poter così inquadrare più realisticamente il rischio cardiovascolare globale dei singoli pazienti, e successivamente individuare nuove strategie di prevenzione e cura dell'aterosclerosi.

## **5. Metodi per valutare le proprietà antiossidanti delle HDL**

La valutazione delle proprietà antiossidanti delle HDL ha sempre rappresentato una sfida per la ricerca sulla funzionalità di queste lipoproteine, poiché la messa a punto di metodi semi-quantitativi per la misura della funzione antiossidante incontra difficoltà di tipo metodologico. Sono stati messi a punto metodi cellulari, lunghi e indaginosi, e metodi biochimici, i quali invece rappresentano i primi tentativi di rendere la valutazione delle proprietà antiossidanti delle HDL più specifici, più facilmente attuabili, più veloci e più affidabili rispetto ai test cellulari.

## **5.1. Metodi cellulari**

Il metodo storicamente utilizzato per la valutazione delle proprietà antiossidanti e anti-infiammatorie delle HDL è detto “Monocyte Chemoattractant Assay” (MCA), ovvero “Saggio della chemoattrazione di monociti” [107]: esso prevede l’allestimento di una cocoltura di cellule muscolari lisce e di cellule endoteliali in modo da formare un modello di parete arteriosa; successivamente la cocoltura viene esposta a ox-LDL e viene misurata la quantità di monociti che vengono attratti dall’endotelio attivato. L’aggiunta delle HDL riduce sia l’effetto dello stimolo ossidativo sull’attivazione endoteliale, sia riduce la chemiotassi dei monociti direttamente [108]. Questo metodo costituisce quindi più che un modello dell’interazione tra ox-LDL e HDL, mediata dall’espressione, da parte delle cellule endoteliali, della proteina MCP-1 che determina richiamo dei monociti [109], un saggio sulle proprietà anti-infiammatorie delle HDL.

## **5.2. Metodi biochimici**

I metodi biochimici, meglio conosciuti come “acellulari”, rappresentano il tentativo di rendere il saggio MCA più specifico nei confronti della funzione antiossidante e di renderlo più semplice e di più rapida esecuzione. Sono stati proposti due metodi, entrambi utilizzando un fluorocromo la cui ossidazione, creando il segnale fluorescente, costituisce lo standard ossidativo pari a 1: ogni eventuale riduzione di questa ossidazione viene interpretata come attività antiossidante. Il primo metodo acellulare proposto è stato quello del DCF (Di-Cloro-Fluoresceina) [110], il quale prevedeva l’utilizzo del fluorocromo DCF per valutare la capacità delle HDL di ridurre l’ossidazione di tale molecola da parte di lipidi ossidati. Un metodo di più recente introduzione, ideato da Kelesidis e colleghi nel 2011 [111] prevede l’utilizzo della DHR

(di-idro-rodamina) la quale se ossidata viene convertita a rodamina, una molecola fluorescente nelle lunghezze d'onda del verde; l'ossidazione della DHR in rodamina viene presa come standard di ossidazione, così la capacità delle HDL di rallentare tale velocità di ossidazione può essere misurata ed espressa come capacità antiossidante. Vi sono alcune limitazioni metodologiche al metodo [112], ma ciò non ne inficia la validità e lo rende potenzialmente capace di dare una stima quantitativa delle proprietà antiossidanti delle HDL.

### **5.3. Il metodo di partenza**

Il metodo che abbiamo applicato e successivamente messo a punto è quello di Kelesidis et al [111], che costituisce l'attuale standard di riferimento per la valutazione delle proprietà antiossidanti delle HDL; riassumiamo qui il metodo sperimentale originale che abbiamo applicato e successivamente modificato.

**Preparazione del tampone.** HEPES privo di ioni ferro (N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid) è stato preparato disciogliendo in acqua distillata HEPES e NaCl in modo da avere concentrazioni rispettivamente di 20 mM e 150 mM; la soluzione è stata portata a pH 7,4 aggiungendo NaOH 0,01 mM e portata a volume. Successivamente venivano aggiunte le resine Chelex-100 e desferoxamina; agitatore magnetico per 60 min; infine la soluzione veniva filtrata a vuoto.

**Precipitazione delle ApoB e diluizione del siero depleto di ApoB.** Abbiamo aggiunto al siero *beads* magnetiche di destran-solfato in proporzione 200 µl di siero/40 µl di *beads*; l'abbiamo sottoposta a vortex e a centrifugazione 3000 rpm per 10 minuti a 4°C. È stato rimosso il sovrantante e, al fine di ottenere la concentrazione di HDL-c di 0,1 µg/



µl, ogni campione è stato diluito con HEPES sulla base del dosaggio dell'HDL-c nel siero depleto di ApoB.

**Preparazione DHR.** La di-idrorodamina 123 (DHR) è stata preparata come aliquote di 6 µl ciascuna in dimetilsolfossido, alla concentrazione di 50 mM e conservata in freezer a -20°C; veniva diluita 1:1000 in HEPES al momento dell'utilizzo per creare una soluzione 50 µM.

**Preparazione della piastrina.** Per la lettura della fluorescenza sono state utilizzate piastrine da 96 pozzetti in plastica nera; ogni campione, così come il blank e la DHR, sono stati testati in tripla copia. Ogni pozzetto aveva volume totale di 200 µl, ed erano composti come segue: i pozzetti blank 200 µl di tampone HEPES. Pozzetti DHR 175 µl di tampone HEPES e 25 µl di soluzione 50 µM di DHR in HEPES. Pozzetti con i campioni di siero erano composti da 150 µl di tampone HEPES, 25 µl di campione diluito, 25 µl di soluzione 50 µM di DHR in HEPES.

**Dosaggio HDL-c; Lettura fluorescenza.** vedi § *Materiali e Metodi*.

# **MESSA A PUNTO DI UN METODO PER LA VALUTAZIONE DELLE PROPRIETA' ANTIOSSIDANTI DELLE HDL**

## **1. Scopo della tesi**

Abbiamo applicato un metodo biochimico fluorimetrico proposto da Kelesidis et al [111] per la valutazione delle proprietà antiossidanti delle HDL, ma nelle nostre condizioni sperimentali il metodo risultava poco sensibile e riproducibile. Abbiamo quindi implementato tale metodo rivalutandone e perfezionandone ogni passaggio in modo tale da renderlo più sensibile, riproducibile e affidabile, fino ad ottenere condizioni ottimali dal punto di vista analitico. Con l'obiettivo di avere un riscontro clinico abbiamo testato il siero di 108 soggetti tra sani e pazienti affetti da condizioni cliniche note per essere associate a HDL disfunzionanti, afferenti alla clinica della Medicina III Universitaria ad Indirizzo Metabolico. Questi dati preliminari dovranno essere confermati successivamente su popolazioni più numerose.

## **2. Materiali e metodi**

### **2.1. Protocollo sperimentale**

*Preparazione del tampone.* HEPES privo di ioni ferro (N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid) è stato preparato disciogliendo in acqua distillata HEPES e NaCl in modo da avere concentrazioni rispettivamente di 20 mM e 150 mM; la soluzione è stata portata a pH 7,4 aggiungendo NaOH 0,01mM e portata a volume.

*Preparazione della DHR.* La di-idrorodamina 123 (DHR) è stata preparata come aliquote di 6 µl ciascuna in dimetilsolfossido, alla concentrazione di 50 mM e conservata in freezer a -20°C; veniva diluita 1:500 in HEPES al momento dell'utilizzo per creare una soluzione 100 µM.

*Precipitazione delle ApoB e diluizione del siero depleto di ApoB.* Il siero, separato da sangue intero collezionato in provette vacuum con cloth-activator e sottoposto a centrifugazione 3000 rpm per 10 minuti a 4°C, è stato conservato in freezer a -20°C. La separazione è effettuata aggiungendo al siero il PEG (Poly-Etilene Glycole) 630 MDa in proporzione 200 µl di siero/50 µl di PEG; la soluzione veniva sottoposta a vortex e lasciata riposare in frigorifero a 4°C per 20 min e successivamente sottoposta a centrifugazione 3000 rpm per 10 minuti a 4°C. Il sovrantante, rimosso stando attenti a non disturbare il pellett, veniva diluito al fine sulla base del dosaggio dell'HDL-c di ottenere la concentrazione di HDL-c di 0,1 µg/ µl. Per le diluizioni è stata impiegata una soluzione di HEPES e PEG con lo stesso rapporto impiegato tra siero e PEG per le operazioni di precipitazione delle ApoB.

*Preparazione della piastrina.* Per la lettura della fluorescenza sono state utilizzate piastre da 96 pozzetti in plastica nera; ogni campione, così come il blank e la DHR,

sono stati testati in triplicato. Ogni pozzetto aveva volume totale di 175  $\mu$ l, ed erano composti come segue: i pozzetti blank, ovvero il controllo negativo, 175  $\mu$ l di tampone HEPES; i pozzetti DHR erano composti da 125  $\mu$ l di tampone Hepes, 25  $\mu$ l di diluente PEG, 25  $\mu$ l di soluzione AAPH 1 mM in HEPES, 25  $\mu$ l di soluzione 1:500 di rodamina in HEPES; i pozzetti con i campioni di siero erano composti da 125  $\mu$ l di tampone Hepes, 25  $\mu$ l di campione diluito, 25  $\mu$ l di soluzione 1 mM di AAPH in Hepes, 25  $\mu$ l di soluzione 1:500 di rodamina in Hepes. L'AAPH è stato inserito in tutti i pozzetti in con pipette multicanale subito prima di inserire la DHR, in modo da ridurre il più possibile il tempo di persistenza dell'AAPH in assenza di rodamina. La DHR veniva immessa con la stessa modalità, subito prima di inserire la piastrina nel lettore di fluorescenza.

***Lettura fluorescenza.*** Le piastrine sono state incubate a 37°C per 60 minuti durante i quali veniva misurata l'intensità di fluorescenza ad un lettore di piastra settata ad una lunghezza d'onda di 485 nm e un'emissione d'onda di 530 nm, con misurazioni ogni 2 minuti.

***Analisi effettuate.*** Colesterolo totale, LDL-c, HDL-c, trigliceridi, omocisteina, acido urico, HbA1c, PCR, ApoA, ApoB, Lp(a) sono stati dosati con metodiche standard di chimica clinica presso il laboratorio centrale. Il dosaggio del HDL-c sul siero depleto di ApoB è stato effettuato con un analizzatore di chimica clinica (SYNCHRON-CX4, Beckman).

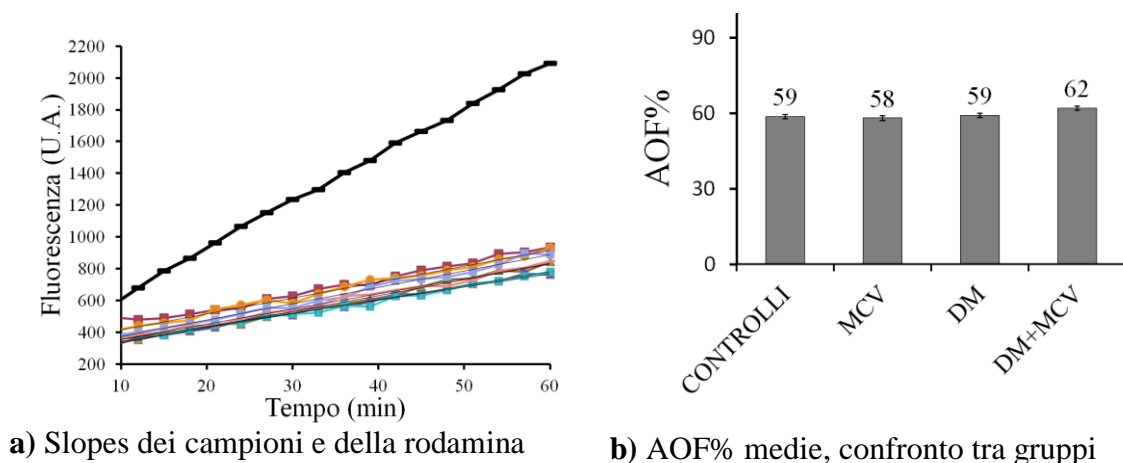
## 2.2. Analisi matematiche e statistiche

La velocità di ossidazione della DHR a rodamina è stata calcolata misurando la pendenza della retta di regressione lineare del grafico fluorescenza-tempo, ed è stata indicata con *slope*; il rapporto tra la slope di un campione e la slope della DHR della stessa piastra è espresso come *DOR* (DHR Oxidation Rate); la funzione antiossidante delle HDL è stata espressa come AOF% (Anti-Oxidant Function %) calcolata sottraendo la DOR all'unità ( $1 - DOR$ ), ed esprimendo questa differenza in percentuale. I valori delle variabili in esame, quando non altrimenti specificato, sono presentati come media e deviazione standard. Sono state usate analisi di regressione e correlazione standard; per il confronto tra gruppi è stata usata l'analisi ANOVA. Le analisi sono state condotte utilizzando il programma JMP® 9 (SAS Institute, Cary, NC).

### 3. Risultati

#### 3.1. Applicazione del metodo

Abbiamo applicato il metodo di Kelesidis et al [111] su un campione di 82 soggetti afferenti alla clinica della Medicina Generale III Universitaria ad Indirizzo Metabolico: i risultati hanno rivelato una scarsa sensibilità del metodo, poiché i valori di slopes erano molto simili tra di loro, quindi le curve risultavano appiattite (fig. 6a). Abbiamo suddiviso i soggetti in quattro gruppi in base alla patologia: controlli, non diabetici con malattia cardiovascolare (MCV), diabetici (DM) e diabetici con malattia cardiovascolare (DM+MCV); confrontando le AOF% medie dei quattro gruppi si conferma la bassa sensibilità, poiché i valori non sono significativamente diversi: controlli =  $59 \pm 5$ ; MCV =  $58 \pm 12$ ; DM =  $59 \pm 12$ ; DM+MCV =  $62 \pm 14$  (fig. 6b).



**Fig. 6.** Applicazione del metodo originale. (a) Slopes dei campioni: non si notano differenze significative (in nero la DHR; le linee colorate corrispondono alle velocità di ossidazione del siero di alcuni pazienti) (b) AOF% medie dei quattro gruppi: non sono significativamente differenti.

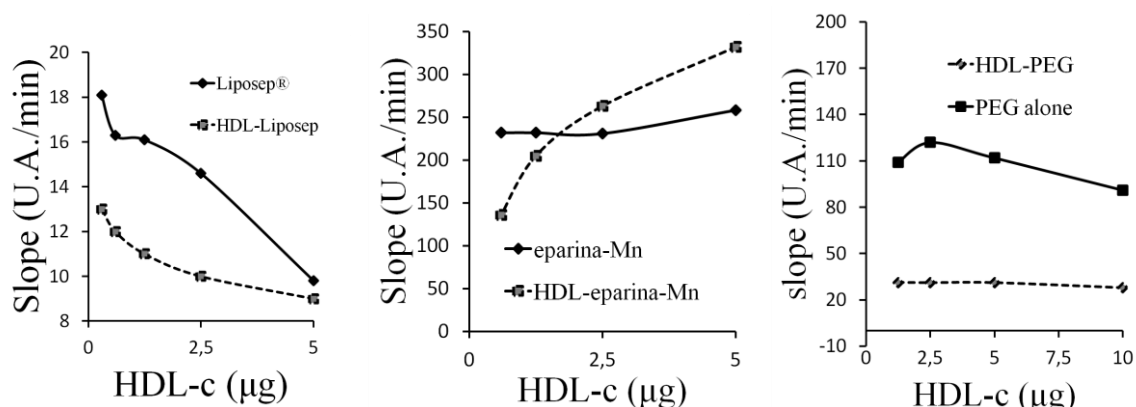
### 3.2. Modifiche al metodo

Il metodo dunque non risultava sufficientemente sensibile, per cui abbiamo deciso di riesaminarne ogni singolo passaggio al fine di aumentarne la sensibilità e rendendolo ripetibile e affidabile.

***Precipitazione delle ApoB*** (fig. 7). La precipitazione delle ApoB, per la separazione delle HDL, può essere eseguita utilizzando numerosi metodi che abbiamo testato e confrontato tra loro per individuare quello migliore per questo saggio. L'utilizzo di un anticorpo monoclonale anti-ApoB (Liposep®) non è risultato adatto per il motivo che presentava un potere antiossidante aspecifico, proporzionale alla concentrazione (fig. 7a); al contrario il metodo dell'eparina-manganese determinava un effetto pro-ossidante paradossale tale da introdurre un errore eccessivo nella misurazione, per cui è stato scartato (fig. 7b); il metodo che abbiamo scelto è quello del PEG (Poly-Ethilen Glycole), poiché è efficace nella precipitazione delle ApoB e, nelle condizioni sperimentali, alle concentrazioni di HDL-c utilizzate nel protocollo non influenza significativamente l'ossidazione della DHR (fig. 7c). Abbiamo individuato il rapporto siero/PEG che permette la separazione più efficace, che corrisponde a 200 µl di siero più 50 µl di PEG 500 mg/dl.

***Utilizzo di una soluzione diluente contenente PEG.*** La precipitazione delle ApoB richiede l'aggiunta di una quantità precisa di PEG al siero; nel momento in cui ciascun siero viene diluito per raggiungere la concentrazione di HDL-c di 0,1 µg/µl, la concentrazione di PEG diviene differente per ciascun campione sulla base della concentrazione di HDL-c. Ciò può introdurre un errore perché, nonostante l'effetto del PEG sulla velocità di ossidazione della DHR sia minimo, esso è comunque presente. Per ovviare a questo fattore di confondimento, abbiamo deciso di disciogliere il PEG

all'interno della soluzione diluente, alla stessa concentrazione presente nel siero depleto di ApoB. Ciò elimina le variazioni di concentrazione di PEG dovute alle differenti diluizioni. Per uniformare al massimo le condizioni sperimentali, anche i pozzetti con sola DHR (in assenza di campione) sono addizionati con la stessa soluzione, al fine di renderla confrontabile con i campioni.



**a)** Liposep®, curva dose-risposta

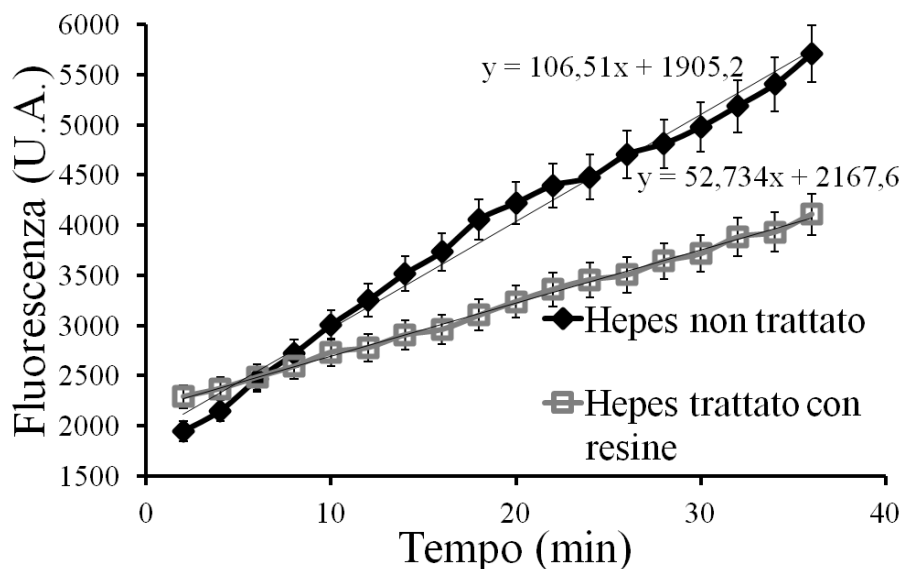
**b)** Eparina-Manganese, curva dose-risposta

**c)** PEG, curva dose-risposta

**Fig. 7.** Metodi per la precipitazione delle ApoB. **a)** curva dose-risposta Liposep®: aumentando la concentrazione di precipitatore, sia in presenza che in assenza di HDL, si ha una riduzione significativa della fluorescenza, indice di un potente effetto antiossidante aspecifico; **b)** curva dose-risposta eparina-manganese (linea continua): non presenta effetto significativo sulla slope; al contrario la diluizione scalare delle HDL separate con questo stesso metodo (linea tratteggiata) presenta un effetto pro-ossidante paradossale, con aumento della slope al crescere della quantità di HDL-c aggiunta; **c)** curva dose-risposta PEG: nelle nostre condizioni sperimentali non influenza significativamente la slope della rodamina e non crea interferenze tra HDL separate con questo metodo e ossidazione della DHR.



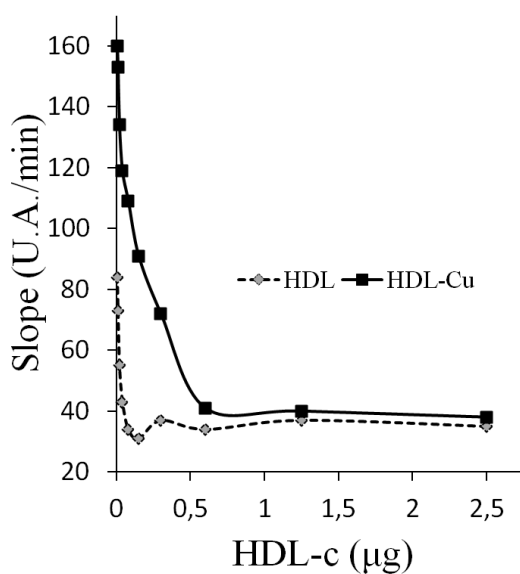
**Tampone** (fig. 8). Per aumentare la pendenza della retta di ossidazione della DHR abbiamo modificato il tampone, lasciando in soluzione ioni metallici invece che rimuovendoli mediante trattamento con resine Chelex-100 e desferoxamina: utilizzando HEPES non trattato con le resine la pendenza media della rodamina si innalza notevolmente, circa del 200%.



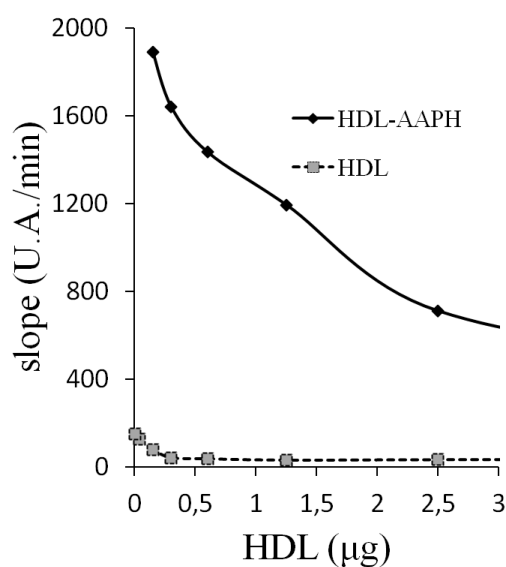
**Fig. 8.** Modifica del tampone. *Utilizzando il tampone hepes trattato con resine la rodamina presenta pendenza di 52,73 U.A./min; utilizzando hepes non trattato con resine la pendenza della rodamina risulta pari a 106,51 U.A./min.*

**Diluizione DHR.** Aumentando la concentrazione della DHR in HEPES da 50  $\mu\text{M}$  a 100  $\mu\text{M}$  di la velocità di ossidazione della DHR aumentava significativamente, quindi aveva una maggiore *slope* e il metodo guadagnava in sensibilità; aumentando ulteriormente la concentrazione di DHR non abbiamo osservato nessun ulteriore aumento della sensibilità.

**Test di stimolo** (fig 9). Al fine di stressare il sistema per renderlo più sensibile abbiamo deciso di inserire un generatore di radicali liberi che stimolasse l'ossidazione: abbiamo testato sia il rame-ione ( $\text{Cu}^{++}$ ) sia la AAPH. Il rame  $5 \mu\text{M}$  aumentava la slope media da  $79 \text{ U.A./min}$  a  $99,85 \text{ U.A./min}$ , con un incremento del  $126,39 \%$  (FIG. 9a); la AAPH  $1 \text{ mM}$  aveva un effetto significativamente maggiore, aumentando la slope media da  $79 \text{ U.A./min}$  a  $1957,30 \text{ U.A./min}$  con un incremento del  $2477,59 \%$  (fig. 9b).



**a)** test di stimolo con rame

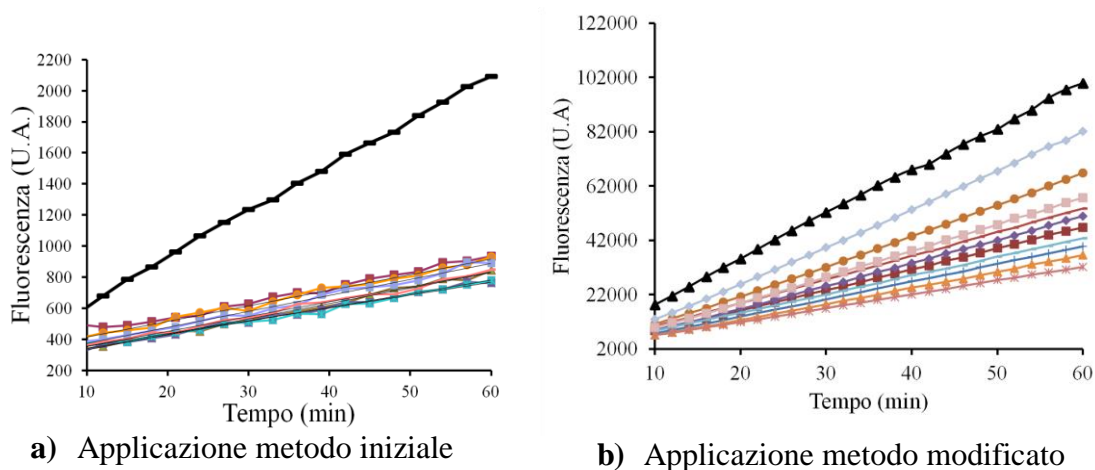


**b)** test di stimolo con AAPH

**Fig. 9.** Test di stimolo. **a)** test di stimolo con rame ( $\text{Cu}$ ): l'utilizzo di rame  $5 \mu\text{M}$  determina aumento delle slopes medie del  $126,39 \%$ . **b)** test di stimolo con AAPH: l'utilizzo di una soluzione  $1 \text{ mM}$  di AAPH in hepes ha determinato l'aumento delle slopes medie del  $2477 \%$  rispetto al test eseguito in assenza di AAPH. (curve continue: ossidazione con AAPH; curve tratteggiate: ossidazione all'aria).

L'applicazione del metodo così implementato ha riscontrato un effettivo aumento della sensibilità complessiva del metodo, un parametro deducibile dalla aumentata variabilità intercampiono, dai maggiori valori assoluti di fluorescenza, dalla maggiore e più

costante fluorescenza iniziale, così come dalle slope significativamente più elevate (fig. 10).



**Fig. 10.** Applicazione del metodo originale vs applicazione del nuovo metodo. *Come è possibile notare in particolare dalla variabilità delle pendenze delle rette di regressione lineare e dai valori assoluti di fluorescenza, il metodo da noi modificato (b) presenta una maggiore significatività rispetto al metodo applicato inizialmente (a). (Linea nera: rodamina; linee colorate: campioni)*

### 3.3. Dati preliminari di validazione del metodo

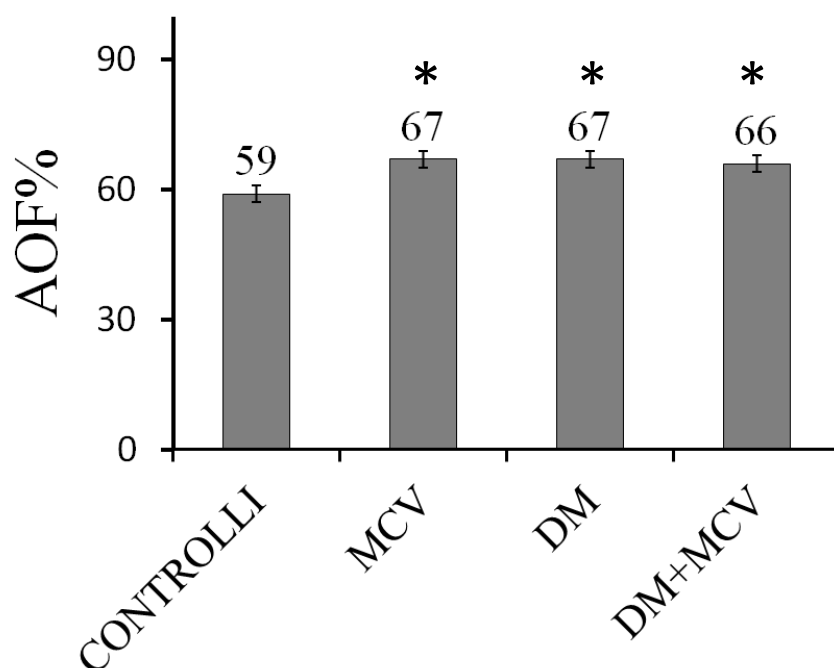
**Soggetti dello studio** (Tab. 1). Lo scopo di questa analisi preliminare è quello di verificare la sensibilità del metodo in vista di una futura validazione su campioni di più larga scala. Abbiamo testato il siero congelato di 108 soggetti afferenti alla clinica della Medicina III Universitaria ad Indirizzo Metabolico, suddivisi nei seguenti quattro gruppi: controlli, non diabetici con malattia cardiovascolare (MCV), diabetici (DM),

diabetici con malattia cardiovascolare (DM+MCV). Le caratteristiche cliniche e di laboratorio dei pazienti sono riportate nella tabella 1.

	<b>Controlli</b>	<b>MCV</b>	<b>DM</b>	<b>DM+MCV</b>	
<b>n</b>	25	20	34	29	
<b>Età (anni)</b>	58 ± 8	63 ± 9	<b>62 ± 9</b>	<b>66 ± 7</b>	*
<b>BMI (Kg/m<sup>2</sup>)</b>	26 ± 4	28 ± 4	<b>29 ± 5</b>	<b>29 ± 5</b>	*
<b>HbA1c (%)</b>	5,3 ± 1,2	5,84 ± 0,25	<b>7,55 ± 1,10</b>	<b>7,38 ± 2,00</b>	*
<b>Colesterolo Tot. (mg/dl)</b>	209 ± 37	<b>151 ± 27</b>	<b>189 ± 34</b>	<b>162 ± 45</b>	*
<b>LDL-c (mg/dl)</b>	130 ± 34	<b>89 ± 23</b>	<b>120 ± 30</b>	<b>98 ± 30</b>	*
<b>HDL-c (mg/dl)</b>	60 ± 12	<b>42 ± 9</b>	<b>48 ± 11</b>	<b>45 ± 10</b>	*
<b>Trigliceridi (mg/dl)</b>	128 ± 62	134 ± 65	128 ± 66	<b>133 ± 42</b>	*
<b>ApoA (mg/dl)</b>	161 ± 26	<b>134 ± 23</b>	<b>141 ± 23</b>	<b>136 ± 18</b>	*
<b>ApoB (mg/dl)</b>	95 ± 25	<b>74 ± 18</b>	<b>93 ± 20</b>	<b>83 ± 24</b>	*
<b>Lp(a) (mg/dl)</b>	14 ± 12	<b>29 ± 32</b>	22 ± 26	24 ± 29	*
<b>Omocisteina (mg/dl)</b>	9,0 ± 5,7	8,6 ± 3,6	8,8 ± 3,3	10,1 ± 4,2	
<b>PCR (pg/dl)</b>	0,29 ± 0,40	0,24 ± 0,31	0,25 ± 0,39	0,84 ± 2,77	
<b>Acido Urico (mg/dl)</b>	4,5 ± 1,3	<b>6,1 ± 1,2</b>	<b>5,6 ± 1,1</b>	<b>5,9 ± 1,2</b>	*
<b>Pressione Sist (mmHg)</b>	130 ± 14	133 ± 15	140 ± 31	140 ± 19	
<b>Pressione Diast (mmHg)</b>	78 ± 11	77 ± 15	81 ± 20	77 ± 17	
<b>AOF%</b>	59 ± 8	<b>67 ± 8</b>	<b>67 ± 6</b>	<b>66 ± 8</b>	*

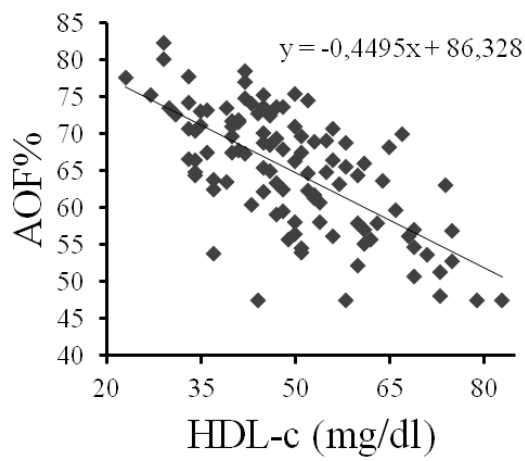
**Tab. 1.** Caratteristiche dei soggetti per i dati preliminari suddivisi nei quattro gruppi studiati. I valori sono espressi come media ± deviazione standard. In grassetto sono evidenziati i dati significativamente differenti dai controlli; l'asterisco si riferisce ad una significatività di  $p < 0,05$ . (MCV = malattie cardiovascolari; DM = diabete mellito).

**Confronto AOF% tra gruppi** (fig. 11). Abbiamo confrontato la AOF% media dei quattro gruppi: la AOF% media del gruppo dei controlli (AOF%<sub>m</sub> = 59% ± 8%) risulta inferiore rispetto ai gruppi di pazienti, e tale differenza è altamente significativa ( $p < 0,0001$ ); tra i tre gruppi di pazienti invece le medie sono confrontabili (MCV = 67% ± 8%, DM = 67% ± 6%; DM+MCV = 66% ± 7%,  $p < 0,002$ ).



**Fig. 11.** AOF% media, confronto tra gruppi. *Controlli AOF%<sub>m</sub> = 59%, n = 25; Malattia Cardiovascolare (CVD) AOF%<sub>m</sub> = 67%, n = 20; Diabete Mellito (DM) AOF%<sub>m</sub> = 67%, n = 34; Diabetici con malattia cardiovascolare (DM+CVD) = AOF%<sub>m</sub> = 66%, n = 29. I valori segnati con \* sono significativamente maggiori rispetto al gruppo dei controlli (p < 0,0001).*

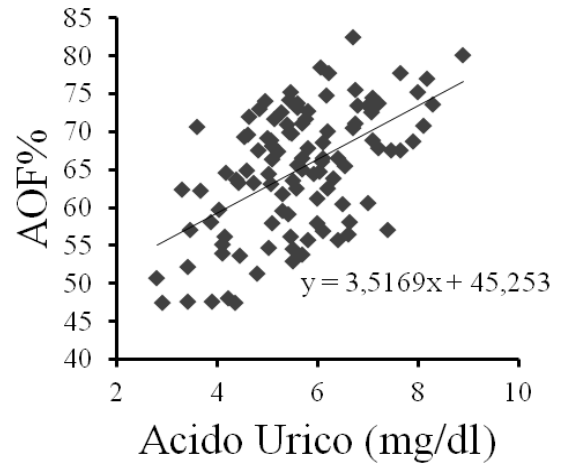
**Correlazioni** (fig. 12). Abbiamo notato che la AOF% è strettamente correlata alla concentrazione plasmatica di HDL-c, con una relazione inversa ( $y = -4495x + 86,328$ ;  $r = 0,67$ ;  $p < 0,0001$ . Fig. 12a). Inoltre la concentrazione sierica di acido urico correla con la AOF%, con relazione diretta ( $y = 3,5169x + 45,253$ ;  $r = 0,54$ ;  $p < 0,0001$ . Fig. 12b).



**a)** Correlazione tra AOF% e HDL-c

$$r = 0,67$$

$$p < 0,0001$$



**b)** Correlazione tra AOF% e acido urico

$$r = 0,54$$

$$p < 0,0001$$

**Fig. 12.** Correlazioni. **a)** Correlazione tra AOF% e HDL-c; **b)** correlazione tra AOF% e acido urico.

## 4. Discussione

Le proprietà antiaterosclerotiche delle lipoproteine ad alta densità (HDL) non sono legate esclusivamente alla loro concentrazione plasmatica; è stato dimostrato, infatti, che le HDL possiedono una notevole variabilità di funzione che si associa ad alterazioni della struttura e/o della composizione biochimica [38-41]. Queste funzioni delle HDL, strettamente collegate alle loro proprietà antiaterosclerotiche, sono state riscontrate alterate in condizioni patologiche quali la malattia cardiovascolare, il diabete, l'artrite reumatoide e in generale si associano a condizioni di infiammazione cronica e aumentato stress ossidativo [67-87]. E' stato proposto che le alterazioni delle proprietà delle HDL possano essere responsabili dell'eccesso di rischio cardiovascolare non spiegato dai tradizionali fattori di rischio e che interventi mirati al ripristino di tali proprietà possano ridurre la progressione della malattia aterosclerotica [21-30]. Di conseguenza metodi di valutazione delle proprietà biologiche di queste lipoproteine rivestiranno sempre maggiore importanza [107], e tra le proprietà fisiologiche delle HDL quelle antiossidanti rivestono un ruolo di primo piano [50]. Abbiamo applicato il metodo biochimico fluorimetrico per la valutazione delle proprietà antiossidanti delle HDL proposto da Kelesidis et al. [111], il quale, nelle nostre condizioni sperimentali, risultava poco sensibile e poco riproducibile: l'ossidazione della DHR in rodamina presentava *slopes* decisamente basse, per cui le differenze interindividuali di AOF% risultavano appiattite (fig. 6a), ed inoltre le AOF% medie dei quattro gruppi studiati erano pressoché identiche nonostante le differenti condizioni cliniche (fig. 6b). Il metodo non risultava sufficientemente sensibile, per cui abbiamo deciso di riesaminare ogni singolo passaggio del metodo, valutando e comparando per ciascuno eventuali alternative, individuando le modificazioni efficaci nel renderlo più sensibile.

Inizialmente per la precipitazione delle ApoB utilizzavamo *beads* magnetiche di destran-solfato, ma poiché sono state messe fuori commercio, abbiamo dovuto cambiare metodo; storicamente la precipitazione delle ApoB può essere attuata secondo differenti metodi [113]: abbiamo testato e confrontato tre metodi alternativi di precipitazione delle ApoB per individuarne uno che non introduca *bias* nel metodo. L'agente precipitante "ideale" non dovrebbe influire sull'ossidazione della DHR, perciò la curva dose-risposta dovrebbe essere il più possibile piatta, o almeno, se con pendenza negativa, con valore assoluto basso. Il metodo di precipitazione utilizzando il Liposep®, un anticorpo monoclonale diretto contro le ApoB, presentava un elevato e aspecifico potere antiossidante che rendeva la AOF% dipendente dalla diluizione del separatore (fig. 7a), per cui non poteva essere utilizzato. Il metodo dell'eparina-manganese non è stato ugualmente utilizzabile perché la soluzione precipitante creava interazioni importanti con l'ossidazione della DHR (fig. 7b); è probabile che questa interazione sia secondaria all'effetto pro-ossidante del manganese sulle HDL. Infine, il metodo che utilizza il PEG è stato ritenuto idoneo perché nelle nostre condizioni sperimentali non introduce *bias* all'interno del test (fig. 7c): per di più la concentrazione di PEG è stata resa costante grazie alla soluzione diluente, perciò risulta indipendente dalla diluizione del siero.

Le modifiche sopra esposte non hanno risolto il problema della sensibilità; tutti i nostri sforzi successivi sono stati tesi all'aumento della velocità di ossidazione della DHR per poter essere in grado di discriminare maggiormente differenze interindividuali di AOF%. Inizialmente lavoravamo con tampone trattato con resine per rimuovere eventuali ioni metallici che, fungendo da ossidanti, potessero introdurre errori; abbiamo pensato che lasciando in soluzione gli ioni metallici questi potessero agire come stimolatori dell'ossidazione aumentando le *slopes* senza interferire negativamente con il saggio. Abbiamo avuto conferma di questa previsione perché non trattando il tampone



con le resine abbiamo ottenuto velocità di ossidazione raddoppiate (fig. 8) e ciò non introduce errori: in assenza di ioni metallici il metodo non era in grado di creare un ambiente sufficientemente ossidante. Confortati da questo risultato, abbiamo deciso di apportare una seconda modifica, che riguarda la concentrazione di DHR: aumentandola da 50  $\mu\text{M}$  a 100  $\mu\text{M}$  abbiamo osservato un ulteriore aumento della sua velocità media di ossidazione. Ciò si spiega in chiave cinetica, poichè aumentando il numero di molecole presenti la DHR è adesso in grado di ossidarsi in condizioni di eccesso di substrato, quindi alla massima velocità. Aumentando ulteriormente la concentrazione di DHR non abbiamo notato nessun ulteriore aumento della sensibilità.

Il metodo ha così guadagnato in sensibilità dall'effetto sinergico di due modificazioni volte all'aumento della velocità di ossidazione. Tuttavia questo aumento di sensibilità non ci è sembrato sufficiente perché ancora il rapporto rumore di fondo/segnale era elevato, per cui abbiamo pensato di inserire un test di stimolo: creando un ambiente fortemente ossidante, il test di stimolo ha la capacità di stressare il sistema, evidenziando maggiormente eventuali proprietà antiossidanti delle componenti presenti, nel nostro caso le HDL. Abbiamo deciso di utilizzare l'AAPH, una molecola organica di sintesi capace di generare radicali liberi in modo costante, senza interagire con altre molecole. L'introduzione del test di stimolo ha permesso di aumentare di più di venti volte la velocità media di ossidazione della DHR (fig. 9b).

Con l'introduzione del test di stimolo abbiamo raggiunto delle condizioni ideali dal punto di vista analitico (fig. 10), e soddisfatti della sensibilità raggiunta dal metodo così implementato, abbiamo deciso di testare una popolazione di 108 soggetti per produrre dati preliminari, in attesa di una validazione più accurata su di una casistica più ampia. Le caratteristiche dei soggetti studiati sono riassunte nella tabella 1. Lo scopo di questo test è quello di valutare le proprietà antiossidanti delle HDL, cioè dare una stima

quantitativa delle capacità antiossidanti di queste lipoproteine, al fine di contribuire alla definizione del rischio aterogenico; il valore che abbiamo individuato è stato chiamato AOF%, ed esprime la percentuale di riduzione dell'ossidazione che le HDL svolgono nei confronti della DHR. Il significato clinico di tale indice dovrebbe essere quello di marcatore precoce di aterosclerosi, poiché la disfunzione delle HDL si instaura precocemente durante la storia naturale di questa malattia, e non progredisce ulteriormente [62; 68; 91]. Di conseguenza ci aspetteremmo che il gruppo dei controlli abbia AOF% mediamente maggiore, cioè HDL mediamente più antiossidanti, mentre i pazienti appartenenti agli altri tre gruppi presentino AOF% media più bassa, e abbiano cioè HDL disfunzionanti. Con nostra grande sorpresa i risultati si sono rivelati opposti rispetto alle aspettative: ovvero i tre gruppi di pazienti presentano AOF% media più alta rispetto ai controlli, e tale differenza è significativa ( $p < 0,002$ ), mentre le medie dei tre gruppi sono tra loro confrontabili (fig. 11). Nel tentativo di spiegare questi risultati inaspettati e paradossali, abbiamo analizzato i parametri biochimici della popolazione presa in esame, cercando eventuali correlazioni tra AOF% e specifici parametri clinici o di laboratorio. Abbiamo notato che la AOF% risultava linearmente dipendente dalle concentrazioni plasmatiche di HDL-c (fig. 12a). Dato che abbiamo sempre normalizzato i campioni per la concentrazione di HDL-c, una possibile spiegazione a tale relazione risiede nella manipolazione che i campioni hanno subito dopo essere stati raccolti. E' possibile che sia la diluizione del siero in base alla concentrazione plasmatica di HDL-c a determinare la correlazione esistente tra HDL-c e AOF%: infatti al fine di ottenere per tutti i campioni la stessa concentrazione finale di HDL-c diluiamo insieme alle HDL anche tutto il siero, che contiene proteine e altre molecole dalle proprietà antiossidanti. Di conseguenza campioni con HDL-c plasmatica più alta sono diluiti maggiormente, quindi la quantità di siero per unità di volume risulta minore, e ciò si associa a valori meno elevati di AOF%; al contrario campioni con HDL-c più bassa, dovendo essere

diluiti meno, conterranno una maggiore quantità di siero per unità di volume, e quindi più elevati valori di AOF%. Nasce pertanto il sospetto che il test sia influenzato dalle eventuali proprietà antiossidanti delle varie componenti del siero. Una delle sostanze con spiccato potere antiossidante è l'acido urico: il fatto che le sue concentrazioni plasmatiche correlino con la AOF% (fig. 12b) costituisce un dato a supporto di questa ipotesi. I controlli presentano sia basse concentrazioni plasmatiche di HDL-c, sia alte concentrazioni di acido urico (tab. 1), e questo può rendere ragione del risultato paradossale.

Il fatto che il metodo riesca ad individuare così sensibilmente la presenza di antiossidanti è confortante, e questo costituisce una solida verifica della sensibilità del metodo verso ogni tipo di sostanza antiossidante e della bontà delle modifiche da noi introdotte. La correlazione con la concentrazione plasmatica di HDL-c e di acido urico solleva un dubbio circa il substrato biologico dell'effetto antiossidante misurato dalla AOF%. Infatti il test potrebbe non misurare la capacità antiossidante delle HDL, ma dell'intero sistema siero diluito + HDL. Il metodo è stato implementato per ovviare ad una carenza di sensibilità; il guadagno in sensibilità derivante dal nostro lavoro ha permesso di rilevare alcune caratteristiche del metodo che pongono in dubbio sia la reale validità della misura della AOF% nei riguardi delle proprietà antiossidanti delle HDL, sia la legittimità del suo utilizzo in clinica come marcatore precoce di aterosclerosi.

## **5. Conclusioni**

Abbiamo messo a punto un metodo acellulare per la valutazione delle proprietà antiossidanti delle HDL, e il metodo appare adesso sensibile, affidabile e riproducibile. Grazie alla superiore sensibilità i dati preliminari da noi ottenuti hanno evidenziato alcuni aspetti inattesi: la AOF% risulta inferiore nei controlli rispetto ai pazienti esaminati; inoltre dall'analisi dei dati risulta che tale parametro è correlato con le concentrazioni plasmatiche di HDL-c. Ciò potrebbe essere indice di un effetto antiossidante del sistema siero+HDL; questa ipotesi è avvalorata dalla correlazione tra AOF% e concentrazioni plasmatiche di acido urico. Il fatto che il metodo possa risultare sensibile anche all'effetto antiossidante di altre sostanze disciolte nel siero, oltre all'effetto antiossidante proprio delle HDL, pone un dubbio sul substrato biologico dell'effetto antiossidante misurato dalla AOF% e sulla legittimità del suo utilizzo clinico come marcatore precoce di aterosclerosi.

## **6. prospettive future**

Per poter definire il substrato biologico ed il significato clinico della AOF% occorrono ulteriori studi; in particolare è necessario mettere a punto un metodo per testare in vitro le sole HDL del paziente private di una "contaminazione" dovuta alla presenza di sostanze disciolte nel siero. Inoltre sarà possibile effettuare una correlazione della AOF% con altre funzioni delle HDL: grazie ad una collaborazione con l'Università di Parma potremo confrontare negli stessi soggetti la AOF% con l'RCT.

## BIBLIOGRAFIA

1. **Schaefer, Ernst J.; Anthanont, Pimjai; Asztalos, Bela F.** High-density lipoprotein metabolism, composition, function, and deficiency. *Current Opinion in Lipidology*, 2014 - Volume 25 - Issue 3 - p 194-199
2. **Courtney B. Sherman, Stephen J. Peterson, and William H. Frishman.** Apolipoprotein A-I Mimetic Peptides: A Potential New Therapy for the Prevention of Atherosclerosis. *Cardiology in Review* 2010;18: 141–147
3. **Davidson, W.S. and Thompson, T.B.** The structure of apolipoprotein A-I in high density lipoproteins. *J. Biol. Chem.* (2007) 282, 22249–22253
4. **Courtney B. Sherman, Stephen J. Peterson, and William H. Frishman.** Apolipoprotein A-I Mimetic Peptides: A Potential New Therapy for the Prevention of Atherosclerosis. *Cardiology in Review* 2010;18: 141–147
5. **Gary F. Lewis and Daniel J. Rader.** New Insights Into the Regulation of HDL Metabolism and Reverse Cholesterol Transport. *Circ Res.* 2005;96:1221-1232
6. **Xuwei Zhu, Gang Wu, Wuwei Zeng, Hong Xue, and Baosheng Chen.** Cysteine mutants of human apolipoprotein A-I: a study of secondary structural and functional properties. *J. Lipid Res.* 2005. 46:1303–1311
7. **Salman Bandeali & John Farmer.** High-Density Lipoprotein and Atherosclerosis: The Role of Antioxidant Activity. *Curr Atheroscler Rep* (2012) 14:101–107
8. **Robert S. Rosenson, H. Bryan Brewer, Jr., M. John Chapman, Sergio Fazio, M. Mahmood Hussain, Anatol Kontush, Ronald M. Krauss, James D. Otvos, Alan T. Remaley, and Ernst J. Schaefer.** HDL Measures, Particle

- Heterogeneity, Proposed Nomenclature, and Relation to Atherosclerotic Cardiovascular Events. *Clinical Chemistry* 57:3 392–410 (2011)
9. **Katherine Sattler and Bodo Levkau.** Sphingosine-1-phosphate as a mediator of high-density lipoprotein effects in cardiovascular protection. *Cardiovascular Research* (2009) 82, 201–211
  10. **Collet X, Tall AR, Serajuddin H, Guendouzi K, Royer L, Oliveira H, Barbaras R, Jiang XC, Francone OL.** Remodeling of HDL by CETP in vivo and by CETP and hepatic lipase in vitro results in enhanced uptake of CE by cells expressing scavenger receptor B-I. *J Lipid Res.* 1999;40:1185-1193.
  11. **Mohamad Navab, Judith A. Berliner, Ganesamoorthy Subbanagounder, Susan Hama, Aldons J. Lusis, Lawrence W. Castellani, Srinivasa Reddy, Diana Shih, Weibin Shi, Andrew D. Watson, Brian J. Van Lenten, Deven Vora and Alan M. Fogelman.** HDL and the Inflammatory Response Induced by LDL-Derived Oxidized Phospholipids. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21:481-488
  12. **Laurent Camont, M. John Chapman and Anatol Kontush.** Biological activities of HDL subpopulations and their relevance to cardiovascular disease. *Trends in Molecular Medicine* xx (2011) 1–10
  13. **Duriez, P. and Fruchart, J.C.** High-density lipoprotein subclasses and apolipoprotein A-I. *Clin. Chim. Acta* (1999) 286, 97–114
  14. **Rye KA, Bursill CA, Lambert G, Tabet F, Barter PJ.** The metabolism and anti-atherogenic properties of HDL. *J. Lipid Res.* (2009)50, S195–S200
  15. **Jiyoung Lee, Youngki Park, and Sung I. Koo.** ATP binding cassette transporter A-I and HDL metabolism: Effects of fatty acids. *J Nutr Biochem.* 2012 January ; 23(1): 1–7.

16. **Yvan-Charvet Laurent, Mollie Ranalletta, Nan Wang, Seongah Han, Naoki Terasaka, Rong Li, Carrie Welch and Alan R. Tall.** Combined deficiency of ABCA1 and ABCG1 promotes foam cell accumulation and accelerates atherosclerosis in mice. *J Clin Invest.* 2007;117(12):3900–3908.
17. **Favari E, Lee M, Calabresi L, Franceschini G, Zimetti F, Bernini F, Kovanen PT.** Depletion of pre-beta-high density lipoprotein by human chymase impairs ATP-binding cassette transporter A1- but not scavenger receptor class B type I-mediated lipid efflux to high density lipoprotein. *J. Biol. Chem.* 2004, 279:9930-9936.
18. **Rye, K.A. and Barter, P.J.** Formation and metabolism of prebeta-migrating, lipid-poor apolipoprotein A-I. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* (2004) 24, 421–428
19. **John F. Oram And Jay W. Heinecke.** ATP-Binding Cassette Transporter A1: A Cell Cholesterol Exporter That Protects Against Cardiovascular Disease. *Physiol Rev* 85: 1343–1372, 2005;
20. **Moestrup SK, Kozyraki R.** Cubilin, a high-density lipoprotein receptor. *Curr Opin Lipidol.* 2000;11:133-140.
21. **Cziraky MJ1, Watson KE, Talbert RL.** Targeting low HDL-cholesterol to decrease residual cardiovascular risk in the managed care setting.. *J Manag Care Pharm.* 2008 Oct;14(8 Suppl):S3-28
22. **Barter P, Gotto AM, LaRosa JC, Maroni J, Szarek M, Grundy SM, et al.** HDL cholesterol, very low levels of LDL cholesterol, and CV events. *N Engl J Med* 2007;357:1301–10.
23. **Emil M. deGoma, MD, Rolando L. deGoma, MD, Daniel J. Rader, MD.** Beyond High-Density Lipoprotein Cholesterol Levels Evaluating High-Density

Lipoprotein Function as Influenced by Novel Therapeutic Approaches. *J Am Coll Cardiol* 2008;51:2199–211

24. **Gordon SM, Hofmann S, Askew DS, Davidson WS.** High density lipoprotein: it's not just about lipid transport anymore. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 2011;22(1):9–15.
25. **Assmann G, Cullen P, Schulte H.** The Münster Heart Study (PROCAM). Results of follow-up at 8 years. *Eur Heart J*. 1998 Feb;19 Suppl A:A2-11.
26. **Gerd Assmann and Antonio M. Gotto, Jr.** HDL Cholesterol and Protective Factors in Atherosclerosis. *Circulation* 2004, 109:III-8-III-14
27. **Boden WE:** High-density lipoprotein cholesterol as an independent risk factor in cardiovascular disease: assessing the data from Framingham to Veterans Affairs High-Density Lipoprotein Intervention Trial. *Am J Cardiol* 2000, 86:19L-22L
28. **Gordon SM, Hofmann S, Askew DS, Davidson WS.** High density lipoprotein: it's not just about lipid transport anymore. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 2011;22(1):9–15.
29. **William B. Kannel, Md, Facc, Daniel Mcgee, Tavia Gordon.** A General Cardiovascular Risk Profile: The Framingham Study. *The American Journal of CARDIOLOGY*. 1976; Volume 36: 46-51
30. **Mohamad Navab, Srinivasa T. Reddy, Brian J. Van Lenten and Alan M. Fogelman.** HDL and cardiovascular disease: atherogenic and atheroprotective mechanisms. *Nat. Rev. Cardiol*. 8, 222–232 (2011)
31. **Peter P. Toth, FNLA, Chair, Philip J. Barter, Co-Chair, Robert S. Rosenson, Co-Chair, William E. Boden, M. John Chapman, Marina Cuchel, Ralph B. D'Agostino Sr., Michael H. Davidson, W. Sean Davidson, Jay W. Heinecke, Richard H. Karas, Anatol Kontush, Ronald M. Krauss,**



- Michael Miller, MD, Daniel J. Rader.** High-density lipoproteins: A consensus statement from the National Lipid Association. *Journal of Clinical Lipidology* (2013) 7, 484–525
32. **Pérez-Méndez Ó, Pacheco HG, Martínez-Sánchez C, Franco M.** HDL-cholesterol in coronary artery disease risk: function or structure? *Clin Chim Acta.* 2014 Feb 15;429:111-22.
33. **George Davey Smith and Shah Ebrahim.** Mendelian randomization: prospects, potentials, and limitations. *International Journal of Epidemiology* 2004;33:30–42
34. **Benjamin F Voight, Gina M Peloso et al.** Plasma HDL cholesterol and risk of myocardial infarction: a mendelian randomisation study. *Lancet* 2012; 380: 572–80
35. **Kon V, Ikizler TA, Fazio S.** Importance of high-density lipoprotein quality: evidence from chronic kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2013 May;22(3):259-65.
36. **Daniel J. Rader, Eric T. Alexander, Ginny L. Weibel, Jeffrey Billheimer and George H. Rothblat.** The role of reverse cholesterol transport in animals and humans and relationship to atherosclerosis. *J. Lipid Res.* 2009. 50: S189–S194.
37. **Scott Turner, PhD; Jason Voogt, PhD; Michael Davidson, MD; Alex Glass, PhD; Salena Killion, MPH; Julie Decaris, BS; Hussein Mohammed, BS; Kaori Minehira, PhD; Drina Boban, MS; Elizabeth Murphy, MD, DPhil; Jayraz Luchoomun, PhD; Mohamad Awada, PhD; Richard Neese, PhD; Marc Hellerstein, MD, PhD.** Measurement of Reverse Cholesterol Transport Pathways in Humans: in Vivo Rates of Free Cholesterol Efflux, Esterification, and Excretion. *J Am Heart Assoc.* 2012;1:e001826

38. **Amit V. Khera, Marina Cuchel, Margarita de la Llera-Moya, Amrith Rodrigues, Megan F. Burke, Kashif Jafri, Benjamin C. French, Julie A. Phillips, Megan L. Mucksavage, Robert L. Wilensky, Emile R. Mohler, George H. Rothblat, and Daniel J. Rader.** Cholesterol Efflux Capacity, High-Density Lipoprotein Function, and Atherosclerosis. *N Engl J Med* 2011;364:127-35.
39. **Ng DS, Wong NC, Hegele RA.** HDL--is it too big to fail? *Nat Rev Endocrinol.* 2013 May;9(5):308-12.
40. **Calabresi L, Gomaschi M, Franceschini G.** High-density lipoprotein quantity or quality for cardiovascular prevention? *Curr Pharm Des.* 2010 May;16(13):1494-503.
41. **Hong Feng and Xiang-An Li.** Dysfunctional high-density lipoprotein. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2009 April; 16(2): 156-162
42. **Astrid van der Velde.** Reverse cholesterol transport: From classical view to new Insights. *World J Gastroenterol* 2010 December 21; 16(47): 5908-5915
43. **Yun-cheng Lv, Kai Yin, Yu-chang Fu, Da-wei Zhang, Wu-jun Chen, and Chao-ke Tang.** Posttranscriptional Regulation of ATP-Binding Cassette Transporter A1 in Lipid Metabolism. *DNA AND CELL BIOLOGY, Volume 32, Number 7, 2013, Pp. 348–358*
44. **Christian Besler, Thomas F. Lü'scher, Ulf Landmesser.** Molecular mechanisms of vascular effects of High-density lipoprotein: alterations in cardiovascular disease. *EMBO Mol Med* 4, 251–268
45. **Monty Krieger.** Scavenger receptor class B type I is a multiligand HDL receptor that influences diverse physiologic systems. *J. Clin. Invest.* 108:793–797 (2001).

46. **Sissel Lund-Katz and Michael C. Phillips.** High Density Lipoprotein Structure–Function and Role in Reverse Cholesterol Transport. *Subcell Biochem.* 2010 ; 51: 183–227.
47. **Kotosai M1, Shimada S, Kanda M, Matsuda N, Sekido K, Shimizu Y, Tokumura A, Nakamura T, Murota K, Kawai Y, Terao J.** Plasma HDL reduces nonesterified fatty acid hydroperoxides originating from oxidized LDL: a mechanism for its antioxidant ability. *Lipids.* 2013 Jun;48(6):569-78.
48. **Mackness B, Mackness M.** The antioxidant properties of high-density lipoproteins in atherosclerosis. *Panminerva Med.* 2012 Jun;54(2):83-90.
49. **Mohamad Navab, PhD, Roger Yu, MD, Nima Gharavi, PhD, William Huang, BSc, Navid Ezra, BSc, Ali Lotfizadeh, MD, G.M. Anantharamaiah, PhD, Nima Alipour, MSc, Brian J. Van Lenten, PhD, Srinivasa T. Reddy, PhD, and Daniel Marelli, MD.** High-density Lipoprotein: Antioxidant and Anti-inflammatory Properties. *Current Atherosclerosis Reports* 2007, 9:244–248
50. **Anatol Kontush, Sandrine Chantepie, M. John Chapman.** Small, Dense HDL Particles Exert Potent Protection of Atherogenic LDL Against Oxidative Stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:1881-1888
51. **Bielicki John K. and Michael N. Oda.** Apolipoprotein A-I<sub>Milano</sub> and Apolipoprotein A-I<sub>Paris</sub> Exhibit an Antioxidant Activity Distinct from That of Wild-Type Apolipoprotein A-I. *Biochemistry*, 2002, 41 (6), pp 2089–2096
52. **Esin Eren, Necat Yilmaz, and Ozgur Aydin.** Functionally Defective High-Density Lipoprotein and Paraoxonase: A Couple for Endothelial Dysfunction in Atherosclerosis. *Hindawi Publishing Corporation Cholesterol, Volume 2013, Article ID 792090, 10 pages*

53. **Gunther Marsche, Marcus D. Saemann, Akos Heinemann, Michael Holzer.** Inflammation alters HDL composition and function: Implications for HDL-raising therapies. *Pharmacology & Therapeutics* 137 (2013) 341–351
54. **Yoshikawa M, Sakuma N, Hibino T, Sato T, Fujinami T.** HDL3 exerts more powerful anti-oxidative, protective effects against copper-catalyzed LDL oxidation than HDL2. *Clin Biochem.* 1997;30:221–225.
55. **Paul W. Baker, Kerry-Anne Rye, Jennifer R. Gamble, Mathew A. Vadas, and Philip J. Barter.** Phospholipid composition of reconstituted high density lipoproteins influences their ability to inhibit endothelial cell adhesion molecule expression. *J. Lipid Res.* 2000. 41: 1261–1267.
56. **Laura Calabresi, Monica Gomaschi, Guido Franceschini.** Endothelial Protection by High-Density Lipoproteins From Bench to Bedside. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:1724-1731
57. **Drew BG, Fidge NH, Gallon-Beaumier G, Kemp BE, Kingwell BA..** High-density lipoprotein and apolipoprotein AI increase endothelial NO synthase activity by protein association and multisite phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (2004) 101, 6999– 7004
58. **A. R. Tall.** Cholesterol efflux pathways and other potential mechanisms involved in the athero-protective effect of high density lipoproteins. *J Intern Med* 2008; 263: 256–273.
59. **Takao Kimura, Koichi Sato, Enkhzol Malchinkhuu, Hideaki Tomura, Kenichi Tamama, Atsushi, Kuwabara, Masami Murakami and Fumikazu Okajima.** High-Density Lipoprotein Stimulates Endothelial Cell Migration and Survival Through Sphingosine 1-Phosphate and Its Receptors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:1283-1288

60. **Nofer JR, Brodde MF, Kehrel BE.** High-density lipoproteins, platelets and the pathogenesis of atherosclerosis. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2010 Jul;37(7):726-35.
61. **Vanhamme L, Paturiaux-Hanocq F, Poelvoorde P, Nolan DP, Lins L, Van Den AJ, Pays A, Tebabi P, Van Xong H, Jacquet A, Moguilevsky N, Dieu M, Kane JP, De Baetselier P, Brasseur R, Pays E.** Apolipoprotein L-I is the trypanosome lytic factor of human serum. *Nature.* 2003;422:83-87.
62. **Lina Badimon and Gemma Vilahur.** LDL-cholesterol versus HDL-cholesterol in the atherosclerotic plaque: inflammatory resolution versus thrombotic chaos. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1254 (2012) 18-32
63. **Yu Q, Zhang Y, Xu CB.** Apolipoprotein B, the villain in the drama? *Eur J Pharmacol.* 2014 Sep 10. pii: S0014-2999(14)00642-6.
64. **Vidal Francisco, Cristina Colomé, José Martínez-González and Lina Badimon.** Atherogenic concentrations of native low-density lipoproteins down-regulate nitric-oxide-synthase mRNA and protein levels in endothelial cells. *European Journal of Biochemistry, Volume 252, Issue 3, pages 378–384, March (II) 1998*
65. **Mohamad Navab, Susan Y. Hama, C. Justin Cooke, G. M. Anantharamaiah, Manjula Chaddha, Linda Jin, Ganesamoorthy Subbanagounder, Kym F. Faull, Srinivasa T. Reddy, Norman E. Miller, and Alan M. Fogelman.** Normal high density lipoprotein inhibits three steps in the formation of mildly oxidized low density lipoprotein: step 1. *J. Lipid Res.* 2000. 41: 1481–1494.
66. **Mohamad Navab, Susan Y. Hama, G. M. Anantharamaiah, Kholood Hassan, Greg P. Hough, Andrew D. Watson, Srinivasa T. Reddy, Alex Sevanian, Gregg C. Fonarow, and Alan M. Fogelman.** Normal high density

lipoprotein inhibits three steps in the formation of mildly oxidized low density lipoprotein: steps 2 and 3. *J. Lipid Res.* 2000. 41: 1495–1508.

67. **Roger Yu, Babak Yekta, BSc, Ladan Vakili, Navid Gharavi, Mohamad Navab, Daniel Marelli and Abbas Ardehali.** Proatherogenic High-density Lipoprotein, Vascular Inflammation, and Mimetic Peptides. *Current Atherosclerosis Reports* 2008, 10:171–176
68. **Mohamad Navab, Gattadahalli M Anantharamaiah, Srinivasa T Reddy, Brian J Van Lenten, Benjamin J Ansell and Alan M Fogelman.** Mechanisms of Disease: proatherogenic HDL—an evolving field. *Nature Clinical Practice Endocrinology & Metabolism* September 2006 Vol 2 No 9: 504-511
69. **Brian J. Van Lenten, Susan Y. Hama, Frederick C. de Beer,t Diana M. Stafforini, Thomas M. McIntyre, Stephen M. Prescott, Bert N. La Du, Alan M. Fogelman, and Mohamad Navab .** Anti-inflammatory HDL Becomes Pro-inflammatory during the Acute Phase Response. Loss of Protective Effect of HDL against LDL Oxidation in Aortic Wall Cell Cocultures. *J. Clin. Invest.* 1995. 96:2758-2767.
70. **Gabay C, Kushner I.** Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med.* 1999 Feb 11;340(6):448-54.
71. **Madahian S, Navab KD, Pourtabatabaei N, Seyedali S, Safar S, Vazirian S, Hough G.** Inflammation, high density lipoprotein and endothelium. *Curr Med Chem.* 2014;21(25):2902-9.
72. **Bai-mei He, Shui-ping Zhao, and Zhen-yu Peng.** Effects of Cigarette Smoking on HDL Quantity and Function: Implications for Atherosclerosis. *Journal of Cellular Biochemistry* 114:2431–2436 (2013)
73. **Theodoros Kelesidis, Otto O Yang, Judith S Currier, Kaveh Navab, Alan M Fogelman, Mohamad Navab.** HIV-1 infected patients with suppressed plasma

viremia on treatment have pro-inflammatory HDL. *Lipids in Health and Disease* 2011, 10:35

74. **Maureen McMahon, Jennifer Grossman, John FitzGerald, Erika Dahlin-Lee, Daniel J. Wallace, Bernard Y. Thong, Humeira Badsha, Kenneth Kalunian, Christina Charles, Mohamad Navab, Alan M. Fogelman, and Bevra H. Hahn.** Proinflammatory High-Density Lipoprotein as a Biomarker for Atherosclerosis in Patients With Systemic Lupus Erythematosus and Rheumatoid Arthritis. *ARTHRITIS & RHEUMATISM, Vol. 54, No. 8, August 2006, pp 2541–2549*
75. **Alwaili Khalid, Dana Bailey, Zuhier Awan, Swneke D. Bailey, Isabelle Ruel, Anouar Hafiane, Larbi Krimbou, Sylvie Laboissiere, Jacques Genest.** The HDL proteome in acute coronary syndromes shifts to an inflammatory profile. *Biochim Biophys Acta. 2012 Mar;1821(3):405-15.*
76. **Juyong Brian Kim, Susan Hama, Greg Hough, MScA, Mohamad Navab, Alan M. Fogelman, W. Robb MacLellan, MD, PhDa,b, Tamara B. Horwich, and Gregg C. Fonarow.** Heart Failure is Associated With Impaired Anti-Inflammatory and Antioxidant Properties of High-Density Lipoproteins. *The American Journal of Cardiology* 2013; -:-e-) ??? HDL e rischio cardiovasc
77. **Boudewijn Klop, Jan Willem F. Elte and Manuel Castro Cabezas.** Dyslipidemia in Obesity: Mechanisms and Potential Targets. *Nutrients* 2013, 5, 1218-1240
78. **Ma H, Patti ME.** Bile acids, obesity, and the metabolic syndrome. *Best Pract Res Clin Gastroenterol. 2014 Aug;28(4):573-583.*
79. **Boris Hansel, Philippe Giral, Estelle Nobecourt, Sandrine Chantepie, Eric Bruckert, M. John Chapman, and Anatol Kontush.** Metabolic Syndrome Is Associated with Elevated Oxidative Stress and Dysfunctional Dense High-

Density Lipoprotein Particles Displaying Impaired Antioxidative Activity. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 89(10):4963–4971

80. **Juliana A. de Souza, Cecile Vindis, Boris Hansel, Anne Nègre-Salvayre, Patrice Therond, Carlos V. Serrano Jr., Sandrine Chantepie, Robert Salvayre, Eric Bruckert, M. John Chapman, Anatol Kontush.** Metabolic syndrome features small, apolipoprotein A-I-poor, triglyceride-rich HDL3 particles with defective anti-apoptotic activity. *Atherosclerosis* Volume 197, Issue 1, Pages 84-94, March 2008
81. **E. Nobécourt, S. Jacqueminet, B. Hansel, S. Chantepie, A. Grimaldi, M. J. Chapman, A. Kontush.** Defective antioxidative activity of small dense HDL3 particles in type 2 diabetes: relationship to elevated oxidative stress and hyperglycaemia. *Diabetologia* (2005) 48: 529–538
82. **Cecilia Morgantini, Andrea Natali, Beatrice Boldrini, Satoshi Imaizumi, Mohamad Navab, Alan M. Fogelman, Ele Ferrannini, and Srinivasa T. Reddy.** Anti-inflammatory and Antioxidant Properties of HDLs Are Impaired in Type 2 Diabetes. *Diabetes* 60:2617–2623, 2011
83. **Dan Farbstein and Andrew P Levy.** HDL dysfunction in diabetes: causes and possible treatments. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 2012 March ; 10(3): 353–361
84. **Hamid Moradi, Nosratola D. Vaziri, Moti L. Kashyap, Hamid M. Said, PhD, Kamyar Kalantar-Zadeh.** Role of HDL Dysfunction in End-Stage Renal Disease: A Double-Edged Sword. *Journal of Renal Nutrition, Volume 23, Issue 3, Pages 203-206, May 2013*
85. **Alain Mangé, Auré lie Goux, Stéphanie Badiou, Laure Patrier, Bernard Canaud, Thierry Maudelonde, Jean-Paul Cristol, Jéro^me Solasso.** HDL Proteome in Hemodialysis Patients: A Quantitative Nanoflow Liquid



Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Approach. *Plos-one*, March 2012, Volume ,7 Issue 3, pagg. e34107

86. **Margarita de la Llera Moya, Fiona C McGillicuddy, Christine C Hinkle, Michael Byrne, Michelle R Joshi, Vihn Nguyen, Jennifer Tabita-Martinez, Megan L Wolfe, Karen Badellino, Leticia Pruscino, Nehal N Mehta, Bela F Asztalos, and Muredach P Reilly.** Inflammation Modulates Human HDL Composition and Function in vivo. *Atherosclerosis*. 2012 June ; 222(2): 390–394.
87. **Sara Deakin, Xenia Moren and Richard W. James.** HDL Oxidation Compromises its Influence on Paraoxonase-1 Secretion and its Capacity to Modulate Enzyme Activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27:1146-1152
88. **Yutaka Nagano, Hidenori Arai, And Toru Kita.** High density lipoprotein loses its effect to stimulate efflux of cholesterol from foam cells after oxidative modification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991. Vol. 88, pp. 6457-6461
89. **Andreas Artl, Gunther Marsche, Sophie Lestavel, Wolfgang Sattler and Ernst Malle.** Role of Serum Amyloid A During Metabolism of Acute-Phase HDL by Macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20:763-772
90. **Gauster M1, Oskolkova OV, Innerlohinger J, Glatter O, Knipping G, Frank S.** Endothelial lipase-modified high-density lipoprotein exhibits diminished ability to mediate SR-BI (scavenger receptor B type I)-dependent free-cholesterol efflux. *Biochem J*. 2004 Aug 15;382(Pt 1):75-82.
91. **Haraguchi Y, Toh R, Hasokawa M, Nakajima H, Honjo T, Otsui K, Mori K, Miyamoto-Sasaki M, Shinohara M, Nishimura K, Ishida T, Hirata K.** Serum myeloperoxidase/paraoxonase 1 ratio as potential indicator of

- dysfunctional high-density lipoprotein and risk stratification in coronary artery disease. *Atherosclerosis*. 2014 Jun;234(2):288-94.
92. **Ferretti G., T. Bacchetti, C. Marchionni, L. Caldarelli, G. Curatola.** Effect of glycation of high density lipoproteins on their physicochemical properties and on paraoxonase activity. *Acta Diabetologica*, December 2001, Volume 38, Issue 4, pp 163-169
93. **Kisilevsky R, Subrahmanyam L.** Serum amyloid A changes high density lipoprotein's cellular affinity. A clue to serum amyloid A's principal function. *Lab Invest*. 1992 Jun;66(6):778-85.
94. **Choudhury Robin P. and Francisco Leyva.** C-Reactive Protein, Serum Amyloid A Protein, and Coronary Events. *Circulation*. 1999;100:e65
95. **Jahangiri A1, de Beer MC, Noffsinger V, Tannock LR, Ramaiah C, Webb NR, van der Westhuyzen DR, de Beer FC.** HDL remodeling during the acute phase response. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009 Feb;29(2):261-7.
96. **Jahangiri A.** High-density lipoprotein and the acute phase response. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2010 Apr;17(2):156-60.
97. **Po-Yuan Chang, Chii-Ming Lee, Hsiu-Ching Hsu, Hung-Ju Lin, Kuo-Liong Chien, Ming-Fong Chen, Chu-Huang Chen, Yuan-Teh Lee1, and Chao-Yuh Yang.** Identification of the HDL-ApoCIII to VLDL-ApoCIII ratio as a predictor of coronary artery disease in the general population: The Chin-Shan Community Cardiovascular Cohort (CCCC) study in Taiwan. *Lipids in Health and Disease* 2012, 11:162
98. **Majken K. Jensen, Eric B. Rimm, Jeremy D. Furtado, Frank M. Sacks.** Apolipoprotein C-III as a Potential Modulator of the Association

Between HDL-Cholesterol and Incident Coronary Heart Disease. *J AmHeart Assoc.* 2012;1:jah3-e000232

99. **Junji Watanabe, Christina Charles-Schoeman, Yunan Miao, David Elashoff, Yuen Yin Lee, George Katselis, Terry D. Lee, and Srinivasa T. Reddy.** Proteomic profiling following immunoaffinity capture of HDL: Association of acute phase proteins and complement factors with pro-inflammatory HDL in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheum.* 2012 June ; 64(6): 1828–1837
100. **Li Tian, Shiyin Long, Mingde Fu, Yinghui Liu, Yanhua Xu and Lianqun Jia.** Characteristics of High-density Lipoprotein Subclasses Distribution for Subjects with Desirable Total Cholesterol Levels. *Lipids in Health and Disease* 2011, 10:64
101. **Li Tian, Mingde Fu.** The relationship between high density lipoprotein subclass profile and plasma lipids concentrations. *Lipids in Health and Disease* 2010, 9:118
102. **Li Tian, Yanhua Xu, Mingde Fu, Tao Peng, Yinghui Liu, Shiyin Long.** The impact of plasma triglyceride and apolipoproteins concentrations on high-density lipoprotein subclasses distribution. *Lipids in Health and Disease* 2011, 10:17
103. **Hubert Scharnagl, Christina Heuschneider, Sabrina Sailer, Marcus E. Kleber, Winfried Mearz, and Andreas Ritsch.** Decreased cholesterol efflux capacity in patients with low cholesteryl ester transfer protein plasma levels. *Eur J Clin Invest* 2014; 44 (4): 395–401
104. **Fournier N, Atger V, Cogny A, Védie B, Giral P, Simon A, Moatti N, Paul JL.** Analysis of the relationship between triglyceridemia and HDL-

- phospholipid concentrations: consequences on the efflux capacity of serum in the Fu5AH system. *Atherosclerosis*. 2001 Aug;157(2):315-23.
105. **Tomas Vaisar, Subramaniam Pennathur, Pattie S. Green, Sina A. Gharib, Andrew N. Hoofnagle, Marian C. Cheung, Jaeman Byun, Simona Vuletic, Sean Kassim, Pragya Singh, Helen Chea, Robert H. Knopp, John Brunzell, Randolph Geary, Alan Chait, Xue-Qiao Zhao, Keith Elkon, Santica Marcovina, Paul Ridker, John F. Oram, and Jay W. Heinecke.** Shotgun proteomics implicates protease inhibition and complement activation in the antiinflammatory properties of HDL. *J. Clin. Invest.* 117:746–756 (2007).
106. **Kisilevsky R, Manley PN.** Acute-phase serum amyloid A: perspectives on its physiological and pathological roles. *Amyloid*. 2012 Mar;19(1):5-14.
107. **Ansell BJ.** Targeting the anti-inflammatory effects of high-density lipoprotein. *Am J Cardiol*. 2007 Dec 3;100(11 A):n3-9.
108. **Navab M, Imes SS, Hama SY, Hough GP, Ross LA, Bork RW, Valente AJ, Berliner JA, Drinkwater DC, Laks H, et al.** Monocyte transmigration induced by modification of low density lipoprotein in cocultures of human aortic wall cells is due to induction of monocyte chemoattractant protein 1 synthesis and is abolished by high density lipoprotein. *J Clin Invest*. 1991 Dec;88(6):2039-46.
109. **Cockerill GW, Rye KA, Gamble JR, Vadas MA, Barter PJ.** High-density lipoproteins inhibit cytokine-induced expression of endothelial cell adhesion molecules. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1995 Nov;15(11):1987-94.
110. **Mohamad Navab, Susan Y. Hama, Greg P. Hough, Ganesamoorthy Subbanagounder, Srinivasa T. Reddy, and Alan M. Fogelman.** A cell-free

assay for detecting HDL that is dysfunctional in preventing the formation of or inactivating oxidized phospholipids. *J. Lipid Res.* 2001. 42:1308–1317.

111. **Kelesidis T, Currier JS, Huynh D, Meriwether D, Charles-Schoeman C, Reddy ST, Fogelman AM, Navab M, Yang OO.** A biochemical fluorometric method for assessing the oxidative properties of HDL. *J Lipid Res.* 2011 Dec;52(12):2341-51
112. **Theodoros Kelesidis, Srinivasa T Reddy, Diana Huynh, David Meriwether, Alan M Fogelman, Mohamad Navab and Otto O Yang.** Effects of lipid-probe interactions in biochemical fluorometric methods that assess HDL redox activity. *Lipids in Health and Disease* 2012, 11:87
113. **Pierre N.M. Demacker, Marja Hessels, Helga Toenhake-Dijkstra, and Henk Baadenhuijsen.** Precipitation methods for high-density lipoprotein cholesterol measurement compared, and final evaluation under routine operating conditions of a method with a low sample-to-reagent ratio. *Clinical Chemistry* 43:4; 663–668 (1997)

## **RINGRAZIAMENTI**

*Vorrei ringraziare il Prof. Andrea Natali, che mi ha permesso di svolgere questo lavoro, mi ha accolto nel suo gruppo a braccia aperte e mi ha fatto appassionare alla ricerca nel campo del metabolismo. Ringrazio anche la dott. Simona Baldi, che è stata la mia guida in questo anno di lavoro: la sua costante presenza è stata preziosa non solo nel lavoro tecnico, ma anche come continuo stimolo e supporto. Desidero ringraziare anche la dott. Silvia Trifirò, che nonostante la mole di lavoro a cui è sottoposta è sempre riuscita a trovare il tempo e il modo di sostenermi e aiutarmi.*

*Vorrei ringraziare anche ognuno dei miei amici, che nei modi più disparati mi hanno aiutato e sostenuto durante questi bellissimi anni di studio: parte di questo traguardo è merito vostro.*

*Una menzione speciale va alla mia famiglia: nonostante le piccole incomprensioni che talvolta possono esserci, siete la solida roccia su cui ho costruito le mie fondamenta; senza di voi non sarei quello che sono e non avrei potuto fare niente; grazie per il vostro amore incondizionato che ha reso possibile tutto questo.*