



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

Medicina Molecolare, Indirizzo -Fisiopatologia del metabolismo: lipidi e lipoproteine

Dipartimento di Biopatologia e Biotecnologie Mediche

Settore Scientifico Disciplinare MED/09

CORRELAZIONE TRA GLI ACIDI GRASSI PLASMATICI E LIVELLI DI HDL-COLESTEROLO IN UNA POPOLAZIONE SICILIANA. EFFETTI DEGLI ACIDI GRASSI SULLA CAPTAZIONE DELLE HDL IN UN MODELLO CELLULARE DI EPATOMA UMANO IN CULTURA.

LA DOTTORANDA
Dott.ssa Ornella Palesano

IL TUTOR
Prof. A.B. Cefalù

IL REFERENTE
Ch.mo prof. Maurizio Averna

CICLO XXVI
ANNO ACCADEMICO 2013/2015

RINGRAZIAMENTI

Al termine del corso di Dottorato di Ricerca vorrei ringraziare le persone che mi sono state vicine durante questi anni.

Ringrazio in particolar modo il Prof. M.R. Averna per avermi consentito di svolgere la ricerca nel laboratorio di-CLADIBIOR, dove ho potuto apprendere dei metodi di ricerca per sviluppare questa tesi e non solo.

Ringrazio il Prof. A.B. Cefalù ed il Dott. Noto per avermi seguito sia nel mio lavoro di ricerca che nella stesura della tesi , ma soprattutto per avermi trasmesso entusiasmo e per avermi fatto capire che la scienza si deve amare al 100%

Ringrazio la Dott.ssa Francesca Fayer che con grande costanza, pazienza, disponibilità e professionalità mi ha guidato nel mio percorso di dottorato incoraggiandomi a portare avanti la mia ricerca in questi tre anni.

Vorrei inoltre porgere un sincero ringraziamento alla Dott.ssa I. Altieri, Dott.ssa V. Ingrassia, la Dott.ssa R. Spina e la Dott.ssa V. Valenti per il loro costante aiuto e per aver condiviso con me la loro esperienza in campo lavorativo e non solo... insieme abbiamo vissuto momenti più o meno belli, tra difficoltà e vittorie.

Non possono mancare sicuramente tra i miei ringraziamenti Giusi, Valeria, Chiara, Maria Pia, gli specializzandi di Medicina Interna ed i ragazzi del CQRC per aver reso più piacevoli , con la loro allegria e amicizia, questi tre anni di lavoro.

Infine, ma sicuramente non per importanza, desidero ringraziare i miei genitori, che mi hanno sostenuto in questo percorso e Sergio compagno nel lavoro e nella vita, che con grande amore e pazienza mi è stato vicino durante questo percorso, supportandomi nei momenti di stress!

INDICE

1. <u>INTRODUZIONE</u>	pag. 03
1.1 Lipidi plasmatici	pag. 04
1.1.1 Acidi grassi	pag. 05
1.2 Le lipoproteine ed il loro metabolismo	pag. 10
1.2.1 Le lipoproteine	pag. 10
1.2.2 Metabolismo delle lipoproteine	pag. 12
1.3 Proteine chiave del metabolismo delle HDL	pag. 18
1.3.1 ATP-Binding Cassette A1 (ABCA1)	pag. 18
1.3.2 Lecitin-Coelsterol Acil Transferasi (LCAT)	pag. 19
1.3.3 Lipasi epatica (HL)	pag. 20
1.3.4 Scavenger Receptor B1 (SR-B1 o CLA-1)	pag. 20
1.4 HDL, acidi grassi e malattia cardiovascolare	pag. 22
1.4.1 HDL e malattia cardiovascolare	pag. 23
1.4.2 Funzioni delle HDL	pag. 24
1.4.3 Acidi grassi e malattia cardiovascolare	pag. 28
1.5 Acidi grassi e lipoproteine plasmatiche	pag. 30
1.5.1 Acidi grassi e metabolismo delle HDL	pag. 31
1.6 Progetto “Ventimiglia di Sicilia HEART STUDY”	pag. 34
2. <u>OBIETTIVI</u>	pag. 36
2.1 OBIETTIVI DELLO STUDIO	pag. 37
3. <u>MATERIALI E METODI</u>	pag. 38
3.1 Popolazione	pag. 39
3.2 GC-MS	pag. 39
3.3 Isolamento delle lipoproteine e marcatura con il DIL	pag. 41
3.4 Colture cellulari	pag. 41
3.5 Complessamento degli acidi grassi con la BSA	pag. 42
3.6 Binding delle DIL-HDL	pag. 42
3.7 Binding delle DIL-HDL dopo trattamento con eparinasi	pag. 43
3.8 Preparazione delle HDL ricombinanti marcate con il BODYPY FL12	pag. 43
3.9 Internalizzazione di esteri del colesterolo	
3.10 quantificazione dell’espressione del recettore SR-B1 sulla superficie cellulare	pag. 43
3.11 Statistica	pag. 44
4. <u>RISULTATI</u>	pag. 46
4.1 Correlazione tra gli acidi grassi plasmatici e livelli di HDL-colesterolo: studio di popolazione	pag. 47
4.2 Effetti del condizionamento con acidi grassi sul catabolismo delle HDL	pag. 49
4.3 Contributo dei proteoglicani eparansolfato (HSPG) di matrice sul binding delle DIL-HDL	pag. 52
4.4 Effetti degli FA sull’internalizzazione degli esteri del colesterolo	pag. 53
4.5 Effetti degli FA sull’espressione di superficie del recettore SR-B1	pag. 54
5. <u>CONCLUSIONI</u>	pag. 57
5.1 Conclusioni	pag. 58
BIBLIOGRAFIA	pag. 61

1. INTRODUZIONE

1.1 LIPIDI PLASMATICI

I lipidi ricoprono un ruolo importante in quasi tutti gli aspetti della vita biologica, sono componenti strutturali delle cellule e sono coinvolti in processi metabolici e ormonali. I lipidi sono definiti come composti organici che sono scarsamente solubili in acqua ma miscibili in solventi organici.

Le quattro principali forme in cui si trovano i lipidi circolanti nel plasma sono le seguenti:

- Acidi grassi
- Trigliceridi
- Fosfolipidi
- Colesterolo

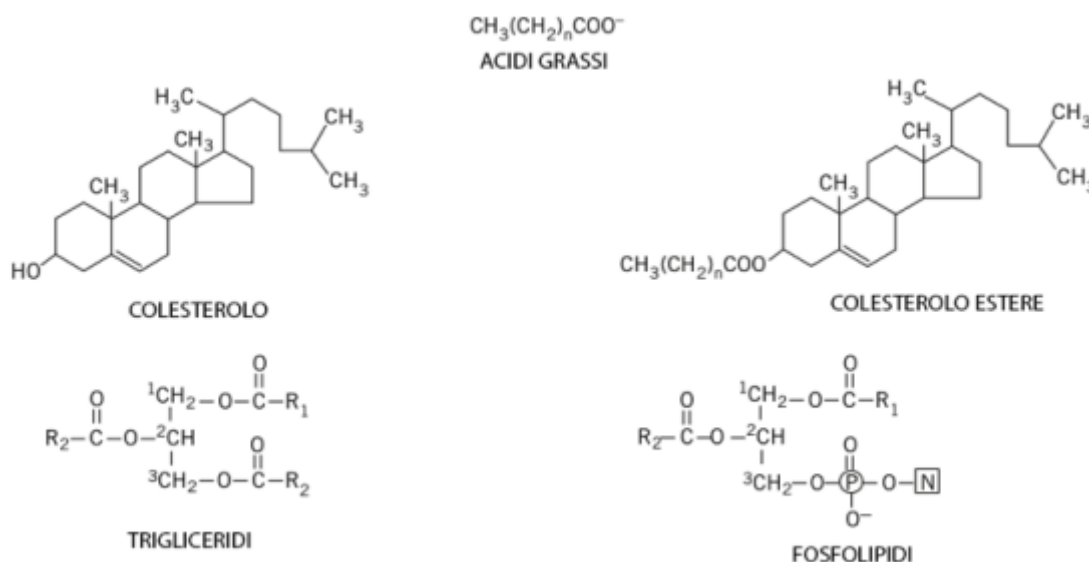


Figura 1: strutture lipidiche plasmatiche; P=gruppo fosfato, N=base azotata, R=acido grasso.

Gli acidi grassi sono composti formati da catene lineari di carbonio di diversa lunghezza. Possono essere saturi, cioè non contenenti doppi legami, monoinsaturi, con un doppio legame, o polinsaturi, con più di un doppio legame. Gli acidi grassi possono presentarsi come non-esterificati (NEFA), esterificati, oppure liberi. I NEFA plasmatici liberati, dai tessuti adiposi grazie all'attività delle lipasi, sono trasportati al fegato e ai tessuti muscolari principalmente legati all'albumina e rappresentano una porzione importante dell'energia richiesta dall'organismo. Tre acidi grassi esterificati

con il glicerolo formano i trigliceridi; questi sono trasportati nelle lipoproteine, a partire dall'intestino, ai vari tessuti inclusi il fegato e il tessuto adiposo.

I fosfolipidi sono lipidi complessi, di struttura simile a quella dei trigliceridi ma contenenti un gruppo fosfato e uno azotato al posto di uno dei tre acidi grassi. Ricoprono un ruolo strutturale molto importante nelle membrane cellulari ed il gruppo fosfato conferisce solubilità ai lipidi apolari e al colesterolo nelle lipoproteine.

Il colesterolo è una molecola lipidica costituita da 27 atomi di carbonio organizzati in quattro anelli policicloalifatici (condensati tra loro in formazione trans), una coda alifatica e gruppi funzionali. Esso è componente essenziale della membrana cellulare di tutte le cellule animali: si inserisce fra i due strati di fosfolipidi orientandosi con il gruppo -OH vicino alle teste polari dei fosfolipidi, diminuendo così la fluidità della membrana e aumentando la stabilità meccanica delle cellule.

Nei vertebrati il colesterolo può essere sintetizzato da qualsiasi tipo cellulare ma la maggior parte viene prodotta nel fegato. Una piccola quota è incorporata nelle membrane degli epatociti, mentre la quota maggiore è esportata sotto una delle due seguenti forme possibili:

- acidi biliari,
- colesterolo e suoi esteri.

Gli acidi biliari e i loro sali sono derivati del colesterolo relativamente idrofili, sintetizzati nel fegato per favorire la digestione dei lipidi.

Gli esteri del colesterolo si formano a partire dal colesterolo mediante l'azione dell'acil-CoA-colesterolo aciltrasferasi (ACAT). Questo enzima catalizza il trasferimento di un acido grasso dal coenzima A al gruppo ossidrilico del colesterolo, convertendolo in una forma ancora più idrofobica. Il colesterolo e i suoi esteri sono conservati negli epatociti o sono trasportati, insieme ad altri lipidi, sotto forma di lipoproteine secrete dal fegato a quei tessuti che utilizzano il colesterolo (Crook M. A. 2012), o escreti dall'organismo con la bile.

1.1.1 ACIDI GRASSI

Gli acidi grassi, componenti fondamentali dei lipidi semplici e complessi, sono molecole costituite da una catena di atomi di carbonio, denominata catena alifatica, con un solo gruppo carbossilico (-COOH) ad una estremità ed un gruppo metilico

(-CH₃) all'altra estremità; il resto della molecola è una catena di idrocarburi. La catena alifatica che li costituisce è tendenzialmente lineare e solo in rari casi si presenta in forma ramificata. La lunghezza di questa catena è estremamente importante, in quanto influenza le caratteristiche fisico-chimiche dell'acido grasso. Gli acidi grassi sono composti sintetizzati in natura attraverso la condensazione di unità di malonyl coenzima A per l'azione di un complesso multienzimatico chiamato "acidi grassi sintetasi". Gli acidi grassi di interesse biologico sono gli acidi carbossilici con un numero pari di atomi di carbonio (per lo più tra 4 e 26). Sono composti altamente insolubili in acqua e con un alto contenuto energetico. È possibile classificarli in quattro gruppi a seconda della lunghezza della catena carboniosa:

- Acidi grassi a catena corta (4-6 atomi di carbonio)
- Acidi grassi a catena media (8-12 atomi di carbonio)
- Acidi grassi a catena lunga (14-18 atomi di carbonio)
- Acidi grassi a catena molto lunga (20 o più atomi di carbonio)

Gli acidi grassi possiedono generalmente un numero pari di atomi di carbonio e possono presentare anche uno o più doppi legami nella catena alifatica. La presenza o meno di doppi legami fa variare la temperatura di fusione e la funzione degli acidi grassi e ne consente la classificazione in:

- Acidi grassi saturi quando la loro struttura chimica non contiene doppi legami (un esempio è dato dall'acido palmitico C16:0 e dall'acido stearico C18:0, dove C indica il numero di atomi di carbonio che costituiscono la catena e 0 indica l'assenza di doppi legami carbonio-carbonio) (Fig.2).

- Acidi grassi insaturi quando sono presenti uno o più doppi legami: nello specifico si parla di acidi grassi monoinsaturi (MUFA, o MonoUnsaturatedFattyAcids) se è presente un solo doppio legame (ad es: acido oleico C18:1); invece gli acidi grassi polinsaturi (PUFA, o Polyunsaturatedfattyacids) sono quelli che presentano più di un doppio legame (ad es: acido linoleico C18:2, acido linolenico C18:3, acido arachidonico C20:4) (Fig.2).

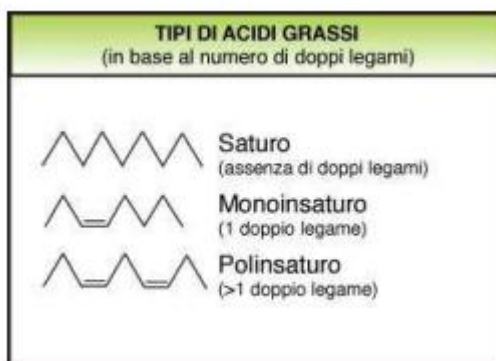


Figura 2: classificazione degli FA

Quando si trovano nella loro forma libera (cioè non legati ad altre specie chimiche), gli acidi grassi vengono identificati con il nome di acidi grassi liberi (FFA, o Free FattyAcids), o acidi grassi non esterificati (NEFA, o Non EsterifiedFattyAcids).

La presenza di un doppio legame nella catena alifatica implica l'esistenza di due conformazioni:

- cis se i due atomi di idrogeno legati ai carboni impegnati nel doppio legame sono disposti sullo stesso piano (Fig.3)
- trans se la disposizione spaziale è opposta. (Fig 3)

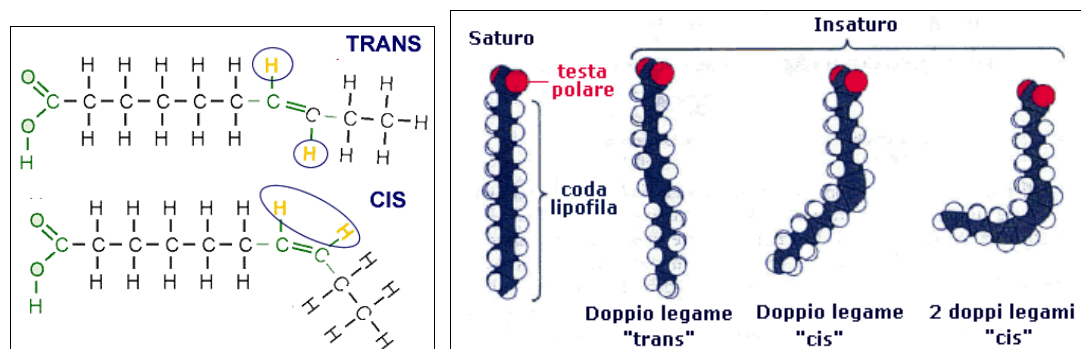


Figura 3: configurazione “cis” e “trans” dei doppi legami negli FA insaturi

Anche se molto rari ci sono anche acidi grassi trans con doppi legami. Questi acidi grassi si trovano nel grasso del latte e della carne dei ruminanti e si formano per effetto della flora ruminale. Gli acidi grassi con doppi legami di tipo trans sono rettilinei, come quelli saturi, a differenza di quelli con doppi legami tipo-cis che, presentano un angolo di circa 30 gradi (Fig. 3), un sito di attacco nella molecola.

Gli acidi grassi trans non possono essere sostituiti con il tipo cis dal punto di vista nutrizionale. Essi sono in grado di produrre la stessa quantità di energia, ma non

hanno le stesse proprietà biologiche. Gli acidi grassi naturali hanno un nome comune, oltre al nome sistematico (tabella 1).

Così per esempio l'acido grasso saturi a 16 atomi di carbonio, il cui nome sistematico è esadecanoico, è generalmente chiamato acido palmitico o 16:0 (16 atomi di carbonio e nessun doppio legame). Quando ci sono doppi legami la nomenclatura sistematica tradizionale indica cis oppure trans o la sua posizione a partire dal gruppo carbossilico. Così l'acido linoleico è chiamato in sistematica come 9-cis (Mataix e Gil, 2003).

ACIDI GRASSI	NUMERO DI ATOMI DI CARBONIO	NUMERO DI DOPPI LEGAMI	PRIMO DOPPIO LEGAME	CODICE
Acidi grassi saturi				
Butirrico	14	0	-	C4:0
Capronico	6	0	-	C6:0
Caprilico	8	0	-	C8:0
Caprinico	10	0	-	C10:0
Laurico	12	0	-	C12:0
Miristico	14	0	-	C14:0
Palmitico	16	0	-	C16:0
Stearico	18	0	-	C18:0
Arachico	20	0	-	C20:0
Behenico	22	0	-	C22:0
Lignocerico	24	0	-	C24:0
Acidi grassi monoinsaturi				
Palmitoleico	16	1	6	C16:1 ?6
Oleico	18	1	9	C18:1 ?9
Cetoleico	22	1	11	C22:1 ?11
Nervonico	24	1	9	C24:1 ?9
Acidi grassi polinsaturi				
Linoleico	18	2	6	C18:2 ?6
α -linolenico	18	3	3	C18:3 ?3
γ -linolenico (GLA)	18	3	6	C18:3 ?6
Arachidonico (AA)	20	4	6	C20:4 ?6
Eicoisapentenoico (EPA)	20	5	3	C20:5 ?3
Docosatetrenoico	22	4	6	C22:4 ?6
Docosapentenoico	22	5	3	C22:5 ?3
Docosapentenoico	22	5	6	C22:5 ?6
Docosaesaenoico (DHA)	22	6	3	C22:6 ?3

Tab. 1 Acidi grassi maggiormente frequenti negli alimenti di consumo abituale

Tuttavia risulta molto più utile e semplice indicare solo il numero di atomi di carbonio, il numero di doppi legami e la posizione del primo, contando a partire dal gruppo metilico con l'aggiunta di ω o "n", in modo che quelli con la stessa numerazione ω metabolicamente sono collegati l'uno con l'altro. Ad esempio l'acido linoleico viene indicato C18:2 o 18:2 n-6. Così viene indicato che vi è un doppio legame in posizione ω 6, nel carbonio numero 6 a partire dal gruppo metilico.

I restanti doppi legami sono situati a partire da questo doppio legame in modo non-coniugato, essendoci sempre un gruppo metilico tra i due. Pertanto, è noto che il successivo doppio legame è situato in ω 9.

Mentre gli acidi grassi saturi sono abbondanti negli animali terrestri, in particolare mammiferi, e nell'olio di provenienza vegetale, come quello di cocco o di palma, i monoinsaturi, il cui principale rappresentante è l'acido oleico (C18:1 n -9), sono presenti in tutti i grassi animali e oli vegetali, specialmente l'olio di oliva e l'olio di colza.

Tra gli acidi grassi polinsaturi gli ω 3 e ω 6 hanno una grande importanza; essi variano per la posizione del doppio legame rispetto al gruppo metilico posto all'estremità della molecola.

Il principale acido grasso ω 6 è l'acido linoleico (18:2 n-6) che è abbondante negli oli vegetali di mais, soia e girasole. Gli acidi grassi ω 3 si trovano in piccole quantità in alcuni oli vegetali e piante, la loro fonte principale sono gli animali marini. L'acido linolenico (18:3 n-3) abbonda nelle piante (nell'olio di colza e soia e in grandi quantità nell'olio di lino); l'acido eicosapentaenoico (EPA, 20:5 n-3) e il docosaesaenoico (DHA, 22:6 n-3) sono abbondanti nei pesci, molluschi marini negli oli o grassi di origine sia animale che vegetale (alghe, microalga, ecc).

La famiglia dei PUFA ω 3 deriva dall'acido linolenico mentre la famiglia ω 6 deriva dall'acido linoleico, questi, a sua volta, producono diverse sostanze con attività regolatrice e biologica, note generalmente come eicosanoidi.

La via metabolica dei PUFA ω 3 e ω 6 utilizza lo stesso insieme di enzimi e possono competere gli uni con gli altri. Se l'assunzione di uno di essi è in eccesso, può interferire con il metabolismo di un altro, il che conduce alla perdita di equilibrio nella produzione di prostaglandine, leucotreni e trombossani.

L'acido linoleico e α -linolenico sono considerati essenziali perché non possono essere sintetizzati dall'organismo e, pertanto, devono essere assunti attraverso la dieta. Sono necessari per la crescita e lo sviluppo così come per il mantenimento di una buona salute.

1.2: LE LIPOPROTEINE ED IL LORO METABOLISMO

1.2.1 LE LIPOPROTEINE

Nel plasma i lipidi sono trasportati all'interno di particelle denominate lipoproteine. Queste sono complessi multimolecolari che svolgono un ruolo importante nel trasporto dei lipidi tra gli organi di sintesi e di assorbimento (fegato e intestino) e i tessuti periferici.

Le lipoproteine sono particelle globulari di diversa massa costituite da specifiche proteine trasportatrici, chiamate apolipoproteine, e da combinazioni diverse di fosfolipidi, colesterolo, esteri del colesterolo e triacilgliceroli. In tutte le lipoproteine i lipidi più insolubili, trigliceridi ed esteri del colesterolo, sono componenti del "core", mentre i lipidi più polari, quali apoproteine, fosfolipidi e colesterolo non esterificato, sono localizzati sulla superficie (Figura6).

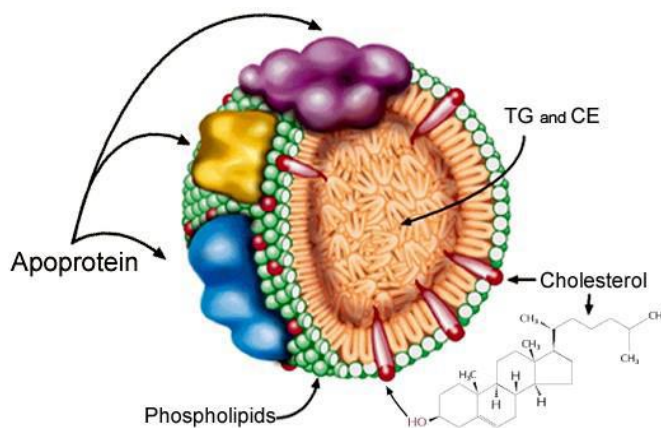


Figura 6: Struttura delle lipoproteine

Le lipoproteine differiscono tra loro per densità, composizione lipidica e natura della porzione apolipoproteica. Le apolipoproteine sono un gruppo specializzato di proteine che determinano il destino metabolico delle particelle lipoproteiche; esse, infatti, agiscono non solo come elementi strutturali che stabilizzano le particelle (ApoB, ApoAI, ApoAII), ma anche come ligandi di recettori di membrana (ApoB, ApoE) e come attivatori o inibitori di enzimi (ApoAI, ApoC-II, C-III) o sistemi di trasporto (ApoA-IV, ApoF) (Ginsberg HN,1998; Patsch W et a., 1996).

Le dimensioni delle lipoproteine aumentano proporzionalmente al contenuto in trigliceridi ed esteri del colesterolo.

La densità delle lipoproteine è proporzionale al contenuto proteico ed è inversamente proporzionale al contenuto lipidico; infatti il guscio delle lipoproteine è più denso rispetto al nucleo. Da tale rapporto ne deriva che:

le lipoproteine più piccole risultano più dense, in quanto in esse prevalgono i lipidi polari e le proteine del guscio, rispetto ai lipidi apolari del nucleo; le lipoproteine più grandi, invece, nelle quali prevalgono i trigliceridi del nucleo rispetto ai lipidi polari del guscio, presentano una densità più bassa.

Sulla base della loro densità, diametro (Fig.7), composizione e mobilità elettroforetica furono originariamente identificati cinque principali tipi di lipoproteine plasmatiche :

- chilomicroni
- lipoproteine a densità molto bassa (very low density lipoproteins, VLDL)
- lipoproteine a densità intermedia (intermediate density lipoproteins, IDL);
- lipoproteine a bassa densità (low density lipoproteins, LDL)
- lipoproteine ad alta densità (high density lipoproteins, HDL);

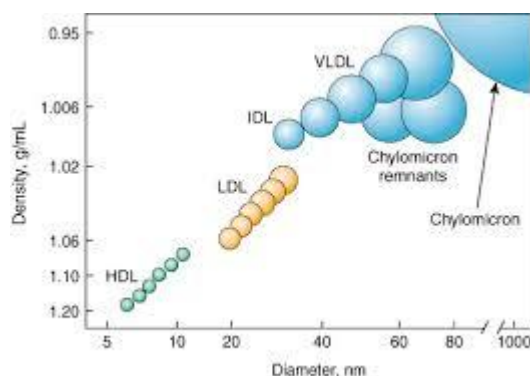


Figura 7: classificazione delle lipoproteine

I chilomicroni sono le particelle lipoproteiche di maggiori dimensioni (circa 1000 nm). Hanno una densità di circa 0,900 g/ml e si portano spontaneamente in superficie nel plasma lasciato per 24 ore a 4° C. Sono costituiti per il 98% da lipidi (trigliceridi ed esteri del colesterolo) e per l'1-2% da proteine quali ApoB48, ApoC e ApoA-I, oltre a piccole quantità di ApoE, ApoA-II e ApoA-IV. Sono sintetizzati dalle cellule epiteliali dell'intestino tenue e vengono rilasciati nel torrente circolatorio attraverso le vie linfatiche (vasi chiliferi e dotto toracico). Queste lipoproteine trasportano i trigliceridi di provenienza alimentare e sono presenti nel sangue nella fase dell'assorbimento intestinale.

Le VLDL o “*very low density lipoproteins*” hanno una densità fino a 1,006 g/ml. Sono lipoproteine costituite per il 60% da trigliceridi, per il 10% da colesterolo e fosfolipidi e per il 10% da proteine, quali ApoB-100, che rappresenta la maggiore componente proteica, ApoE e ApoC . Esse contengono, a differenza dei chilomicroni, soprattutto i trigliceridi “endogeni“ sintetizzati nel fegato (sintesi endogena).

Le IDL o “*Intermediate Density Lipoproteins*” hanno una densità compresa tra 1,006 e 1,019 g/ml. Sono particelle di diametro compreso tra 25-35 nm e costituite per il 20-40% di colesterolo, 15-25% di fosfolipidi e per il 20-50% di trigliceridi.

Le apolipoproteine strutturali sono apoB-100, apoE e apoC.

Le LDL o “*low density lipoproteins*”, con densità compresa tra 1,019 e 1,063 g/ml, sono particelle con un diametro medio di 18-22 nm. Sono costituite per il 40-50% da colesterolo, 20-25% da fosfolipidi, 5-15% da trigliceridi; la componente apolipoproteica delle LDL è costituita per il 95% l’ApoB-100. La loro funzione biologica è quella di trasportare il colesterolo ai tessuti periferici.

Le HDL o “*high density lipoproteins*”, che sono isolate tra le densità di 1,063 e 1,210 g/m, contengono colesterolo e fosfolipidi in proporzioni praticamente uguali, con un contenuto di proteine di oltre il 50%. A loro volta le HDL possono essere suddivise in ulteriori sottofrazioni, ovvero HDL₂ e HDL₃. Le HDL₃ sono meno ricche in lipidi e ricevono via via colesterolo libero e fosfolipidi trasformandosi in HDL₂. Le funzioni delle HDL sono numerose: oltre che mediare il trasporto inverso del colesterolo dai tessuti periferici al fegato, proteggono le LDL dalla ossidazione e inibiscono l’espressione di molecole di adesione da parte delle cellule endoteliali.

1.2.2 METABOLISMO DELLE LIPOPROTEINE

Il destino dei lipidi nel plasma segue tre vie principali: la prima, la via esogena, rende conto del metabolismo dei lipidi introdotti con la dieta ed è legata principalmente ai chilomicroni; la seconda, la via endogena, ha inizio con la secrezione di VLDL da parte del fegato; la terza, il trasporto inverso del colesterolo, ha come protagonisti principali le HDL e catalizza il ritorno del colesterolo al fegato per le vie metaboliche finali. Sia la via esogena che quella endogena contribuiscono ai livelli di lipidi circolanti (Figura 8).

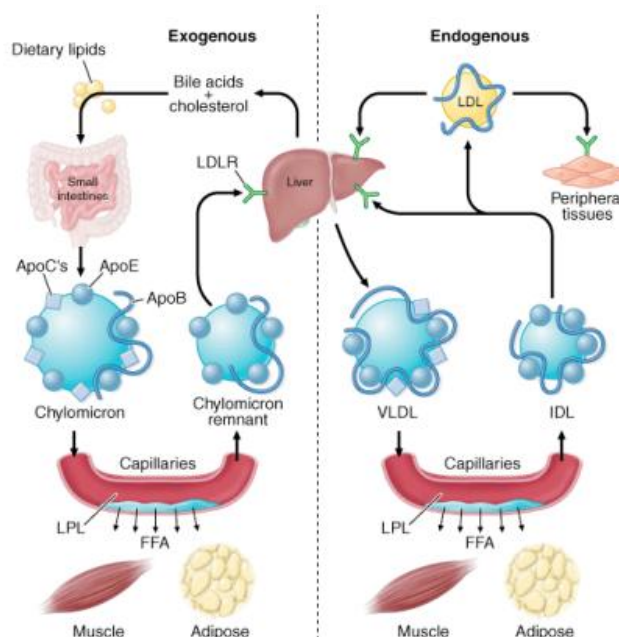


Figura 8: Metabolismo delle lipoproteine: la via esogena e la via endogena.

1) La via esogena del colesterolo

La via esogena inizia con l'assorbimento dei lipidi a livello intestinale. Dopo l'assorbimento dal tratto gastroenterico, il colesterolo ed i trigliceridi provenienti dalla dieta sono associati ad una serie di apoproteine a formare i chilomicroni. I chilomicroni sono sintetizzati nelle cellule epiteliali dell'intestino tenue e vengono rilasciati nella circolazione sanguigna attraverso le vie linfatiche. Appena i chilomicroni passano nei capillari entrano in contatto con la lipoprotein lipasi (LPL) associata alle cellule endoteliali. L'ApoC-II associata ai chilomicroni, attiva l'LPL che idrolizza i trigliceridi a glicerolo e acidi grassi liberi che vengono captati rapidamente dal muscolo e dal tessuto adiposo. L'ApoE presente sulla superficie dei chilomicroni favorisce l'ancoraggio agli eparansolfato-proteoglicani (HSPG) della membrana cellulare rendendo accessibili i chilomicroni all'azione della LPL. L'ApoCI e l'ApoCIII hanno un'azione inibitoria sui processi lipolitici in quanto facilitano la dissociazione dell'ApoE dalle lipoproteine, oltre ad essere in grado di mascherare i siti di legame per la LPL ed ad inibire l'azione dell'ApoCII. In seguito all'azione lipolitica mediata dalla LPL, il centro dei chilomicroni, ricco in trigliceridi, progressivamente condensa portando ad un eccesso di componenti dello scheletro esterno (FC, PL, ApoAI, e ApoAII) che vengono trasferiti alle HDL.

nascenti. Contemporaneamente i chilomicroni ricevono dalle HDL ApoE e le varie ApoC. In seguito a queste modificazioni e alla perdita di trigliceridi i chilomicroni si trasformano in particelle più piccole definite remnants dei chilomicroni.

I chilomicroni residui sono raccolti dal fegato in un processo di endocitosi mediata da recettori: il legame tra apoproteine E e recettori specifici sulla superficie degli epatociti promuove la captazione della particella che viene poi degradata nei lisosomi; più del 50% dei remnants dei chilomicroni vengono captati dal fegato attraverso l'interazione con il recettore delle LDL (LDLR).

Esiste tuttavia un'altra via attraverso la quale i remnants dei chilomicroni vengono captati nel fegato, quella che coinvolge il passaggio di queste particelle attraverso le fenestrature tra le cellule endoteliali dei capillari epatici, dove i remnants si legano agli HSPG facilitandone l'interazione con un altro recettore della famiglia dei LDLR, l'LRP (proteina legata al recettore delle lipoproteine), un recettore di superficie in grado di legare diversi ligandi tra cui lipoproteine, proteasi e inibitori di proteasi responsabile dell'endocitosi.

Quindi la funzione dei chilomicroni è quella di trasferire i triacilgliceroli alimentari ai tessuti per il mantenimento dei depositi o per le loro necessità energetiche. Inoltre, trasportano il colesterolo alimentare al fegato che lo immette nella bile in forma immodificata o dopo conversione ad acidi biliari e lo distribuisce ai tessuti extraepatici mediante altre lipoproteine.

2) La via endogena del colesterolo

La via endogena ha inizio con la secrezione di VLDL da parte del fegato (Shelness GS et al., 2001) ed è sempre attiva anche se la maggiore attività si ha nella fase post-prandiale. Lipidi di nuova sintesi sono aggiunti alle particelle residue andando a costituire le VLDL, ricche in trigliceridi, le quali verranno poi rilasciate nella circolazione sistemica.

L'assemblaggio delle VLDL ha inizio ad opera della proteina di trasferimento microsomiale (MTP) che trasporta i lipidi verso l'apolipoproteina B-100, in corso di sintesi. In funzione dell'ulteriore associazione con lipidi, che avviene in un secondo tempo, si generano VLDL di diverse dimensioni: dalle VLDL 1, ricche in trigliceridi, a quelle più piccole e dense, ricche in colesterolo esterificato chiamate VLDL 3. Una volta in circolo, le VLDL, così come i chilomicroni, sono soggette all'azione lipolitica della LPL, che idrolizza il core ricco in trigliceridi, aumentando la percentuale di colesterolo esterificato; le particelle a questo punto diventano più piccole e più dense e vengono chiamate IDL. Le componenti del guscio

esterno in eccesso, in particolare FC, PL, le varie ApoC e l'ApoE sono trasferite alle HDL. La grande maggioranza dei remnants sono catturati nuovamente dal fegato con un meccanismo simile a quello dei remnants dei chilomicroni.

Le IDL vengono metabolizzate dalla LPL e dalle lipasi endoteliale (LIPG) che mostra una spiccata affinità per le IDL. Dalla lipolisi delle IDL si generano le LDL, ricche in colesterolo esterificato e con un minor contenuto di trigliceridi rispetto alle VLDL. La particella LPL è captata dall' LDLR espressa in tutte le cellule di mammifero, capace di riconoscere come ligandi sia l'ApoB100 che l'ApoE. Le particelle legate sono internalizzate per endocitosi e vanno nei lisosomi, dove una esterasi lisosomiale, la lipasi acida, idrolizza gli esteri del colesterolo rendendo tale lipide disponibile per una serie di reazioni, quali la formazione di membrane, la sintesi di ormoni steroidei, ecc. Prima di interagire con i recettori cellulari, le LDL possono subire modificazioni legate principalmente all'attività della proteina di trasferimento degli esteri del colesterolo (CETP), che media il trasferimento di trigliceridi e colesterolo esterificato tra lipoproteine (Morton RE, 1999). In particolare, i trigliceridi delle VLDL sono trasferiti alle LDL e alle HDL in cambio di esteri del colesterolo. Questi interscambi diminuiscono il contenuto di colesterolo estere delle LDL e aumentano il contenuto di trigliceridi, rendendo queste particelle più suscettibili all'azione lipolitica dalla parte della HL. Il risultato finale è la formazione di LDL più piccole e dense ritenute più aterogene delle LDL normali. La rimozione dal circolo delle LDL è dovuta per due terzi al sistema recettoriale e per un terzo ad una via alternativa, dipendente da recettori non saturabili e non modulabili, posti su cellule prevalentemente di tipo macrofagico: le *scavengers cells*. Questa via alternativa si attiva in presenza di LDL modificate (per acetilazione, ossidazione, ecc.) e l'accumulo progressivo di esteri del colesterolo fa assumere alla cellule *scavengers* un aspetto schiumoso (foam cell); la necrosi cellulare comporta poi la liberazione del materiale lipidico.

3) Il trasporto inverso del colesterolo mediato dalle HDL

Il concetto di "trasporto inverso del colesterolo" (RCT) è stato introdotto per la primavolta da Ross e Glomset nel 1968 per descrivere il meccanismo attraverso il quale il colesterolo extra-epatico (di origine periferica) è trasportato al fegato per poi essere escreto nella bile ed infine nelle feci (Glomset 1968) (Figura I). Il "trasporto inverso del colesterolo" rappresenta una delle funzioni principali delle HDL, in

quanto svolgono un ruolo centrale in tale processo, (Owen JS and Mulcahy JV, 2002).In particolare, le HDL, agendo come accettori di colesterolo, promuovono l'efflusso di colesterolo dalle cellule ed il trasporto al fegato, dove esso può essere secreto nella bile e poi escreto nelle feci, completando, in questo modo, la via metabolica del trasporto inverso del colesterolo.

Il ritorno del colesterolo "periferico" al fegato è necessario per bilanciare l'uptake e la sintesi de novo, in modo da mantenere costante l'omeostasi del colesterolo in tutto il corpo (Cuchel et al. 2006).

Il colesterolo è un fondamentale componente delle membrane eucariotiche ed un importante precursore degli ormoni steroidei e degli acidi biliari. È stato dimostrato che il rapporto tra colesterolo libero (FC) e fosfolipidi (FL) all'interno delle membrane cellulari è rilevante nel mantenere il giusto range di fluidità della membrana stessa. Il colesterolo è abbondante nelle membrane plasmatiche cellulari e nell'apparato di Golgi, in particolare nelle aree delle membrane plasmatiche ricche di proteine coinvolte nella trasduzione dei vari segnali (Lange 1991). Quasi tutte le cellule animali sintetizzano colesterolo e, in aggiunta a quello sintetizzato de novo al loro interno, lo acquisiscono anche dalle lipoproteine circolanti. Quando il colesterolo cellulare è in eccesso, tanto da superare la possibilità di associazione con i fosfolipidi nelle membrane o l'esterificazione e lo stoccaggio in goccioline lipidiche, diviene citotossico. Sono stati proposti diversi meccanismi per spiegare tale citotossicità (Tabas I, 2002).Le cellule extra-epatiche richiedono l'intervento fisiologico dell'RCT per catabolizzarlo, perché incapaci di farlo da sé (Cuchel et al. 2006). L'RCT ha inizio a partire dai tessuti periferici, e proprio per questo motivo che viene considerato un processo "periferico".

Il processo dell'RCT, nel suo insieme, può essere riassunto in tre principali steps:

- 1) L'uptake del colesterolo dalle cellule a specifici accettori extracellulari, che prende il nome di efflusso cellulare di colesterolo;
- 2) Il 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.

È stato ben stabilito e dimostrato che uno dei passaggi chiave nel prevenirne l'accumulo, limitante per l'intero meccanismo, è l'efflusso cellulare di colesterolo

dal compartimento intracellulare ad accettori extracellulari, fisiologicamente rappresentati dalle HDL.

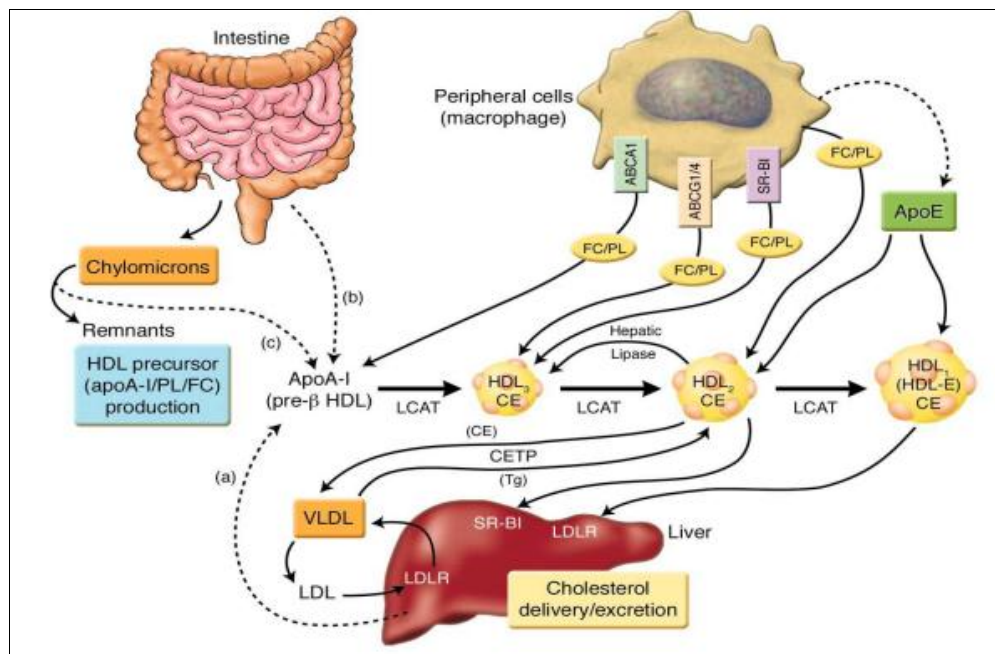


Figura 9: Trasporto inverso del colesterolo

Dunque, i livelli di HDL condizionano il pathway metabolico del “Trasporto Inverso del Colesterolo” e di conseguenza il pool di colesterolo intraepatico.

Le HDL nascenti (sferoidali) vengono secrete dal fegato e dall’intestino come apoAI povere in lipidi o piccole particelle contenenti ApoAI e fosfolipidi. Queste particelle raccolgono colesterolo rilasciato nel plasma da cellule in disfacimento e dal turnover delle membrane diventando pre-beta HDL. L’efflusso di colesterolo dalle cellule alle pre-beta HDL avviene mediante il trasportatore di membrana chiamato *ATP binding cassette A1* (ABCA1) (Santamarina-Fojo et al., 2001) ABCA1 è una proteina cellulare che facilita il passaggio del colesterolo cellulare alle ApoAI povere di lipidi. Le cellule periferiche ed in particolare i macrofagi sono dotati di altre vie di efflusso di colesterolo in eccesso verso le HDL, quali le proteine ABCG1 e ABCG4.

Una volta incorporato nelle pre-beta HDL, il colesterolo libero è esterificato ad opera della *lecitina-colesterolo acil trasferasi* (LCAT), enzima che utilizza apoAI come cofattore e che è presente nelle particelle stesse. A questo punto, le HDL mature, ricche in lipidi e sferiche, grazie all’intervento di un trasportatore bidirezionale chiamato *scavenger receptor B1* (SR-B1) (Acton et al. 1996) che carica di lipidi le

HDL nascenti. Per prime si formano le HDL3 ancora dense e povere in lipidi, man mano che si arricchiscono in colesterolo libero, subito esterificato ad opera dell'LCAT, le HDL3 si trasformano in HDL2 più grandi, meno dense e ricche in lipidi. Le HDL con mobilità elettroforetica α , possono essere rimosse dal circolo attraverso due meccanismi: le HDL2 possono interagire con lo stesso trasportatore scavenger receptor B1 (SR-B1) (Acton et al. 1996), che estrae selettivamente esteri del colesterolo e converte le HDL2 ricche in lipidi in HDL3 povere in lipidi, oppure attraverso l'attività della CETP si arricchiscono in trigliceridi, cedendo colesterolo esterificato, diventando così suscettibili all'attività lipolitica della lipasi epatica (HL) rendendole anche in questo caso HDL3

Il ciclo si conclude poi con il rimodellamento delle alfa-HDL mature e la rigenerazione delle molecole di ApoAI iniziali (Barter et al 2002).

1.3 PROTEINE CHIAVE DEL METABOLISMO DELLE HDL

1.3.1 ATP-BINDING CASSETTE A1 (ABCA1)

ABCA1 è una proteina integrale di membrana composta da 2261 amino-acidi, contenente 12 domini transmembrana con due larghi "loops" extracellulari altamente glicosilati ed uniti da uno o più legami cisteinici, un loop citoplasmatico contenente una regione idrofobica e due nucleotide-binding domains citoplasmatici (Oram 2002). Fa parte della famiglia delle *ATP-binding cassette* (ABC) transporters caratterizzate da un motivo strutturale comune e dall'utilizzo di ATP come sorgente di energia per il trasporto di diversi substrati, quali ioni, lipidi e citotossine.

ABCA1 ha un ruolo importante nel pathway del trasporto inverso del colesterolo poiché determina la traslocazione di fosfolipidi e colesterolo non esterificato attraverso la membrana verso l'apo A1. Dati in letteratura suggeriscono sia richiesta per l'efflusso una interazione di apoAI, con il dominio lipidico, e ABCA1. È stato quindi proposto un modello in cui l'elica 10 di apoAI inizialmente interagisce con il dominio lipidico associato ad ABCA1 e successivamente fluisce lateralmente nella membrana per formare un legame con ABCA1. Tutto ciò porta alla lipidazione dell'apolipoproteina per la formazione delle HDL (Panagotopoulos et al. 2002). L'energia necessaria per trasferire colesterolo e fosfolipidi è fornita dal legame di una molecola di ATP con due domini intracellulari dedicati (Jiyoung Lee et al., 2002)-

La proteina ABCA1 è altamente espressa nel fegato, ghiandole surrenali, piccolo intestino e cervello oltre che in altri tessuti. L'espressione macrofagica di ABCA1 è regolata a livello trascrizionale da recettori nucleari quali LXR α e LXR β (liver X receptor) che agiscono come eterodimeri con recettore RXR (retinoid X receptor). I ligandi endogeni per LXR sono ossisteroli generati dall'azione enzimatica intracellulare sul colesterolo. In questo modo l'accumulo di colesterolo intracellulare promuove la formazione di ossisteroli che attraverso l'azione su LXR promuovono un aumento nell'espressione di ABCA1 e ABCG1 e di conseguenza di efflusso di colesterolo sia ad apoAI che ad HDL. Mutazioni in eterozigosi nel gene ABCA1 causano un deficit familiare di HDL (FHD), invece una mutazione in omozigosi è responsabile della malattia di tangier (TG), caratterizzata da livelli estremamente bassi di colesterolo HDL, riduzione del colesterolo totale e da un aumento dei trigliceridi nel siero (M. Marcil et al. 1999, S. Rust et al. 1999, M. Bodzioch et al. 1999, A.T. Remaley et al., Brooks-Wilson et al. 2001). Il mal funzionamento di ABCA1, infatti, fa sì che apoAI rimanga povera in lipidi e venga rapidamente rimossa ed eliminata dai reni, prevenendo la formazione delle HDL (Knight 2004). A supporto di tale tesi si è visto che macrofagi privi di ABCA1 manifestavano una marcata riduzione dell'efflusso di colesterolo ad apoAI in vitro.

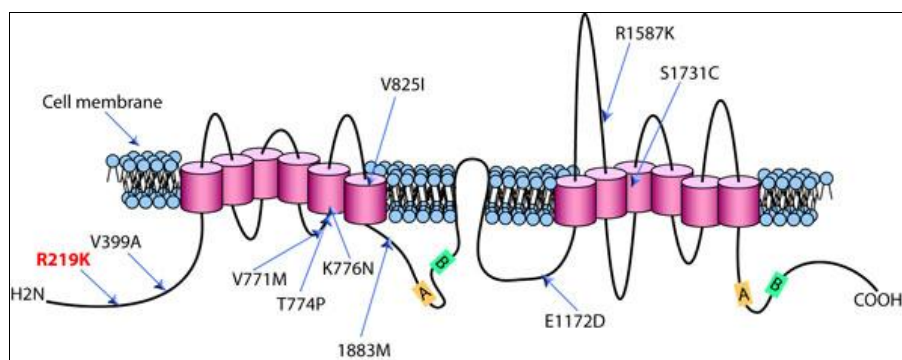


Figura 10: Rappresentazione della proteina ABCA1

1.3.2 LECITIN-CHOLESTEROL ACYL TRANSFERASE (LCAT)

LCAT è un enzima che permette la trasformazione del colesterolo libero in esterificato aggiungendo ad esso un gruppo acilico prelevato dalla lecitina. Dunque ha un ruolo importante nella maturazione delle HDL. Il deficit dell'LCAT porterebbe

ad una riduzione delle HDL mature circolanti, e ad elevati valori di trigliceridi (Fielding, C. 1995, e Glomset, J. A. 1979).

1.3.3 LIPASI EPATICA (HL)

HL è un enzima lipolitico di 66 kDa sintetizzato nel fegato e poi ancorato sull'endotelio vascolare del fegato mediante gli eparansolfato proteoglicani di membrana (Jansen et al. 1978, Kuusi et al. 1979, Doolittle et al. 1987). L'HL idrolizza i trigliceridi e i fosfolipidi presenti inizialmente sui chilomicroni, sulle IDL e sulle HDL (Grosser et al. 1981, Bensadoun et al. 1996). Evidenze sperimentali supportano un coinvolgimento della HL sul metabolismo delle HDL. La sua over-espressione mediante adenovirus ricombinanti (Applebaum – Bowden et al. 1996, Dugi et al. 1997, Amar et al. 1998, Kobayashi et al. 1996) o mediante manipolazioni genetiche decrementa i livelli plasmatici di HDL in diversi modelli animali (Busch et al. 1994, Fan et al. 1994, Dichek et al. 1998), di contro un deficit di HL negli umani (Breckenridge, W. C. et al. 1982, Santamarina-Fojo S. et al. 1998) o nei roditori, indotto tramite infusione di anticorpi anti-HL (Grosser J. et al. 1981, Kuusi T et al. 1979, Marqus.Vidal et al. 1994, Goldberg et al. 1982) o tramite knock out del gene (Homanics et al. 1995), porta ad un aumento della concentrazione plasmatica delle HDL. La lipasi epatica è responsabile dell'aumento dell'uptake delle HDL nel fegato di ratti (Marques-Vidal et al. 1994, Kadowaki et al. 1992) e in cellule in coltura (Komaromy et al.1996, Ji et al. 1997, Rinninger et al. 1998, Bamberger et al. 1983, Collet et al. 1990), ma il pathway metabolico attraverso il quale tale processo si realizza resta da stabilire.

Studi recenti dimostrano che l'HL, oltre alla sua attività lipolitica, presenta una funzione di ligando che, mediando l'interazione delle lipoproteine con i proteoglicani di superficie e i recettori, facilita l'uptake cellulare delle lipoproteine. (Krapp et al. 1996, Kounnas et al. 1995, Rinninger et al. 1998). Inoltre mediante la sua attività lipolitica è in grado di realizzare un rimodellamento delle HDL rendendo il loro core di esteri di colesterolo più accessibile all' uptake selettivo tramite SR-B1.

1.3.4 SCAVENGER RECEPTOR B1 (SR-B1 o CLA-1)

SR-B1 è un recettore della famiglia “*scvenger*”, possiede un ampio dominio extracellulare glicosilato composto da 408 aminoacidi, contenente 6 residui cisteinici. Il dominio extracellulare è ancorato alla membrana da due domini

transmembrana N e C- terminali con una corta coda citoplasmatica (Yancey et al. 2003). È espresso nei tessuti impegnati nell'uptake selettivo di lipidi come il fegato e le ghiandole steroidee nonché in molte altre cellule inclusi i macrofagi e le cellule endoteliali. SR-BI media un flusso bidirezionale di colesterolo libero tra la cellula e le HDL in cui il movimento dipende dal gradiente di concentrazione. Esso è in grado di legare con elevata affinità le HDL, mediando così la captazione di esteri del colesterolo dalle HDL, da parte del fegato e dei tessuti steroidei. Studi su topi transgenici (*Wang et al. 1998., Sehayek et al.1998*) hanno mostrato come SR-BI acceleri l'internalizzazione epatica delle HDL con successiva eliminazione nella bile del colesterolo portando così ad un effetto antiaterogeno; Il topo knockout per SR-B1 mostra, invece, livelli plasmatici di HDL-colesterolo più alti (Rigotti et al. 1997, Varban et al.1998). La spiegazione di questo comportamento risiede nella sua doppia attività nel RCT, ovvero sia nella fase di efflusso cellulare sia nella fase di metabolismo epatico delle HDL.

1.4 HDL, ACIDI GRASSI E MALATTIA CARDIOVASCOLARE

L'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) definisce le malattie cardiovascolari (CVD), come un gruppo di malattie del cuore e dei vasi sanguigni che comprende: la malattia coronarica (CHD), malattia cerebrovascolare, malattia arteriosa periferica, malattia cardiaca reumatica, malattia cardiaca congenita, e trombosi venosa profonda ed embolia polmonare (O'Flaherty M et al., 1960).

Le malattie cardiovascolari sono la principale causa di morte in Europa, negli Stati Uniti e in gran parte dell'Asia. Ci sono diversi fattori di rischio associati al loro sviluppo, tra questi il colesterolo totale, i trigliceridi, l'ipertensione, il diabete e i bassi livelli di colesterolo HDL. Molti di questi fattori di rischio sono influenzati dalla dieta (Carrero et al., 2005).

Nella maggior parte dei casi, la causa di CVD è l'aterosclerosi, una condizione patologica progressiva caratterizzata da una infiammazione cronica delle arterie, che si sviluppa nel corso degli anni (Ross R, 1995; Nabel EG e Braunwald E, 2012).

L'aterosclerosi è una patologia infiammatoria, cronica, progressiva caratterizzata dall'accumulo di lipidi ed elementi fibrosi nell'intima (in particolar modo nello spazio subendoteliale) delle arterie muscolari ed elastiche di grosso e medio calibro quali aorta, carotidi, coronarie e vasi degli arti inferiori. Le lesioni si verificano principalmente a livello delle biforcazioni e degli archi in cui il flusso passa da laminare a turbolento.

L'evento precoce di tale patologia è rappresentato dalla formazione della così detta "stria lipidica", ovvero di un accumulo di lipidi nello spazio subendoteliale e la produzione di cellule schiumose (macrofagi ripieni di colesterolo). Nell'uomo la formazione delle strie lipidiche (lesione reversibile) avviene precocemente tra la prima e la seconda decade di vita. Tali lesioni non sono sintomatiche ma possono portare alla formazione di lesioni più avanzate, in cui è presente un core lipidico necrotico contenuto in un cappuccio fibroso ricco di cellule muscolari lisce (vascular smooth muscle cells, VSMCs). Le placche così formate vanno incontro ad un rimaneggiamento continuo e sono soggette a complicanze di diversa natura, come ad esempio la rottura, l'embolizzazione, l'emorragia e la calcificazione.

L'eziologia dell'aterosclerosi è multifattoriale e non è ancora del tutto nota. I fattori predisponenti possono essere raggruppati in: fattori con una componente genetica e fattori ambientali. I fattori di rischio genetici principali sono gli elevati livelli di

lipoproteine a bassa o molto bassa densità (LDL e VLDL), i ridotti livelli di lipoproteine ad alta densità (HDL), gli elevati livelli di lipoproteina Lp(a), l'ipertensione arteriosa, l'iperomocisteinemia, il sesso e l'infiammazione sistemica. Tra i fattori di rischio ambientali ritroviamo la dieta ad alto contenuto di grassi saturi e colesterolo, fumo di sigaretta, ridotto esercizio fisico, ridotti livelli di antiossidanti, agenti infettivi (es. *Chlamydia pneumoniae*)

1.4.1 HDL E MALATTIA CARDIOVASCOLARE

Elevati livelli plasmatici di colesterolo rappresentano uno dei principali fattori di rischio per CHD. Dal punto di vista clinico, l'importanza della correlazione tra elevati livelli di lipidi nel plasma ed aumento dell'infiltrazione lipidica nella parete arteriosa è stata ampiamente descritta in una lunga serie di studi. Studi clinici ed epidemiologici hanno dimostrato che livelli plasmatici di colesterolo totale (TC) e di colesterolo legato alle lipoproteine a bassa densità (LDL-C) sono correlati linearmente con il rischio di CHD (Castelli WP, et al., 1992)

Tuttavia, accanto agli elevati valori di LDL-C, vi sono altri fattori, associati a dislipidemia, che contribuiscono all'aumento del rischio per CHD. Tra questi, grande importanza è stata riconosciuta ai bassi livelli di HDL-C (Gotto AM Jr and Brinton EA, 2004). Vi sono molti studi che evidenziano come tra livelli plasmatici di HDL ed insorgenza di CHD vi sia una relazione stretta e consistente. Lo studio di Framingham, ad esempio, ha mostrato come i soggetti con i valori di HDL più elevati esibiscono il rischio più basso di sviluppare malattia arteriosa e coronarica (CAD) (Castelli WP, et al., 1986). Inoltre, sempre lo stesso studio ha evidenziato l'esistenza di una relazione inversa tra HDL-C ed incidenza di CAD; da successivi follow up, è poi emerso che ogni incremento di HDL-C dell'1% poteva essere associato ad una riduzione del 2% del rischio di sviluppare CAD (Castelli WP, et al., 1992).

Altri studi, come l'US Physicians' Health Study, gli studi PROCAM, Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) e lo stesso Framingham, hanno mostrato che basse concentrazioni di HDL nel siero (<40 mg/dl in entrambi i sessi, o <40 mg/dl negli uomini e <50 mg/dl nelle donne) (Chapman MJ, et al., 2004) costituiscono un fattore di rischio indipendente per CHD, sia in soggetti diabetici che non-diabetici (Maron DJ, 2000; Sharrett AR, et al., 2001; Gotto AM Jr and Brinton EA, 2004). Studi prospettici hanno rivelato che il rischio d'insorgenza di CHD s'innalza del 3% nelle

donne e del 2% negli uomini per ogni calo di 1 mg/dl di HDL-C (Wilson PW, 1990). Al contrario, alte concentrazioni di HDL (>60 mg/dl), oltre a predisporre ad un minor rischio di eventi cardiovascolari avversi, sono tipicamente associate a longevità (Barter P, 2004).

La prevalenza di bassi livelli di HDL può variare tra il 20%, nella popolazione generale, ed il 60%, in pazienti con CHD (Franceschini G, 2001). Bassi livelli di HDL, inoltre, non sono solo associati con un aumento dell'incidenza di CHD, ma anche con un maggiore rischio di sviluppare aterosclerosi carotidea, morte per stroke ischemico ed un quadro di progressione aterosclerotica particolarmente aggressivo, definito angiograficamente malattia arteriosa coronaria (CAD) (Maron DJ, 2000; Gotto AM Jr and Brinton EA, 2004). È, perciò, importante delineare le caratteristiche e le funzioni delle lipoproteine ed, in particolar modo, delle HDL, per comprendere il loro ruolo nel metabolismo lipidico ed individuare i processi biologici che possono costituire un possibile bersaglio d'intervento terapeutico.

1.4.2 FUNZIONI DELLE HDL

È ormai da molti anni che alle HDL viene attribuito un ruolo protettivo nei confronti della malattia aterosclerotica. Studi sperimentali, epidemiologici e clinici sono stati concordi nei loro risultati ed il concetto che le HDL siano particelle antiaterogene è ampiamente condiviso. Il perché le HDL esercitino un effetto opposto a quello delle altre lipoproteine circolanti è attribuibile non solo alla loro funzione biologica principale e cioè il trasporto inverso del colesterolo, ma anche ad una serie di proprietà ancillari, ma non per questo meno importanti, che consistono in un'azione antiossidante, antiinfiammatoria, antiaggregante e di stimolo alla produzione di ossido nitrico.

1) Azioni anti-infiammatorie e antiossidanti

Le HDL devono gran parte della loro funzione ateroprotettiva alle loro intrinseche proprietà antiossidanti [Kotosai M et al.;2013]; 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 [Mackness B, Mackness M; 2012]. 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: i lipidi ossidati possono essere ridotti dalla ApoA-I e da altre componenti delle HDL con attività riducente (Zerrad-Saadi A et al.; 2009; Sattler W et al.; 1995; Christison JK et al.; 1995; Garner B, Witting PK et al.; 1998; Garner B, Waldeck AR et al.; 1998), oppure possono essere idrolizzati dagli enzimi idrolitici associati alle HDL (Navab M et al.; 2004; Van Lenten BJ et al.; 2001). Come conseguenza, le particelle di HDL costituiscono il principale veicolo di trasporto dei lipidi ossidati nel plasma umano e possono funzionare come una sorta di contenitore per i lipidi ossidati (Bowry VW et al.; 1992; Proudfoot JM et al.; 2009) in grado di accumularli nel core delle particelle stesse quando la capacità di inattivazione dei lipidi ossidati è saturata.

Le HDL, infine, inibiscono la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e riducono lo stress ossidativo intracellulare sia in vitro (Sugano M et al.;2000; Yvan-Charvet L et al.; 2010; Suc I et al.; 1997; Tabet F et al.; 2011), che in vivo (Nicholls SJ et al.; 2005).

Le particelle di HDL svolgono varie azioni anti-infiammatorie che nel loro insieme possono contribuire alla soppressione o al contenimento della risposta infiammatoria cronica che si sviluppa a livello della parete vascolare in seguito alla deposizione del colesterolo derivato dalle LDL (Barter PJ et al.; 2004;; Saemann MD et al.; 2010).

Le azioni anti-infiammatorie delle HDL 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 (Emil M de Goma et al., 2008); inoltre bloccano l'attivazione dei monociti, ne riducono la secrezione di citochine pro-infiammatorie e inibiscono l'attivazione e la diapedesi dei neutrofili (Baker PW et al., 2000). 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.

2) 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 (Bandeali et al,

2012) L'attività principale delle HDL nel preservare la normale attività delle cellule endoteliali consiste nella stimolazione del rilascio di ossido nitrico e di prostaciclina (PGI₂), 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 (Bandeali et al, 2012); 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 dalle 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 (Orew BG et al.,)

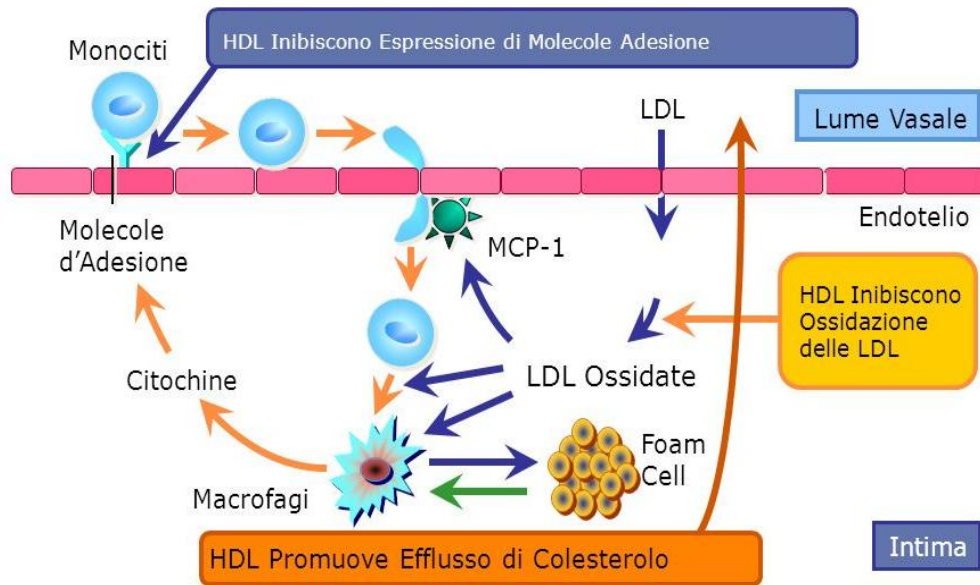
3) Riduzione dell'attivazione delle piastrine

Le HDL esercitano numerosi effetti antitrombotici che principalmente includono la riduzione della attività delle piastrine, come direttamente dimostrato ex vivo in trials di intervento (Calkin AC et al.; 2009; Lerch PG et al.; 1998).

In vitro le attività antitrombotiche delle HDL sono espresse come azioni inibitorie dose-dipendenti sull'aggregazione piastrinica stimolata da agonisti, sul legame con il fibrinogeno, sulla secrezione di granuli, sulla produzione di trombossano A₂ e di acido 12-idrossi-eicosatetranoico (Nofer JR et al.; 2002; Lerch PG et al.; 1998; Calabresi L et al.; 2003).

Le HDL riducono l'aggregazione piastrinica mediata dalla glicoproteina IIb/IIIa in risposta alla trombina, al collagene, all'ADP e all'adrenalina (Nofer JR et al.; 1998; Higashihara M et al.; 1991; Beitz J et al.; 1992; Surya II et al.; 1992; Fujimoto Y et al.; 1994).

Oltre ai loro effetti sulle piastrine, le HDL esercitano effetti antitrombotici anche sulle cellule endoteliali (Holy EW et al.; 2009). Tra i mediatori delle azioni antiplastriniche delle HDL vi è l'aumentata produzione di NO innescata dalla interazione delle HDL con SR-BI delle piastrine (Chen WJ et al.; 1994; Nofer JR et al.; 2010).



Cockerill GW et al. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1995;15:1987-1994

Figura 11: Effetti antiaterogeni delle HDL

1.4.3 ACIDI GRASSI E MALATTIA CARDIOVASCOLARE

La relazione tra malattia cardiovascolare e dieta è stata oggetto di indagine per più di 100 anni, essenzialmente da quando è stato osservato per la prima volta che diete ricche in colesterolo e grassi favorivano l'aterosclerosi nei conigli da laboratorio (Ignatowski A, 1908; Anitschkow N e Chalator S, 1913; Reneud S et al., 2001).

Studi epidemiologici hanno dimostrato che diete ricche in acidi grassi saturi e/o colesterolo aumentavano le concentrazioni sieriche di colesterolo e il rischio di sviluppare disturbi cardiovascolari. Molteplici studi di popolazione hanno condotto alla formulazione dell'ipotesi denominata "diet-heart hypothesis" la quale suggerisce che acidi grassi saturi e colesterolo sono i maggiori responsabili della malattia cardiovascolare e aterosclerotica nell'uomo (Hu FB et al., 2002). I grassi della dieta svolgono un ruolo cruciale nell'eziologia della malattia cardiovascolare, tuttavia non si può trascurare che vi siano altri nutrienti quali fibre, antiossidanti, acido folico, calcio, carboidrati che hanno un profondo impatto sull'aterosclerosi Reneud S et al., 2001).

Ridurre la quantità totale degli acidi grassi assunta con la dieta è stata per molto tempo una delle strategie adottate per ridurre il rischio cardiovascolare. Negli anni '50 numerosi studi iniziarono a suggerire che il tipo di grasso fosse più importante della quantità di grasso introdotta giornalmente nell'organismo (Moore RB et al., 1968) Studi successivi dimostrarono che quando gli acidi grassi saturi SFA (principalmente acido palmitico C16:0 e stearico C18:0) venivano sostituiti con quelli insaturi (USFA) i livelli di colesterolo totale nel plasma si riducevano (Moore RB et al., 1968; Connor WE et al., 1969) .Nel 1965 Keys et al. Dimostravano che gli SFA a catena media, laurico (C12:0) miristici (C14:0) e palmitico (C16:0) sono aterogenici e, nello stesso anno, Hegsted descriveva l'acido miristico come il principale aterogenico, perchè ha un potere ipercolesterolemico quattro volte superiore rispetto all'acido palmitico (Keys A et al., 1965; Hegsted DM et al., 1965). I benefici associati ad una ridotta assunzione di acidi grassi saturi vennero poi ulteriormente confermati dallo studio Seven Countries Study in cui l'assunzione giornaliera di SFA era fortemente correlata alla mortalità cardiovascolare (Keys A et al., 1970) Questa osservazione propose i MUFA come alternativi agli SFA nella dieta sebbene gli studi di Keys e Hegsted indicarono che i MUFA avevano un effetto neutrale sulle concentrazioni plasmatiche del colesterolo (Keys A et al., 1965; Hegsted DM et al., 1965). Successivamente, lo studio Western Electric Study fornì

l'indicazione che gli acidi grassi polinsaturi (PUFA) erano inversamente associati al rischio cardiovascolare (Shekelle RB et al., 1981).

1.5: ACIDI GRASSI E LIPOPROTEINE PLASMATICHE

Con il riconoscimento del fatto che alte concentrazioni di colesterolo LDL (Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S).Lancet 1994; Shepherd J et al.,1995) e basse concentrazioni di HDL colesterolo (Khera AV et al., 2013) sono associate ad un aumentato rischio cardiovascolare, l'interesse si spostò agli effetti degli acidi grassi alimentari sulle singole frazioni lipoproteiche.

Negli anni '60 Keys e Hegsted, per strade diverse, svilupparono equazioni predittive per stimare i cambiamenti del colesterolo plasmatico ed il colesterolo delle lipoproteine in risposta agli acidi grassi introdotti con la dieta (Keys A et al., 1965; Hegsted DM et al., 1965).

Questi studi, insieme a successive meta-analisi, indicarono che le concentrazioni di colesterolo totale e del LDL-c erano incrementate dagli SFA e ridotte dai PUFA (Weodside JV et al., 2005).

Gli acidi grassi in base al loro grado di insaturazione esercitano effetti diversi sulle lipoproteine plasmatiche.

Gli acidi grassi saturi SFA incrementano il colesterolo totale plasmatico (TPC) e LDL-c riducendo la clearance mediata dal LDLr (Nicolosi RJ et al., 1990). Questo effetto tuttavia non è comune a tutti gli SFA. Ad esempio, l'acido stearico (C18:0) esercita un effetto modesto sul TC poichè è facilmente convertito dall'organismo in acido oleico (C18:1). Gli effetti sul colesterolo HDL (HDL-c) sono dipendenti, invece, dalla lunghezza della catena idrocarburica: l'acido laurico (C12:0) aumenta l'HDL-c mentre quello palmitico (C16:0) e stearico non hanno alcun effetto (Mensink RP et al., 2003). Si è visto che un elevato intake di SFA, come miristico e palmitico, ha un effetto ipercolesterolemizzante (Nicolosi RJ et al. 1997), in particolare è associato ad un aumento di concentrazione delle particelle più piccole dense di LDL (Dreon DM et al 1998), ovvero quelle più fortemente associate con il rischio di malattie cardiovascolari (Berneis KK et al 2002). I saturi hanno inoltre un effetto trombogenico, in particolare lo stearico, interferendo con l'aggregazione piastrinica (Tholstrup T et al 2005).

Gli acidi grassi monoinsaturi (MUFA) possono essere in configurazione cis o trans. I MUFA sono neutrali in relazione ai loro effetti sulle concentrazioni plasmatiche di LDL-c e HDL-c quando presenti in configurazione cis (Meusink RP et al., 2003;

Lichteshstein AH et al., 1993; Meusink RP et al., 2005). I MUFA in configurazione trans invece incrementano LDL-c e riducono HDL-c oltre che aumentare i livelli di lipoproteina Lp(a) e dei trigliceridi plasmatici (Katan MB et al., 1995; Nestel P et al., 1992)

Gli acidi grassi polinsaturi PUFA vengono classificati in omega-6 o omega-3 a seconda della posizione del primo doppio legame carbonio-carbonio rispetto al gruppo metilico terminale della catena idrocarburica. Numerosi studi metabolici hanno mostrato che l'acido linoleico (LA) che appartiene alla famiglia degli omega-6 è efficace nel ridurre i livelli di TC e LDL-c (Grundy SM et al., 1982; Socks F et al., 1994).

Studi clinici più recenti hanno mostrato che gli acidi grassi polinsaturi della famiglia ω 6 determinano principalmente una riduzione della colesterolemia (sia lipoproteine ad alta densità, HDL, sia LDL) per cui svolgono un'importante funzione anti-aterogena. Gli acidi grassi polinsaturi della famiglia ω 3, invece, hanno un'attività anti-trombogenica particolarmente evidente, in quanto riducono l'aggregazione piastrinica.

Studi di turnover nell'uomo e numerosi studi in animali da laboratorio (topi, ratti, cani, conigli e scimmie) hanno proposto diversi meccanismi attraverso i quali gli acidi grassi esercitano effetti iper- o ipo-lipidemici:

- alterazione della clearance epatica delle lipoproteine (Nicolosi RJ et al., 1990; Vasendani C et al., 2002; Spady DK et al., 1983);
- alterazione della sintesi epatica di colesterolo estere (CE) e sua secrezione nelle lipoproteine (Nicolosi RJ et al., 1990; Rudel LL et al., 1995);
- alterazione della sintesi dell'apolipoproteina AI e delle HDL (Shepherd JC et al., 1978; Parks JS et al., 1982);
- alterazione dell'assorbimento del colesterolo (Mathur et al., 2007; Alvaro A et al., 2010)

1.5.1 ACIDI GRASSI E METABOLISMO DELLE HDL

Numerosi sono stati gli studi condotti su animali e uomini con la somministrazione di acidi grassi con la dieta per valutare l'eventuale influenza sulla concentrazione di lipoproteine plasmatiche; rispetto agli acidi grassi saturi, quelli mono e poli-insaturi riducono significativamente i livelli plasmatici di colesterolo totale e di LDL

colesterolo negli umani, primati non umani e “hamsters” (Mersink et al. 1992, chong et al. 1987, Rudel et al. 1995, Spady et al. 1993, Giron et al. 1992, Gupta et al. 2001, Kurushima et al. 1995, Shepherd et al. 1978, Mattson et al. 1985.). Tuttavia l’effetto sui livelli di HDL-colesterolo è ancora oggetto di studio, poichè i risultati ottenuti sono contrastanti; in particolare soltanto gli acidi grassi poli-insaturi, in concentrazione elevata, hanno mostrato una significativa riduzione di HDL-colesterolo e le implicazioni di tale riduzione nel trasporto inverso del colesterolo e nell’aterosclerosi sono oggetto di speculazione. Fin dai primi studi epidemiologici su popolazione (Kannel. et al. 1971, Gordon et al. 1981) è emerso che il rischio di sviluppare la malattia cardiovascolare è direttamente correlato ai livelli plasmatici di LDL colesterolo e inversamente correlato ai livelli di HDL colesterolo. Il ruolo protettivo delle HDL è attribuito alla loro capacità di trasportare il colesterolo in eccesso dai tessuti periferici al fegato per l’eliminazione o l’eventuale ricircolo. Una riduzione dei livelli plasmatici di HDL colesterolo potrebbe essere legato ad un aumento della velocità catabolica del colesterolo a livello epatico risultando così un effetto benefico sulla malattia aterosclerotica. È evidente che il controllo del metabolismo delle HDL si realizza sia quantitativamente (sintesi/catabolismo) sia qualitativamente (funzionalità delle particelle HDL) attraverso i menzionati meccanismi di sintesi dell’apolipoproteina A1 e della sua lipidazione per mezzo di trasportatori specifici di membrana (ABCA1), di rimodellamento delle HDL nascenti da parte di attività enzimatiche plasmatiche quali la lipoprotein lipasi (LPL), la lipasi epatica (HL), la lipasi endoteliale (EL), la proteina di trasporto degli esteri del colesterolo (CETP), la LCAT e la proteina per il trasferimento dei fosfolipidi (PLTP). A livello catabolico altri meccanismi coinvolgono recettori specifici di membrana come SRB1 (scavenger receptor B1). Ci sono evidenze sperimentali che gli acidi grassi attraverso la loro capacità di interagire con fattori di regolazione (PPARs) di geni del metabolismo lipidico possano controllare alcuni dei “pathways” descritti. Spady et al. (Spady et al. 1999) hanno recentemente dimostrato che in hamster una dieta ricca di acidi grassi poli-insaturi rispetto ad una dieta ricca di acidi grassi saturi determina un “up-regolazione” dell’espressione di SR-B1. Loison et al. (Loison et al. 2002) hanno dimostrato in hamster che una dieta ricca di acido miristico aumenta la concentrazione di HDL-colesterolo e che questo effetto è correlato ad un decremento nel fegato dell’espressione di SR-B1. Fungwe et al. (Fungwe et al. 1998) hanno dimostrato che solo gli acidi grassi a 18 atomi di

carbonio incrementano i livelli di espressione di LCAT e Apo A1 indipendentemente dall'incremento dei trigliceridi. Numerosi studi hanno messo in evidenza come gli acidi grassi insaturi modulano l'espressione del gene ABCA1. Alcuni esperimenti condotti in vitro sui macrofagi indicano che la stimolazione con acidi grassi insaturi determina una ridotta secrezione del colesterolo mediata da ABCA1; il meccanismo attraverso il quale ciò si realizza non sembra essere una riduzione dell'espressione genica di ABCA1 ma una aumentata degradazione della proteina (Wang et Oram, 2002). Uehara et al. (Uehara et al. 2002) hanno dimostrato in vitro che la stimolazione dei macrofagi e delle cellule HepG2 con l'acido oleico e l'acetoacetato induce una diminuzione dell'espressione genica di ABCA1, mentre gli acidi grassi saturi come l'acido palmitico e l'acido stearico non ne alterano l'espressione.

1.6: PROGETTO “VENTIMIGLIA DI SICILIA HEART STUDY”

Dati epidemiologici riportati in letteratura hanno dimostrato una bassa incidenza di malattie cardiovascolari nei paesi del Mediterraneo dovuto principalmente al modello nutrizionale tipico, fornendo molteplici vantaggi in termini di protezione cardiovascolare Keys A et al.; 1986; Serafini M et al., 1994, Willett WC et al., 1995; Farchi G et al., 1989; Rivellese A et al., 1991).

Il progetto "Ventimiglia di Sicilia Heart Study" è nato, nel 1989, per valutare gli aspetti clinici cardiovascolari, genetici ed i fattori di rischio ambientale in una popolazione rurale siciliana. Ventimiglia di Sicilia è un villaggio rurale di circa 1800 abitanti, si trova nella zona collinare dell'entroterra siciliano, a 50 km da Palermo. In questa popolazione, nonostante alcune lievi differenze con la dieta mediterranea tradizionale, come ad esempio una piccola riduzione dell'assunzione di carboidrati (3% al 5%) e fibre (7-8 g / giorno) e un limitato incremento del consumo di grassi saturi (2% al 3%) e colesterolo (8-10 mg / 1000 kcal), la maggior parte delle caratteristiche classiche della dieta mediterranea sono mantenute. A tale studio sono state invitate a partecipare tutte le persone di età superiore ai cinque anni. Il disegno generale dello studio includeva un questionario medico, la misurazione della pressione sanguigna, le misurazioni antropometriche e biochimiche e la registrazione dell' elettrocardiogramma. In totale sono stati arruolati 1351 soggetti (622 maschi e 729 femmine) ed a tutti i partecipanti è stato chiesto, inoltre, di essere inclusi in un sondaggio dietetico supplementare, al quale 755 soggetti della popolazione hanno partecipato, con un tasso di adesione di circa il 56%. Le procedure seguite erano in accordo con la Dichiarazione di Helsinki del 1975, rivista nel 1983.

In questa popolazione sono state riscontrate basse concentrazioni plasmatiche medie di colesterolo totale e colesterolo LDL (rispettivamente circa 5 e 3,2 mmol/L) e livelli medi di HDL-C, leggermente inferiori ai livelli italiani. Il tasso di mortalità cardiovascolare è risultato essere precoce (età compresa tra i 40 ed i 64 anni) ,con 0,6 morti / anno / 1000 abitanti nel periodo 1988-1997, tuttavia inferiore a quella nel resto d'Italia (Averna MR et al., 1995; Barbagallo CM et al., 2001).

La popolazione di Ventimiglia è inoltre caratterizzata da un elevato tasso di ipertensione, diabete, sindrome metabolica e sovrappeso o obesità (in particolare le

donne in post-menopausa), meno del 10% di soggetti hanno mostrato un peso normale (Barbagallo CM et al., 2001), rispetto alla popolazione italiana, in cui i soggetti in sovrappeso e obesi rappresentano rispettivamente il 31,6% e 6,5% della popolazione totale, con i tassi più elevati nei soggetti con età media e del sud del Italia.(Pagano R et al., 1994)

Questa popolazione è stata seguita nel corso degli anni ed i principali dati di mortalità e morbidità cardiovascolare sono stati registrati valutati da un team di specialisti in Medicina Interna, Geriatria e Cardiologia. Sono stati presi in considerazione: le schede ISTAT di decesso, i database dei Medici di famiglia e le schede di dimissione ospedaliera-

L'analisi dei dati di sopravvivenza ha mostrato che l'obesità (Barbagallo CM et al., 2001), infiammazione e sindrome metabolica (Mets) (Noto D et al., 2008) sono risultati i migliori predittori di mortalità totale, di eventi cardiovascolari e di mortalità nel corso degli anni di follow-up.

2. OBIETTIVI

2. OBIETTIVI DELLO STUDIO

I livelli di colesterolo plasmatici rappresentano il principale fattore di rischio per le malattie cardiovascolari (CVD). Studi epidemiologici hanno dimostrato che diete ricche in acidi grassi saturi aumentavano le concentrazioni sieriche di colesterolo totale e colesterolo LDL, aumentando, quindi, il rischio di sviluppare disturbi cardiovascolari; mentre la supplementazione con la dieta di acidi grassi monoinsaturi (MUFA) e acidi grassi polinsaturi (PUFA), erano in grado di ridurre i livelli di colesterolo totale e colesterolo LDL e aumentare i livelli di colesterolo HDL.

Molti studi hanno dimostrato che esiste una relazione inversa tra i livelli di colesterolo HDL (HDL-C) e le malattie cardiovascolari e tale ruolo protettivo è principalmente dovuto alla loro azione nel trasporto inverso del colesterolo.

Il primo obiettivo di questo studio è stato quello di valutare la relazione tra i livelli plasmatici dei NEFA ed il HDL-C in una popolazione del Mezzogiorno d'Italia del "Ventimiglia Health Study", un progetto epidemiologico iniziato nel 1989 con lo scopo di rilevare, in una tipica popolazione rurale mediterranea, fattori di rischio CV e registrare eventi cardiovascolari nel corso degli anni di follow-up (Barbagallo CM et al., 2002; Noto D et al., 2007).

Nella seconda parte dello studio sono stati condotti saggi "in vitro" utilizzando come modello di cellule epatiche, una linea di epatoblastoma umano (HepG2); i NEFA correlati significativamente con i livelli plasmatici di HDL-C in questa popolazione, sono stati testati per la loro capacità di modificare il catabolismo delle HDL. È stato, inoltre, valutato il loro effetto sull'espressione di superficie del recettore SR-B1 e sui proteoglicani eparansolfato di membrana (HSPG).

3. **MATERIALI** **E METODI**

3.1 POPOLAZIONE

I soggetti di questo studio sono stati selezionati dalla banca dati del progetto epidemiologico "Ventimiglia di Sicilia Heart Study" (15-16). Circa 900 sieri sono stati conservati tra il 2002 ed il 2003 per le analisi epidemiologiche e sono stati analizzati entro un anno dal deposito. Nel presente studio, un sottoinsieme della popolazione campionata è stata selezionata tramite una procedura di randomizzazione al fine di rappresentare la popolazione originaria in termini di età, sesso, indice di massa corporea e distribuzione del diabete mellito di tipo 2. La randomizzazione è stata eseguita con un rapporto di 1: 5, in modo da selezionare circa duecento soggetti per le successive analisi.

Le procedure adottate sono in accordo con la Dichiarazione di Helsinki del 1975, modificata nel 1983 e sono state approvate dal Comitato Etico dell'Università degli Studi di Palermo. Tutti i soggetti hanno dato il loro consenso informato a partecipare allo studio.

3.2 GC-MS

Profilo lipidico, glicemia e di altri parametri biochimici importanti sono stati misurati utilizzando procedure enzimatiche-colorimetrica standard (Roche Diagnostics, Basilea Svizzera) su un COBAS MIRA, più auto-analizzatore (Roche Diagnostics, Basilea Svizzera). LDL-C è stato calcolato con la formula di Friedewald.

Gli Acidi Grassi Non Esterificati (non-esterified fatty acid, NEFA) sono stati quantificati nel plasma mediante la tecnica *Gascromatografia accoppiata alla Spettrometria di Massa* (GC-MS). I NEFA sono stati estratti dal plasma mediante una metodica di estrazione ottimizzata a partire da quella descritta da Lepage e Roy (Lepage G e Roy CC, 1988). Le aliquote di plasma utilizzate per la determinazione dei NEFA, dopo l'aggiunta di una miscela di inibitori di proteasi (Roche Diagnostic, Basilea Svizzera) e di una soluzione 50 mM di beta-idrossi-toluene, sono state conservate e analizzate entro un anno. Alcuni campioni scelti casualmente sono stati occasionalmente ri-analizzati per verificare la consistenza della determinazione dei NEFA, anche dopo un così lungo stoccaggio. Poichè le prove effettuate hanno mostrato che, con la metodica impiegata, il recupero dei NEFA risulta lineare fino a 50 µL di plasma (dati non mostrati), per la loro estrazione sono stati utilizzati venticinque µL di plasma. La procedura di estrazione è stata testata per rilevare

l'eventuale rilascio di acidi grassi da trigliceridi: sono stati aggiunti 5 μ L di Gliceril tri(esadecanoato-1-¹³C) (Sigma Aldrich, MO, USA) in alcuni campioni prima del trattamento e la quantità di 1-¹³C esadecanoato (C16: 0, palmitato) rilasciato durante la procedura di estrazione è risultata trascurabile (dati non mostrati). I NEFA estratti sono stati convertiti in esteri metilici (fatty acid methyl ester, FAME) e iniettati in un Gascromatografo Hewlett Packard 5960 (Palo Alto, CA, USA) dotato colonna SP2560, 100 m x 0,25 mm (Supelco, Bellefonte, USA), interfacciato ad uno Spettrometro di Massa Hewlett Packard 5973 (Palo Alto, CA, USA). Le condizioni strumentali GC-MS impiegate sono le seguenti: iniettore in modalità SPLIT con un rapporto di splittaggio 1 a 30; temperatura dell'iniettore 180 °C; temperatura iniziale del forno pari a 80 °C, mantenuta per 4 minuti e poi aumentata fino a 220 °C a 8 °C/min e tenuta in isoterma a 220 °C per 32 minuti. Tutti i reagenti e gli standard sono stati acquistati dalla Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, MO, USA).

Lo Spettrometro di Massa è stato impiegato in modalità SIM (Selected Ion Monitoring), una modalità di scansione in cui solo un intervallo limitato di rapporti massa/carica (m/z) è trasmesso/rilevata dallo strumento (in contrapposizione alla classica scansione Full Scan in cui viene acquisito uno spettro di massa completo) che si traduce in un significativo aumento della sensibilità strumentale. Undici m/z caratteristici degli acidi grassi saturi, mono- di- tri- tetra-enoici o n-enoici sono stati selezionati come ioni da monitorare, come descritto nel sito "AOCS lipid library" secondo Christie W. et al. (<http://lipidlibrary.aocs.org/ms/masspec.html>).

Le curve di calibrazione sono state ottenute utilizzando una miscela commerciale di standards di metil-esteri di acidi grassi (FAME, Supelco, Sigma-Aldrich) e l'acido eptadecanoico metil-estere (C17: 0, acido margarico) è stato utilizzato come standard interno (Sigma-Aldrich). Tutte le curve di calibrazione ottenute tra 0 e 20 μ g di FAME hanno mostrato una notevole linearità (tutte le R di Pearson sono state maggiori di 0,996, dati non mostrati); tutti i punti di calibrazione sono stati preparati in triplicato aggiungendo, a plasma normale, quantità scalari di standard e le curve ottenute sono state accettate se i coefficienti di variazione per le misure ripetute erano inferiori al 5% (dati non riportati).

3.3 ISOLAMENTO DELLE LIPOPROTEINE E MARCATURA CON IL DIL

Le HDL plasmatiche sono state ottenute mediante ultracentrifuga (L90 K Optima Beckman-Coulter-Ultracentrifuge, Fullerton, CA, U.S.A.) in un range di densità 1.063-1.210 g/mL. Le HDL sono state dializzate contro 0.15M NaCl 0.1g/L EDTA e coniugate con il fluorocromo lipofilo DIL (di-octadecyl-indo-carbocyanine iodide). Per ogni milligrammo di lipoproteina sono stati aggiunti 10 µL di una soluzione stock di DIL 15 mg / ml preparata in DMSO. È stata fatta una incubazione a 37° C per 16 ore e per eliminare la quota di DIL non legato è stato realizzato un “buffer exchange” con una colonna di sephadex G25 (Boehringer Mannheim), eluendo in PBS 1X. (Verhoeve et al. 1996) . Le molecole più grandi (LDL-Dil) sono escluse dalla resina e si muovono più rapidamente lungo la colonna. Le molecole più piccole (HDL) hanno accesso all’interno dei granuli del gel, per cui impiegano un tempo maggiore per essere eluite. Le HDL-DIL sono state in seguito dosate in triplicato con il metodo BCA (BCA Protein Assay Kit –Pierce).

3.4 COLTURE CELLULARI

Le HepG2, una linea cellulare di epatoblastoma umano, sono state coltivate in fiasche da 25 cm² a 37° C, in ambiente saturo al 5% di CO₂, in DMEM _Glutamax (Dulbecco’s modified Eagle’s medium) (Gibco BRL, Gaithersburg, Maryland, United States) supplementato con 10% di siero fetale bovino (FCS), 100U/mL di penicillina e 100 µg/mL di streptomina (Gibco BRL), 1% di aminoacidi non essenziali. Le cellule sono state cresciute a subconfluenza e piastrate in piastre da 6 o 24 pozzetti (Corning Life Sciences, MA, USA). Prima degli esperimenti di condizionamento con gli acidi grassi, questi sono stati complessati con la siero albumina bovina, (BSA, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.). Le cellule non condizionate sono state mantenute in DMEM senza siero contenente l’1% di BSA, mentre gli acidi grassi sono stati aggiunti ad una concentrazione di 0.5mM sempre in presenza di BSA all’1% Gli acidi grassi usati in tutti gli esperimenti sono: acido miristico (C 14:0), acido stearico (C 18:0), acido oleico (C 18:1), acido palmitoleico (C 18:1), acido linoleico (C 16:2), (Sigma-Aldrich).

3.5 COMPLESSAMENTO DEGLI ACIDI GRASSI CON LA BSA

È stata preparata una stock solution 10 mM FFA/10% BSA, mescolando insieme a 55° nelle proporzioni corrette, una soluzione “stock” di 100mM FFA in 0,1 M NaOH, preparata a 70 °C ed una soluzione 10% BSA (FFA-free) in H₂O preparata a 55°C. La soluzione è stata conservata a -20° C (stabile per 3-4 settimane) e prima dell'uso riscaldata a 55° C per 15 minuti e raffreddata a temperatura ambiente. Tale soluzione “stock” è stata diluita nel terreno di coltura in modo tale da ottenere una concentrazione di FFA 0.5mM e BSA all'1%.

3.6 BINDING DELLE DIL-HDL

Le cellule HepG2 sono state coltivate in piastre da 24 pozzetti (5*10⁴ cellule per pozzetto) e cresciute a subconfluenza. 24 ore prima di iniziare l'esperimento, le cellule sono state supplementate con differenti acidi grassi ad una concentrazione 0.5mM / 1% di BSA. Le cellule sono state incubate per 4 ore a 4°C con quantità crescenti di DIL-HDL (da 0 a 120 ug / mL), per valutare il *binding* delle HDL alla superficie cellulare. Dopo l'incubazione, i pozzetti sono stati lavati tre volte con PBS freddo con 2mM CaCl₂, 1mM MgCl, e le cellule sono state lisate in 1 mL di una soluzione contenente 0,1 N di NaOH e 1% SDS per 1 ora a 37°C. Nei lisati cellulari è stato effettuato un dosaggio proteico con un kit commerciale (BCA micro, Pierce Biotechnology) e la fluorescenza incorporata è stata letta in un fluorimetro (RXL10 Shimadzu Corporation, Tokyo, Japan) ad una lunghezza d'onda di eccitazione 535nm e una di emissione a 570nm. È stata determinata una scala di calibrazione di DIL-HDL nel buffer di lisi e i risultati di fluorescenza sono stati calcolati come ng di DIL-HDL incorporato / mg di proteine cellulari. I dati ottenuti sono stati modellati con una equazione di primo ordine modificata per la componente aspecifica.

Abbiamo inoltre effettuato dei saggi dose-risposta condizionando le cellule HepG2 con solo acido miristico a concentrazioni 0,1-0,25 mM-0,5 mM-0,1 mM, seguito da un saggio di *binding*, come descritto precedentemente.

3.7 BINDING DELLE DIL-HDL DOPO TRATTAMENTO CON EPARINASI

Per valutare il ruolo degli eparansolfato proteoglicani nel *binding* delle HDL, le cellule condizionate per 24 ore con acidi grassi nelle condizioni descritte prima, sono state trattate con 4 IU/mL, ciascuna, di eparinasi I e III (Sigma-Aldrich sono), al fine di distruggere i proteoglicani di matrice sulla superficie cellulare. Dopo due ore di incubazione è stato condotto il saggio di *binding*, eseguito con una concentrazione di DIL-HDL pari a 40 µg/ mL (scelta nel range lineare delle curve di *binding*). In parallelo, è stato condotto un esperimento senza trattamento con eparinasi. Tutti gli esperimenti sono stati condotti in duplicato ed i risultati dell'esperimento sono espressi come perdita di percentuale di *binding* rispetto alle cellule non trattate con eparinasi.

3.8 PREPARAZIONE DELLE HDL RICOMBINANTI MARCATE CON IL BODIPY FL12

Per marcare gli esteri del colesterolo delle HDL (CE), sono state costruite HDL ricombinanti contenenti il BODIPY FL12, un analogo fluorescente dei CE (Molecular Probes, Invitrogen, CA, U.S.A) in accordo con il metodo di Reaven e al. (Noto D et al., 2006). La fosfatidilcolina (0.15 mM), la sfingomieline (0.4 mM), il colesterolo (0.4 mM), la trioleina (0.34 µM), il colesterolo palmitato (0.14 mM) e il BODIPY FL12 (50 µM) sono state disciolte in cloroformio e la miscela essiccata sotto azoto; dopo l'aggiunta di 2 ml di un tampone di Tris-EDTA, la miscela è stata sonicata in ghiaccio per 45 min in un sonicatore Branson (Branson, U.S.A.). Alla miscela sono stati aggiunti 3 milligrammi di apolipoproteine delle HDL3 ed è stata effettuata un'ulteriore sonicazione di altri 15 min. Le particelle di rec-HDL di dimensioni corrette sono state isolate mediante FPLC usando colonne di Superose 6 (GE Healthcare Life Sciences, U.S.A.).

3.9 INTERNALIZZAZIONE DI ESTERI DEL COLESTEROLO

Le cellule Hepg2 coltivate nelle piastre da 24-wells, raggiunta la semi-confluenza, sono state condizionate con i vari FFA come descritto prima, e sono state incubate con 30 µg/ ml di Bodipy- HDL per 4 ore a 37°. Dopo l'incubazione le cellule sono state lavate con PBS e tripsinizzate in 0,05% di tripsina, 0,02% EDTA Sigma-

Aldrich). La tripsina è stata inattivata aggiungendo terreno di coltura e le cellule sono state centrifugate a 1000g per 5 minuti. Dopo 2 lavaggi con PBS, addizionato con 2mM CaCl₂, 1mM MgCl, le cellule sono state risospese in PBS e analizzate con lo un citofluorimetro FACSCalibur (BectonDickinson, San Jose, CA, U.S.A.) utilizzando il canale FL1. Le intensità mediane di fluorescenza (MFI), corrette per l'auto-fluorescenza delle cellule, sono state ottenute utilizzando il software CellQuest Pro (BD) e sono state considerate come misura di internalizzazione del CE.

3.10 QUANTIFICAZIONE DELL'ESPRESSIONE DEL RECETTORE SR-B1 SULLA SUPERFICIE CELLULARE

Il HepG2 sono state coltivate in 6 pozzetti e portate a sub-confluenza (come descritto sopra). Sono stati condotti saggi in triplicato di condizionato per 24 h con FA (come descritto sopra). Dopo il condizionamento, le cellule sono state lavate due volte con PBS e tripsinizzate in 0,05% tripsina, 0,02% EDTA (soluzione di tripsina-EDTA 1X, Sigma-Aldrich). La tripsina è stata inattivata aggiungendo mezzo di coltura cellulare e le cellule, così staccate, sono state trasferite in falcon da 15 ml e centrifugate a 1000 g per 5 minuti. Dopo due lavaggi con PBS, le cellule sono state risospese in PBS all' 1% BSA. Le sospensioni cellulari sono state sottoposte ad una incubazione overnight a 4 ° C con una diluizione 1:50 di anticorpo policlonale "rabit" anti SR-B1 (donati gentilmente dal Prof. G. Schonfeld, della Washington University di St. Louis, MO - USA) in PBS e 1% BSA , seguita da una incubazione di 1 ora con una diluizione 1: 100 di anticorpo secondario "anti-rabit" coniugato con un fluorocromo il cui nome commerciale è Alexa Fluor 488 (Life Technology). Dopo un lavaggio finale per eliminare l'eccesso di anticorpo non legato, le cellule sono state analizzate con lo strumento FACSCalibur utilizzando il canale FL1 ed i dati analizzati mediante software CellQuest Pro (BD) come descritto prima. I valori mediani di intensità di fluorescenza (sottratti dell' auto-fluorescenza delle cellule) sono stati considerati come misure di SR-B1 di superficie. I dati sono stati espressi in proporzione alle cellule condizionate con BSA.

3.11 STATISTICA

Le differenze dei parametri clinici e biochimici nello studio di popolazione sono stati valutati mediante il test t di Student. Le correlazioni univariate sono state valutate mediante la correlazione di Pearson (R di Pearson), mentre le correlazioni indipendenti sono state valutate da più analisi di regressione (MRA), dopo aver aggiustato per i fattori confondenti (età, sesso, BMI), utilizzando un'opzione *step-forward*. I dati statistici sono stati calcolati dal software SYSTAT 12 (SYSTAT corp., CA, USA).

Le curve di internalizzazione sono state modellate con l'equazione di primo ordine di Michaelis-Menten (MM) con l'aggiunta di una costante aspecifica, che tiene conto dell'interazione con le componenti non recettoriali del sistema *in vitro*, usando il software nls2 (*Non-linear regression with brute force*), pacchetto del software statistico R (<https://cran.r-project.org/web/packages/nls2/index.html>). Con l'equazione di MM è stata valutata la Bmax, espressa come capacità massima di legame del sistema recettore-cellulare, la costante di dissociazione (o costante di Michaelis-Menten, Kmm), il cui valore esprime in maniera inversa l'affinità del ligando per il recettore, e la costante lineare non-specifica del *binding* (Kasp). (Equazione 1)

Le differenze tra i parametri calcolati per le cellule condizionate e per le cellule non condizionate sono state valutate, tenendo conto della deviazione standard, con il test del T student .

$$\left(\frac{Bmax * x}{kmm + x} \right) + kasp * x$$

Equazione 1: y = DIL-HDL legate alla superficie delle cellule HepG2 (ng / mg proteina cellulare). Bmax = quantità massima di DIL-HDL legate ai siti saturabili sulla superficie cellulare. KMM = costante **Michaelis-Menten**. Kasp = costante lineare del legame aspecifico

4. RISULTATI

4. RISULTATI

4.1 CORRELAZIONE TRA GLI ACIDI GRASSI PLASMATICI E LIVELLI DI HDL-COLESTEROLO: STUDIO DI POPOLAZIONE

Dall'analisi dei parametri clinici eseguita sulla popolazione di Ventimiglia di Sicilia abbiamo osservato (tabella 2) che gli unici parametri biochimici che mostravano differenze significative tra i due sottogruppi, costituiti uno da 103 uomini e l'altro da 97 donne, erano il colesterolo totale (CT) ed il colesterolo HDL (HDL-C), con valori più alti nelle donne. Anche i trigliceridi (TG), seppur con valore di $p=0,06$, ovvero vicino alla significatività, sono risultati più alti nelle donne, mentre il rapporto TG/HDL-C, espresso come mg/mg, si è rivelato maggiore negli uomini, con significatività statistica molto alta ($p<0,001$).

PARAMETER	MALES (n=103)	FEMALES (n=97)	T-TEST <i>p</i>
Age (years)	55.43 ± 19.38	54.62 ± 18.95	0.77
BMI (kg/m ²)	27.96 ± 5.16	29.37 ± 6.67	0.10
Waist(cm)	95.29 ± 12.27	92.23 ± 14.86	0.12
Systolic BP (mm/Hg)	126.73±21.58	126.19 ± 21.54	0.86
Diastolic BP (mm/Hg)	77.56 ± 10.09	76.36 ± 9.42	0.40
Total cholesterol (mmol/L)	4.84 ± 0.91	5.15 ± 1	0.02
Triglycerides (mmol/L)	1.32 ± 0.75	1.13 ± 0.57	0.06
HDL cholesterol (mmol/L)	1.00 ± 0.3	1.18 ± 0.3	<0.01
LDL cholesterol (mmol/L)	3.21 ± 0.76	3.4 ± 0.81	0.10
Fasting blood glucose (mmol/L)	5.01 ± 1.29	4.99 ± 1.11	0.91
C reactive protein (mg/dL)	0.31 ± 0.33	0.38 ± 0.71	0.34
TG/HDL-C (mg/mg ratio)	3.7 ± 4.21	2.37 ± 1.39	<0.01
PLASMA NEFA (PROPORTION)			
C14:0 (myristic)	0.009 ± 0.005	0.008 ± 0.004	0.2
C16:0 (palmitic)	0.229 ± 0.044	0.219 ± 0.03	0.087
C16:1(palmitoleico)	0.015 ± 0.009	0.015 ± 0.006	0.837
C18:0 (stearico)	0.09 ± 0.031	0.085 ± 0.024	0.259
C18:1n9 (oleico)	0.208 ± 0.051	0.197 ± 0.042	0.105
C18:2n6 (linoleico)	0.342 ± 0.104	0.372 ± 0.081	0.028
C18:3n3(γ-linoleico)	0.003 ± 0.001	0.003 ± 0.001	0.621
C18:3n6 (α-linoleico)	0.001 ± 0.001	0.001 ± 0.001	0.563
C20:1n9 (cis-11-eicosenoic)	0.028 ± 0.018	0.025 ± 0.011	0.21
C20:2(cis-11,14-eicosadienoic)	0.002 ± 0.001	0.002 ± 0.001	0.741
C20:3n6(cis-8,11-14-eicosatrienoic)	0.019 ± 0.006	0.02 ± 0.005	0.197
C20:4n6 (arachidonic)	0.003 ± 0.001	0.003 ± 0.001	0.674
C20:5n3 (cis5-8,11-14-17-eicosapentaenoic)	0.005 ± 0.003	0.005 ± 0.003	0.428
C22:6n3 (cis-4,7,10,13,16,19-docosahexaenoic)	0.018 ± 0.008	0.018 ± 0.007	0.553
AGGREGATED NEFA			
SFA	0.32 ± 0.06	0.31 ± 0.04	0.07
MUFA	0.22 ± 0.05	0.21 ± 0.04	0.11
PUFA	0.42 ± 0.09	0.44 ± 0.07	0.02

Tab 2: Parametri biochimici e profili dei NEFA plasmatici della popolazione "Ventimiglia Heart-Study" divisa per genere e T-test di Student del confronto uomini vs donne.

Dall'analisi degli acidi grassi non esterificati (NEFA) è emerso che le donne presentavano valori di acido linoleico (C18:2n6) e, più in generale, del gruppo degli acidi grassi plasmatici polinsaturi (PUFA) più alti rispetto agli uomini, in maniera statisticamente significativa (rispettivamente $p=0,03$ e $p=0,02$).

La tabella 2, nella seconda colonna, mostra la correlazione tra i livelli plasmatici di HDL-C e le quantità relative di NEFA plasmatici. Dall'analisi univariata condotta (mostrata nella seconda colonna) è emersa una correlazione positiva (Pearson's $R=+0,28$) statisticamente significativa ($p<0,01$) tra i livelli plasmatici di HDL-C e i PUFA, dovuta principalmente alla correlazione positiva statisticamente significativa ($p<0,01$) dell'acido linoleico (C18:2n6), con indice di correlazione $r= +28$. Gli acidi grassi monoinsaturi (MUFA) hanno mostrato una correlazione negativa statisticamente significativa ($p<0,01$), con indice di correlazione $r= -0,27$, dovuta principalmente alla correlazione negativa ($r=-0,27$) dell'acido oleico (C18:1n9) statisticamente significativa ($p<0,01$). Anche gli acidi grassi saturi (SFA) hanno mostrato una correlazione negativa con i livelli plasmatici di HDL-C, tuttavia non in modo statisticamente significativo; infatti, nonostante l'acido miristico (C14:0) abbia mostrato una correlazione statisticamente significativa, l'acido palmitico (C16:0) e l'acido stearico (C18:0) non correlano con i livelli plasmatici di HDL-C. I NEFA che, nell'analisi univariata, avevano mostrato una correlazione significativa con i livelli di HDL-C, insieme ai NEFA con i livelli plasmatici più alti sono stati inseriti in un'analisi di regressione multipla (MRA), considerando come covariata l'età ed il sesso.

PLASMA FATTY ACIDS	PEARSON'S R (p value)	STD COEFFICIENT (p value)
C14:0 (myristic)	-0.27 (<0.01)	-0.24 (<0.01)
C16:0 (palmitic)	-0.17 (0.35)	
C16:1 (palmitoleico)	-0.01 (1.00)	+0.19 (0.03)
C18:0 (stearico)	-0.08 (1.00)	
C18:1n9 (oleico)	-0.27 (<0.01)	-0.22 (<0.01)
C18:2n6 (linoleico)	+0.28 (<0.01)	Excl (0.96)
C18:3n3(γ-linoleico)	0.01 (1.00)	
C18:3n6 (α-linoleico)	-0.12 (1.00)	
C20:1n9 (cis-11-eicosenoic)	-0.24 (0.01)	-0.19 (0.01)
C20:2(cis-11,14-eicosadienoic)	-0.04 (1.00)	
C20:3n6(cis-8,11-14-eicosatrienoic)	0.05 (1.00)	
C20:4n6 (arachidonic)	0.10 (1.00)	
C20:5n3 (cis5-8,11-14-17-eicosapentaenoic)	0.03 (1.00)	
C22:6n3 (cis-4,7,10,13,16,19-docosahexaenoic)	-0.01 (1.00)	
AGGREGATED NEFA		
Saturated NEFA (SFA)	-0.17 (0.29)	Excl(0.61)
Mono-unsaturated NEFA (MUFA)	-0.27 (<0.01)	Excl(0.68)
Poly-unsaturated NEFA (PUFA)	+0.28(<0.01)	Excl(0.96)

Tab.3: *Correlazione di Pearson univariata. ** Analisi di regressione multipla aggiustata per età, sesso e obesità

Da tale analisi è emerso che i NEFA correlati, in maniera indipendente, ai livelli di HDL-C erano: l'acido palmitoleico (C16:1) in modo positivo (+0,19), mentre gli FA miristico (C14:0), oleico (C18:1n9) e cis-11-eicosenoico (C20:1n9) in modo negativo.

4.2 EFFETTI DEL CONDIZIONAMENTO CON ACIDI GRASSI SUL CATABOLISMO DELLE HDL

Gli acidi grassi (FA) che erano correlati con i livelli plasmatici di HDL-C nella nostra popolazione o che, comunque, erano risultati abbondanti nel plasma, sono stati testati in vitro, utilizzando una linea cellulare di epatoblastoma umano (HepG2), per valutare la loro influenza sul *binding* delle HDL alla superficie cellulare. Le cellule HepG2 sono state condizionate per 24 ore a 37° C con acidi grassi saturi ed insaturi (acido stearico, acido miristico, acido palmitoleico, acido linoleico, acido oleico), complessati con la BSA, utilizzando la concentrazione di 0,5 mM. Tra i MUFA abbiamo preferito utilizzare soltanto l'acido oleico (C18:1n9) e non anche l'acido cis-11-eicosenoico (C20:1n9) per evitare una eccessiva presenza di acidi grassi monoinsaturi e perchè circa dieci volte più abbondante. Successivamente le cellule sono state incubate per 4 ore a 4° C (per limitare i processi di internalizzazione) con quantità crescenti di HDL marcate con il fluorocromo lipofilo DIL (da 0 a 120 µg/mL). L'uptake delle HDL è stato misurato come descritto in materiali e metodi.

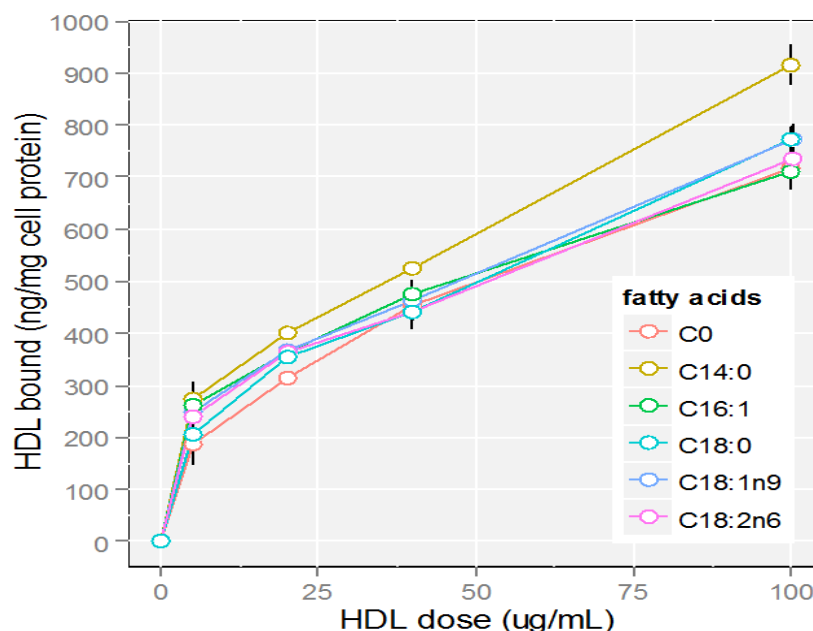


Figura 12: Curve di legame delle HDL ottenute dopo il condizionamento delle cellule con gli FA indicati nella legenda. La barra di errore rappresenta la SD degli esperimenti condotti in triplicato; Asse X = concentrazione DIL HDL. Asse Y = DIL HDL legato alla superficie cellulare HepG2.

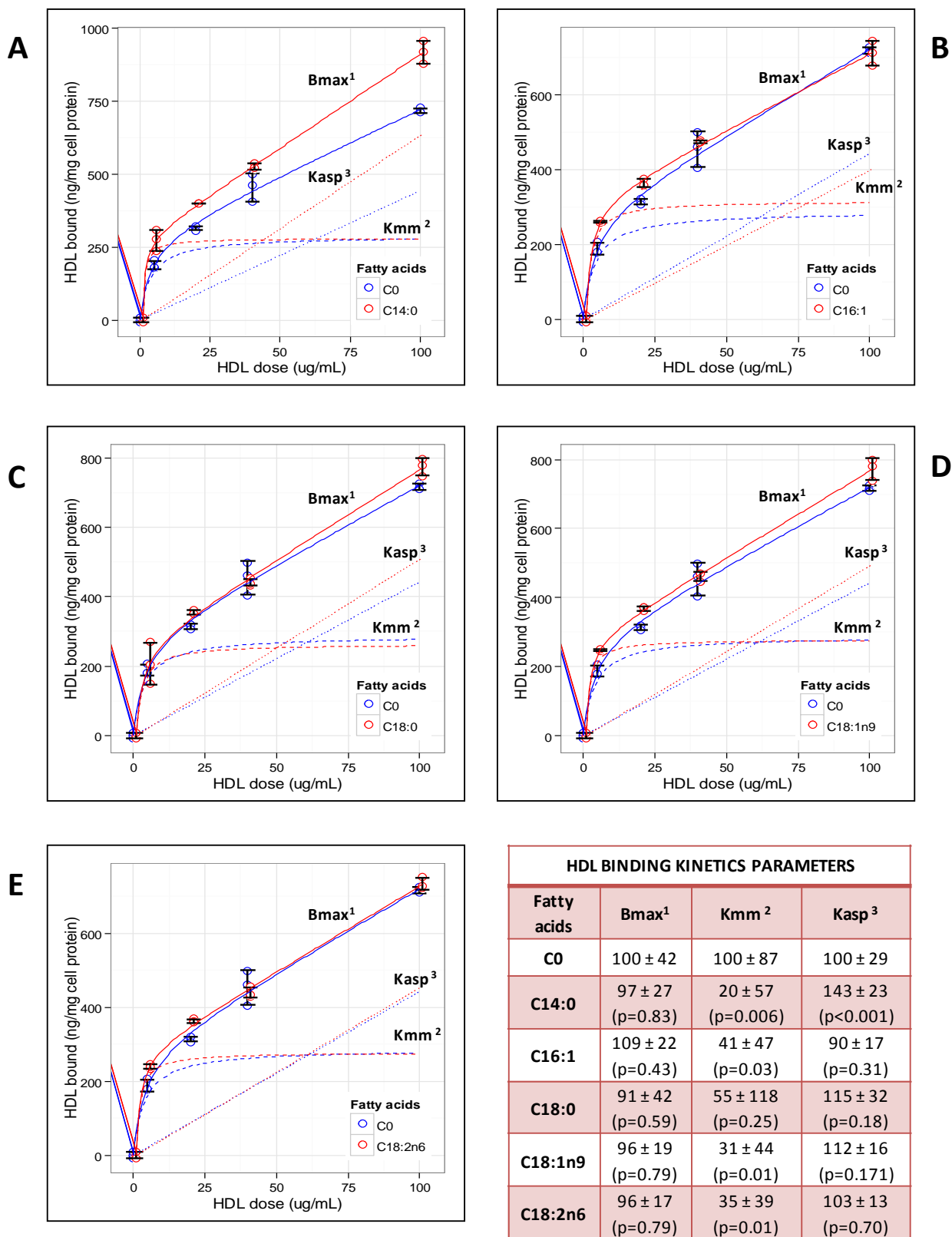


Figura 13: Cinetica di binding delle HDL dopo condizionamento con i differenti FA (A=controllo; B=acido miristico; C=acido palmitoleico; D=acido oleico; E=acido linoleico). Bmax=quantità massima di HDL-DIL legate ai siti saturabili sulla superficie cedi acidollulare, Kmm=costante di Michaelis-Menten, Kasp=costante lineare non-specifica del binding. La barra di errore rappresenta la SD degli esperimenti condotti in triplicato. In tabella: differenze tra i parametri stimati (cellule trattate con gli FA vs cellule controllo) espressi in percentuale e valutati tenendo conto della deviazione standard con il test del T student

Con l'equazione di Michaelis-Menten è stata valutata la B_{max} , espressa come la quantità massima di HDL-DIL legate ai siti saturabili sulla superficie cellulare, la costante di dissociazione, o costante di Michaelis-Menten (K_{mm}), e la costante lineare non-specifica del *binding* (K_{asp}) (riquadri A-E in figura 13)

Le differenze tra i parametri stimati sono stati valutati tenendo conto della deviazione standard con il test di t di Student. I dati ottenuti sono riportati nella tabella in figura 13 e sono espressi come percentuale di cellule condizionate rispetto alle cellule controllo (non condizionate).

Nessuno degli acidi grassi ha incrementato in maniera significativa la quantità di HDL legata ai siti saturabili della membrana cellulare (B_{max}), mentre l'acido miristico ha indotto un incremento del *binding* delle HDL alla superficie cellulare, incrementando la quantità di HDL legate ai siti non saturabili ($K_{asp} = +43\%$) rispetto al controllo (fig 13 riquadro A). Inoltre tutti gli acidi grassi, eccetto l'acido stearico (fig 13 riquadro C), hanno determinato una diminuzione della K_{mm} , che corrisponde ad un aumento dell'affinità per i siti di legame sulla superficie cellulare.

Abbiamo condotto dei saggi dose-risposta per l'acido miristico, condizionando le cellule HepG2 con concentrazioni 0,1mM- 0,25 mM- 0,5 mM- 0,1 mM di acido miristico e valutando, successivamente, gli effetti sul binding delle HDL sulla superficie cellulare. Dati in letteratura riportano che gli FA fino ad una concentrazione 1mM non ha mostrato alcuna tossicità. (Yao HR et al., 2011).

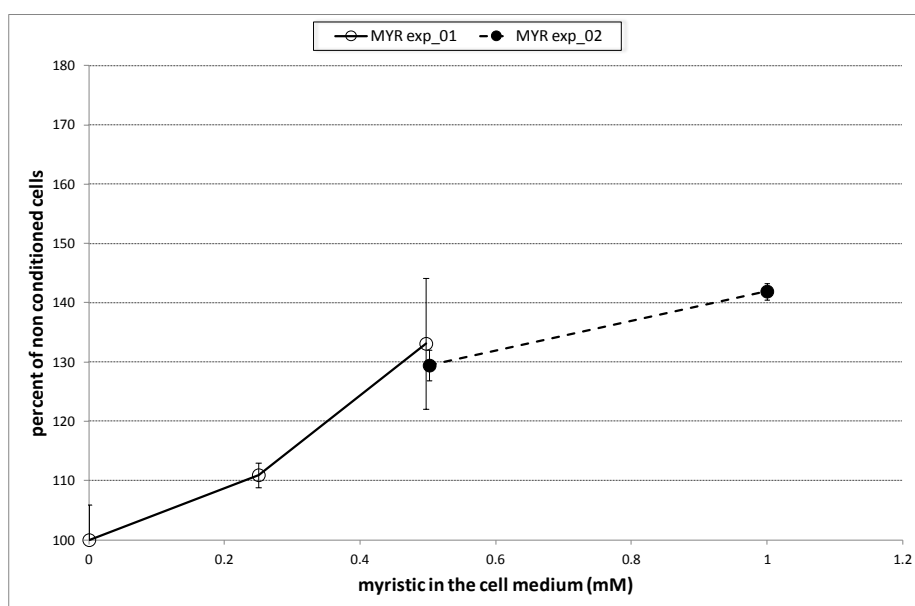


Figura 14: Esperimento dose-risposta. Proporzionalità tra la concentrazione di acido miristico nel terreno di coltura e *binding* delle HDL sulla superficie cellulare

Ciò che abbiamo osservato è stato un effetto dose-risposta lineare, suggerendo una proporzionalità di effetti in base alle concentrazioni di acido miristico (fig 14.).

4.3 CONTRIBUTO DEI PROTEOGLICANI EPARANSOLFATO (HSPG)DI MATRICE SUL *BINDING* DELLE DIL-HDL

Studi recenti indicano che la “Hepatic-lipase” (HL) agendo da “ponte” tra gli proteoglicani eparansolfato e le lipoproteine (Ji, Z. S. 1997) può facilitare l’interazione con i recettori di membrana e facilitarne l’uptake. Per capire se la matrice extracellulare e l’HL ad essa ancorata avessero avuto un ruolo nell’incremento del *binding* delle HDL osservato in seguito a trattamento con acido miristico, le cellule HepG2 sono state condizionate con gli acidi grassi (come descritto precedentemente). Successivamente, parte di queste cellule sono state trattate con eparinasi I e III, per 2 ore, per destabilizzare la matrice extracellulare, ed è stato condotto un esperimento di *binding* utilizzando una sola concentrazione di DIL-HDL scelta nel “range” lineare delle curve di *binding* (40 µg/ mL), l’altra parte invece, dopo il condizionamento, è stata sottoposta direttamente a *binding* con DIL-HDL.

I risultati del *binding* sono riportati nella figura 14 e sono espressi in valore assoluto come nanogrammi di DIL-HDL incorporati per milligrammi di proteine cellulari. Le differenze del *binding* con e senza il trattamento con eparinasi sono espresse come perdita di legame in percentuale rispetto al controllo (cellule non trattate con FA). Il trattamento con l’eparinasi non ha ridotto significativamente il *binding* delle HDL (3-14% in meno), solo quelle supplementate con l’acido miristico mostrano una diminuzione significativa del *binding* del 29% (fig. 15). Ciò è in accordo con l’elevata K aspecifica estrapolata dalla cinetica di *binding* e fa supporre che tale acido possa modificare le caratteristiche della matrice extracellulare.

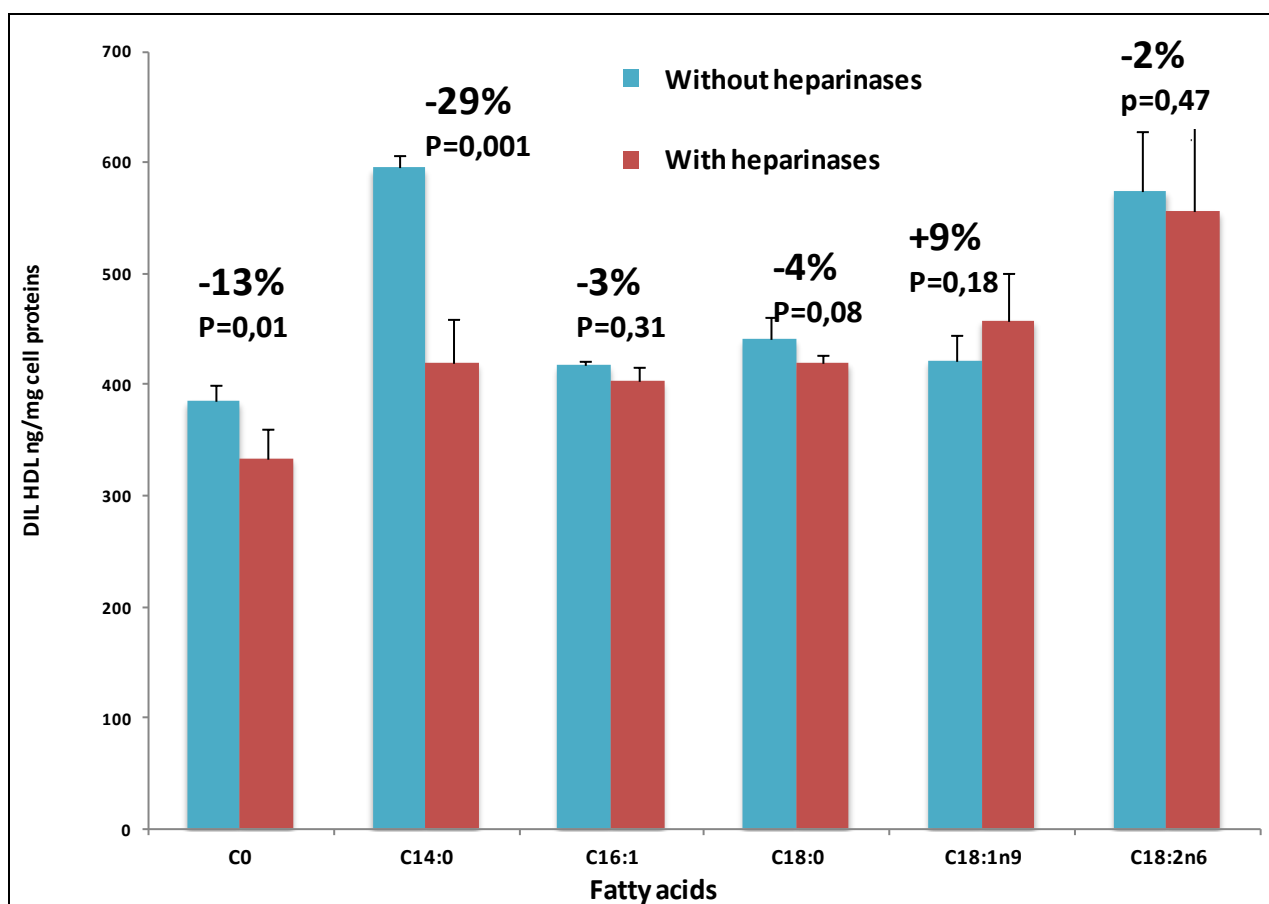


Figura 15: Valori del binding HDL ottenuti dopo il condizionamento delle cellule con gli FA indicati con (rosso) e senza (blu) l'impiego di Eparinasi. Barre di errore = SD dei triplicati. E' riportata in figura anche la perdita, in percentuale, del legame dopo il trattamento con eparinasi ed i relativi valori di t di Student, (con eparinasi vs senza eparinasi).

4.4 EFFETTI DEGLI FA SULL'INTERNALIZZAZIONE DEGLI ESTERI DEL COLESTEROLO

Per valutare come l'uptake da parte del fegato, degli esteri del colesterolo, quali componenti fondamentali delle HDL, fosse condizionato dagli acidi grassi, è stato condotto un saggio di internalizzazione in cellule HepG2. Queste sono state prima condizionate con gli FA, come precedentemente descritto, e successivamente incubate a 37° per 4 ore, in presenza di HDL ricombinanti contenenti, come analogo fluorescente del colesterolo-estere, il Bodipy Fl 12. L'internalizzazione degli esteri è stata misurata mediante citofluorimetria.

I risultati, espressi come percentuale rispetto al controllo, sono riportati in tabella 4. Dall'analisi dei dati è emerso un incremento significativo ($p < 0,01$) dell'internalizzazione degli esteri del colesterolo, pari al 32%, nelle cellule condizionate con l'acido miristico, a differenza degli altri FA che non hanno indotto nessuna alterazione.

Fatty acids	Fluorescent CE internalization
C0	100 ± 3
C14:0 (myristic)	132 ± 8 (p=0.01)
C16:1(palmitoleico)	101 ± 11 (p=0.51)
C18:0 (stearico)	96 ± 4 (p=0.316)
C18:1n9 (oleico)	97 ± 7 (p=0.67)
C18:2n6 (linoleico)	96 ± 4 (p=0.66)

Tab 4: Internalizzazione del BODIPY-FL 12 (analogico fluorescente del colesterolo estere) valutata con immuno-citofluorimetria.

4.5 EFFETTI DEGLI FA SULL'ESPRESSIONE DI SUPERFICIE DEL RECETTORE SR-B1

Allo scopo di capire se gli FA influenzassero i livelli di espressione sulla superficie cellulare del recettore SR-B1, importante nella captazione delle HDL a livello di membrana, è stata valutata la sua espressione di superficie mediante immunocitofluorimetria in cellule HepG2 condizionate con i differenti FA.

Come mostrato nella tabella della fig 16, gli effetti dei diversi FA sull'espressione del recettore SR-B1 non sono stati significativi. Gli SFA, miristico e stearico (C14:0) e C18:0), hanno determinato una diminuzione di circa il 20% dell'espressione di SR-B1 rispetto al controllo C0; l'acido oleico (C18:1n9) ha mostrato, invece, un aumento di circa il 12%. In entrambi i casi, comunque, i risultati non son significativi con valori di $p=0,27$

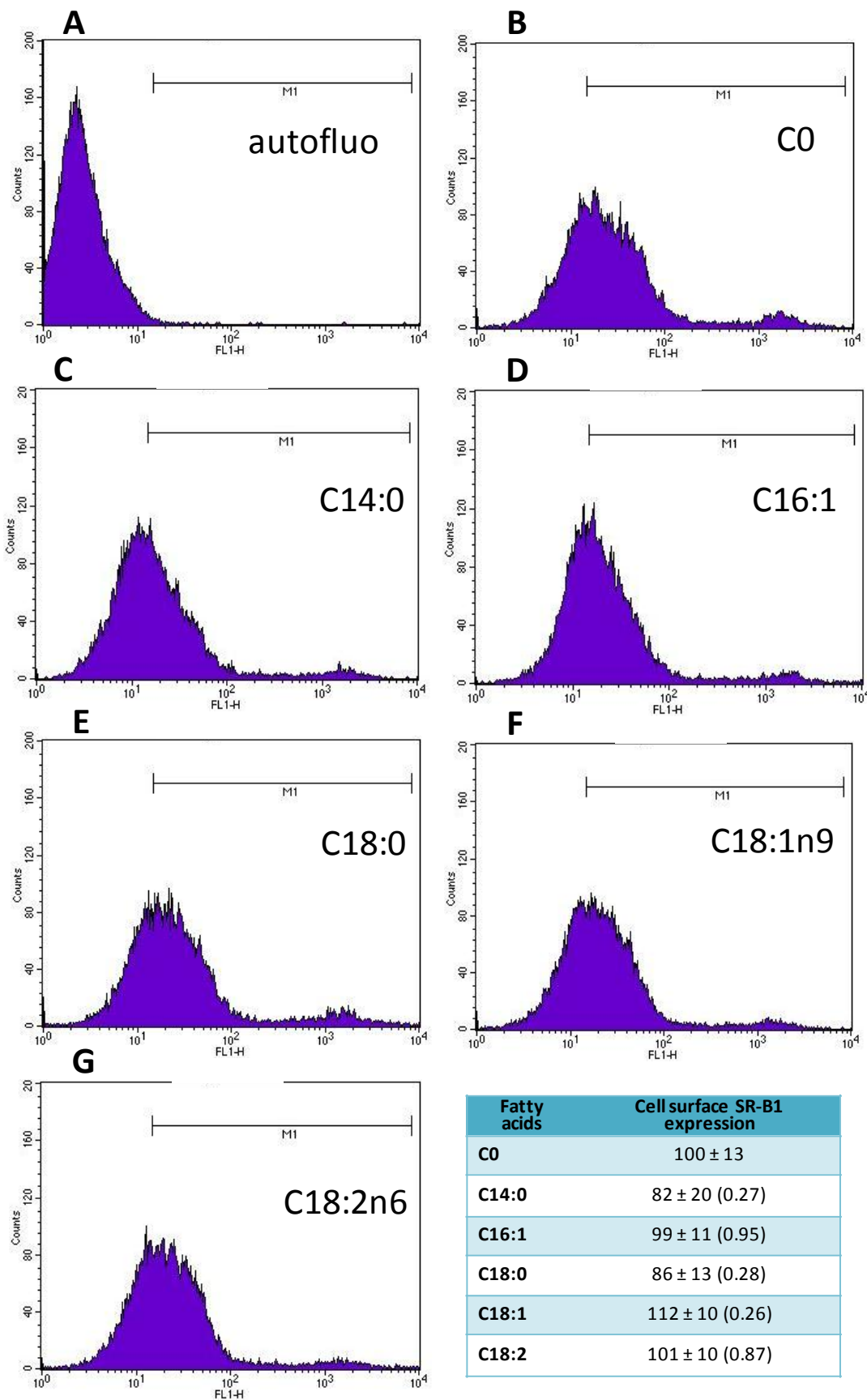


Fig 16 : immunocitofluorimetria del recettore SR-B1 espresso sulla superficie delle cellule dopo condizionamento con i diversi FA: acido miristico (C), acido palmitoleico (D), acido stearico (E), acido oleico (F) e acido linoleico (F) . Nel riquadro A è riportata l'autofluorescenza delle cellule HepG2 e nel riquadro B cellule non trattate con FA. Nella tabella sono riportati

5. CONCLUSIONI

5 CONCLUSIONI

Nella prima parte di questo studio abbiamo osservato come i NEFA plasmatici correlassero con i livelli plasmatici di HDL-C in una popolazione del Sud Italia. Tale popolazione è una tipica popolazione mediterranea che segue, tuttavia, una versione "moderna" della dieta mediterranea, che, in confronto alla dieta "tradizionale", consiste in un minore contenuto di fibre ed un eccesso di calorie (Barbagallo CM et al., 2002); in particolare, l'olio di oliva costituisce la maggior parte dei grassi alimentari. Ciò che caratterizza questa popolazione è l'elevata prevalenza di obesità (Barbagallo CM et al., 2002; Noto D. et al., 2008) e di sindrome metabolica (SM) (Noto D et al., 2008), che rappresenta anche un fattore di rischio rilevante per gli eventi cardiovascolari osservati nel corso dei 15 anni di follow-up (Noto D et al., 2008). Tuttavia, un'altra caratteristica di questa popolazione sono i livelli medi di HDL-C, i quali si sono rivelati leggermente inferiori ai livelli italiani (Barbagallo CM et al., 2002; Noto D et al., 2008).

Da questo primo studio è emerso che i livelli di colesterolo HDL (HDL-C) di questa popolazione erano correlati positivamente con la percentuale di plasma PUFA e negativamente con SFA. Considerando i singoli NEFA, i livelli di HDL-C erano correlati fortemente ed in modo negativo con il C14:0, il C18:1n9 ed il C20:1n9, e positivamente con il C16:1. Diversi studi hanno riportato che il C14:0 correla positivamente con i livelli plasmatici di HDL-C, e una grande meta-analisi, che include 60 studi di intervento dietetico, ha concluso che l'aumento di HDL-C a causa di SFA diminuisce progressivamente con l'allungamento della catena acilica, mostrandosi, dunque, massima la correlazione per il C12:0 (acido laurico) e non rilevanti per il C18:0 (Mensink RP et al, 2003). Inoltre, nello stesso studio, l'integrazione con la dieta del C14:0 non ha prodotto un aumento significativo dei livelli di HDL-C (2). Tuttavia, un'altra grande meta-analisi ha mostrato che la sostituzione del C18:0 con C12:0 / C14:0 / C16:0 non ha aumentato in modo significativo i livelli di HDL-C (Zerrad-Saadi A et al., 2009). Questi risultati contrastanti possono essere spiegati dalle caratteristiche eterogenee delle popolazioni studiate. La popolazione di questo studio mostra una elevata prevalenza di sindrome metabolica (Noto D et al., 2008). Alti livelli di C14:0 sono stati associati al rischio di sindrome metabolica, con un *odds ratio* di 5,84 nelle donne e 2.23 negli uomini,

nello studio di soggetti obesi (Mayneris-Perxachs J et al., 2014). È possibile che la relazione inversa tra C14:0 e bassi livelli di HDL-C in soggetti obesi sia dovuta all'aumento della sindrome metabolica indotta dal C14:0, in quanto bassi livelli di HDL-C sono caratteristici di una condizione patologica quale la sindrome metabolica (Noto D et al., 2008). Poiché gli effetti degli FA della dieta non modificano soltanto i NEFA ma anche la composizione totale FA un'altra spiegazione a questi risultati potrebbe essere legata alla scelta, in questo studio, di saggiare i NEFA anziché gli FA totali, in quanto un'alterazione del profilo degli FA esterificati, rispetto a quello dei NEFA, può essere considerato un migliore indicatore dei livelli di HDL. Il C18:1n9 (acido oleico) essendo altamente rappresentati nella dieta mediterranea di questa popolazione (Barbagallo CM et al., 2002) ha mostrato una elevata correlazione con livelli più bassi di HDL-C nel nostro studio, mentre il C18:2n6 (linoleico) è stato associato con livelli di HDL-C più elevati, anche se quest'ultima associazione non è stata confermata nell'analisi multivariata.

Nella seconda parte dello studio abbiamo cercato di capire se i risultati dello studio di popolazione potessero essere associati ad un alterato catabolismo epatico delle HDL indotto dagli FA.

A tale scopo abbiamo condotto dei saggi di condizionamento *in vitro*, con i NEFA che erano o correlati con livelli plasmatici di HDL-C, nello studio di popolazione, (Tabella 2) o molto abbondanti nel plasma, come il C18:0, utilizzando un modello di cellule di epatoma. Il risultato principale della parte *in vitro* dello studio consiste nella constatazione che l'acido miristico ha modificato, in modo peculiare, il legame delle HDL alle cellule di fegato in coltura. In particolare, il C14:0 ha aumentato il legame aspecifico delle HDL alla superficie cellulare e non ha influenzato il legame mediato dai recettori saturabili (fig 13 riquadro A e tabella). L'aumento di legame delle HDL, causato dal C14:0 nel condizionamento cellulare, ha mostrato un effetto dose-risposta lineare tra le concentrazioni 0,25mM e 1mM di C14:0 (fig14) . L'aumento del legame delle HDL si spiega in parte con la presenza di HSPG, infatti la loro rimozione, in seguito a trattamento con eparinasi, ha determinato una perdita di circa il 30% del legame delle HDL rispetto alle cellule non-condizionata e a tutti gli altri FA (fig. 15). C14:0, inoltre, ha indotto l' aumento del 32% (Tabella 4) dell'internalizzazione del CE fluorescente, contenuto nelle HDL3 sintetiche. HSPG giocano un ruolo essenziale nella rimozione dal flusso sanguigno delle lipoproteine contenenti CE. Le HDL sono intrappolate dalla matrice dei PG che circonda gli

epatociti per essere spogliate del loro contenuto in colesterolo esterificato (CE) in cambio di trigliceridi (TG) (von Eckardstein A et al, 2005). Questo meccanismo potrebbe spiegare perché l'internalizzazione del CE nelle cellule epatiche è stata aumentata dal C14:0, anche se questo risultato non è coerente con le precedenti relazioni. In uno studio di intervento dietetico, una dieta ricca di C14:0 e di altri SFA è stata associata ad una ridotta attività di HL, con conseguente correlazione positiva con le dimensioni delle LDL (Dreon DM et al., 1998). Inoltre, una dieta con supplementazione di SFA nelle scimmie (Brousseau et al., 1995) ha determinato un aumento di HDL-C plasmatico e una diminuzione del contenuto epatica di CE, suggerendo che l'internalizzazione del CE non è aumentata, ma ridotta in tali modelli. La differenza tra il metabolismo dei modelli animali e quello delle cellule isolate in coltura può spiegare questa apparente discrepanza. È interessante notare che, alti livelli di C14:0 sono stati trovati associati con livelli plasmatici più bassi della lipoproteina (a) [Lp (a)] (Tholstrup T et al., 1995). Il C14:0 probabilmente non è in grado di influire sulla sintesi di apo (a), in quanto i livelli di apo (a) sono sotto un controllo genetico rigoroso (Tholstrup T et al., 1995), è plausibile invece che C14:0 riduca i livelli di Lp (a), aumentando il suo intrappolamento da parte dei HSPG, un meccanismo coinvolto in maniera rilevante nel catabolismo della Lp (a) (Camejo G et al., 1998).

I nostri risultati suggeriscono dunque che C14:0 aumenta il catabolismo di HDL-CE, Lp (a), e probabilmente delle VLDL modificando la matrice extracellulare dei proteoglicani.

Abbiamo inoltre valutato l'effetto degli FA sull'espressione proteica di SR-B1 sulla superficie delle cellule epatiche. Abbiamo misurato il recettore SR-B1 esposto sulla superficie mediante immuno-citofluorimetria ed abbiamo osservato che C14:0 e C18:0 hanno mostrato una tendenza verso la diminuzione dell'espressione di SR-B1 (circa del 20%, anche se in modo non significativo, tabella in fig. 16 (Mattson FH et al., 1985). Se confermato e validato, questo risultato sarebbe in accordo con un altro studio che mostra una ridotta espressione di SR-B1 nei criceti trattati con C14:0 (Loison C et al., 2002). Diete alimentari arricchite in C14:0 hanno indotto un aumento delle particelle HDL-3 circolanti (Tholstrup T et al., 1994; Bérard AM et al., 2004), le quali si formano dalle HDL nascente per azione di SR-B1 (von Eckardstein A et al, 2005), tuttavia l'aumento di HDL3 in questi studi è stato spiegato dal deterioramento delle HDL3 > conversione HDL2 a causa di una inibizione della

lecitina-colesterolo acil transferasi (LCAT) indotta dal C14: 0, piuttosto che da una maggiore formazione di hdl3 ad opera di sr-b1 (Bérard AM et al., 2004).

Tutti i risultati relativi agli altri FA istudati sono più difficili da interpretare.

L'acido oleico (C18:1n9) nello studio di popolazione era associato con livelli di HDL-C più bassi, dato concorde con i risultati di studi di associazione, riportati in letteratura (Mensink RP et al, 2003; Mattson FH et al, 1985). Il meccanismo può essere legato ad un aumento rimozione delle HDL circolanti mediante SR-B1. Ciò che abbiamo osservato nei saggi *in vitro*, dopo condizionamento con acido oleico (C18:1n9), è stato un aumento non significativo dell'espressione sulla superficie cellulare del recettore SRB1, pari al 12% (fig 16 tabella); tuttavia, tale aumento non è stato accompagnato né da un aumento di particelle HDL legate alla superficie cellulare né da un aumento dell'internalizzazione del CE. L'acido oleico è un potente attivatore PPARs (Keller H et al.,1993), per cui è possibile che la correlazione negativa con livelli di HDL nel plasma sia legata all'effetto dell'attivazione di PPARs nelle cellule epatiche.

Non è comunque chiaro perché l'acido linoleico (C18:2n6), pur essendo un potente attivatore PPARs, in questo studio, non ha mostrato alcuna correlazione rilevante con SR-B1.

Il limite principale di questo studio è che con gli esperimenti *in vitro* è stato studiato solo il catabolismo delle particelle HDL da parte delle cellule del fegato, ma non è sempre possibile trovare una correlazione diretta fra i dati ottenuti *in vivo* da studi su umani e gli aspetti catabolici limitati osservati *in vitro*. Tuttavia, nonostante tale limitazione, i dati riportati in questo studio dimostrano un meccanismo tramite cui l'acido miristico ha effetti sul catabolismo del colesterolo HDL in cellule in coltura di epatoma.

In conclusione, abbiamo dimostrato che l'acido miristico è correlato negativamente con i livelli plasmatici di HDL-C in una popolazione mediterranea, caratterizzata da un eccesso di obesità e sindrome metabolica. Sugeriamo che parte di questa correlazione potrebbe essere spiegata da un aumento del legame tra HDL ed HSPG epatica e dal successivo *stripping* degli esteri del colesterolo da parte della lipasi legata ai proteoglicani. Il nostro studio rafforza la necessità di ridurre il sovrappeso e per diminuire la quantità di grassi saturi nella dieta, al fine di migliorare la salute della popolazione.

BIBLIOGRAFIA

- Acton, S. , A. Rigotti, K. T. Landschulz, S. Xu, H. H. Hobbs, and M. Krieger. 1996. Identification of scavenger receptor SR-B1 as a high density lipoprotein receptor. *Science*. 271: 518-520
- Alvaro A, Rosales R, Masana L, Vallve' J-C. Polyunsaturated fatty acids down-regulate in vitro expression of the key intestinal cholesterol absorption protein NPC1L1: no effect of monounsaturated nor saturated fatty acids. *J Nutr Biochem* 2010 Jun;21(6):518-25.
- Amar M. J. A., K. A. Dugi, C. C. Haudenschild, R. D. Shamburek, B. Foeger, M. Chase, A. Bensadoun, R. F. Hoyt, Jr., H. B. Brewer, Jr., and S. Santamarina-Fojo. 1998. Hepatic lipase facilitates the selective uptake of cholesteryl esters from remnant lipoproteins in apoE-deficient mice. *J. Lipid Res.* 39:1-7
- Anitschkow N, Chalator S. Ueber experimentalle Cholesterinsteatose. *Zbl Allg Path path Anat.* 1913; 24: 1-9.
- Applebaum- Bowden, D, Kobayashi J, Kashyap VS, Brown DR, Berard A, Meyn S, Parrott C, Maeda N, Shamburek R, Brewer HB Jr, Santamarina-Fojo S.. 1996. Hepatic lipase gene therapy in hepatic lipase-deficient mice: adenovirus – mediated replacement of a lipolytic enzyme to the vascular endothelium. *J. Clin. Invest.* 97: 799-805
- Averna MR, Barbagallo CM, Montalto G, Sapienza M, Cavera G, Rini GB, Pardo A, Descovich GC, Notarbartolo A: Distribuzione dei lipidi e delle apoproteine plasmatiche e prevalenza di dislipidemie. *Giorn Arterioscl* 20:29–35, 1995.
- Bamberger, M., J. M. Glick, and G. H. Rothblat. 1983. Hepatic lipase stimulates the uptake of high density lipoprotein cholesterol by hepatoma cells. *J. Lipid Res.* 24: 869-876
- Bandiali S, Farmer J. High-Density Lipoprotein and Atherosclerosis: The Role of Antioxidant Activity. *Curr Atheroscler Rep* (2012) 14:101–107.
- Barbagallo CM, Cavera G, Sapienza M, Noto D, Cefalù AB, Polizzi F, Onorato F, Rini G, Di Fede G, Pagano M, Montalto G, Rizzo M, Descovich G, Notarbartolo A, Averna

- MR. Nutritional characteristics of a rural Southern Italy population: the Ventimiglia di Sicilia Project. *J Am Coll Nutr.* 2002 Dec;21(6):523-9.
- Barbagallo CM, Cavera G, Sapienza M, Noto D, Cefalu` AB, Pagano M, Montalto G, Notarbartolo A, Averna MR: Prevalence of overweight and obesity in a rural southern Italy population and relationships with total and cardiovascular mortality: the Ventimiglia di Sicilia project. *Int J Obesity* 25:185–190, 2001.
- Barter PJ. Hugh sinclair lecture: the regulation and remodelling of HDL by plasma factors. *Atheroscler. Supp.* 2002; 3(4):39-47.
- Bensadoun, A., and D. E. Berryman. 1996. Genetics and molecular biology of hepatic lipase. *Curr. Opin. Lipidol.* 7: 77-81
- Bérard AM, Dabadie H, Palos-Pinto A, Dumon MF, Darmon M. Reduction of dietary saturated fatty acids correlates with increased plasma lecithin cholesterol acyltransferase activity in humans. *Eur J Clin Nutr.* 2004 Jun;58(6):881-7.
- Bodzioch M., E. Orso, J. Klucken, T. Langmann, A. Bottcher, W. Diederich, W. Drobnik, S. Barlage, C. Buchler, M. Porsch- Ozcurumez, W.E. Kaminski, H.W.Hahmann, K. Oette, G. Rothe, C. Aslanidis, K.J. Lackner, G. Schmitz. The gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease, *Nat. Genet.* 22 (1999) 347–35
- Bowry VW, Stanley KK, Stocker R. High density lipoprotein is the major carrier of lipid hydroperoxides in human blood plasma from fasting donors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 10316–10320.
- Breckenridge, W. C., A. Little, P. Alaupovic, C. S. Wang, A. Kuksis, G. Kakis, F. Lindgren, and G. Gardiner. 1982. Lipoprotein abnormalities associated with a familial deficiency of hepatic lipase. *Atherosclerosis.* 45: 161-179.
- Brooks-Wilson, A; Marcil, M; Clee, S. M. , Zhang, L.-H; Roomp, K ; van Dam, M; Yu, L; Brewer, C; Collins, J. A; Molhuizen, H. O. F; Loubser, O.; Ouelette, B. F. F; and 14 others: Mutations in ABCA1 in tangier disease and familial high density lipoprotein deficiency. *Nature Genet.* 22: 336-345, 1999.
- Brousseau ME, Ordovas JM, Osada J, Fasulo J, Robins SJ, Nicolosi RJ, Schaefer EJ. Dietary monounsaturated and polyunsaturated fatty acids are comparable in their effects

- on hepatic apolipoprotein mRNA abundance and liver lipid concentrations when substituted for saturated fatty acids in cynomolgus monkeys. *J Nutr.* 1995 Mar;125(3):425-36.
- Busch SJ, Barnhart RL, Martin GA, Fitzgerald MC, Yates MT, Mao SJ, Thomas CE, Jackson RL, 1994 Human hepatic triglyceride lipase expression reduces high density lipoprotein and aortic cholesterol in cholesterol-fed transgenic mice. *J. Biol. Chem.* 269: 16376-16382
- Busch, S. J., R. L. Barnhart, G. A. Martin, M. C. Fitzgerald, M. T. Yates, S. J. T. Mao, C. E. Thomas, and R. L. Jackson. 1994. Human hepatic triglyceride lipase
- Calabresi L, Gomaraschi M, Franceschini G. Endothelial protection by high-density lipoproteins: from bench to bedside. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 1724-1731.
- Calkin AC, Drew BG, Ono A, Duffy SJ, Gordon MV, Schoenwaelder SM, Sviridov D, Cooper ME, Kingwell BA, Jackson SP. Reconstituted high-density lipoprotein attenuates platelet function in individuals with type 2 diabetes mellitus by promoting cholesterol efflux. *Circulation* 2009; 120: 2095-2104.
- Camejo G, Hurt-Camejo E, Wiklund O, Bondjers G. Association of apo B lipoproteins with arterial proteoglycans: pathological significance and molecular basis. *Atherosclerosis.* 1998; 139(2):205-22.
- Castelli WP, Garrison RJ, Wilson PWF, Abbott RD, Kalousdian S, Kannel WB. Incidence of coronary heart disease and lipoprotein cholesterol levels: the Framingham Study. *JAMA* 1986;256:2835–2838
- Chapman MJ, Assmann G, Fruchart JC, Shepherd J, and Sirtori C (2004) Raising high-density lipoprotein cholesterol with reduction of cardiovascular risk: the role of nicotinic acid—a position paper developed by the European Consensus Panel on HDL-C. *Curr Med Res Opin* 20:1253–1268.
- Chen LY, Mehta JL. Inhibitory effect of high-density lipoprotein on platelet function is mediated by increase in nitric oxide synthase activity in platelets. *Life Sciences* 1994; 55: 1815-1821
- Christison JK, Rye KA, Stocker R. Exchange of oxidized cholesteryl linoleate between LDL and HDL mediated by cholesteryl ester transfer protein. *J. Lipid Res* 1995; 36: 2017–2026.

- Collet, X., B. P. Perret, G. Vieu, and L. Douste-Blazy. 1990. Behaviour of phospholipase-modified HDL towards cultured hepatocytes. I. Enhanced transfers of HDL sterols and apoproteins. *Biochim. Biophys. Acta.* 1043: 301-310.
- Connor WE, Witiak DT, Stone DB, Armstrong ML. Cholesterol balance and fecal neutral steroid and bile acid excretion in normal men fed dietary fats of different fatty acid composition. *J Clin Invest.* 1969; 48:1363-1375.
- Crook M. A. 2012. "Plasma Lipids and Lipoproteins
- Cuchel M., and Rader D. J. 2006. "Macrophage Reverse Cholesterol Transport: Key to the Regression of Atherosclerosis?" *Circulation* 113 (21) (May 30): 2548–55. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.104.475715.<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16735689>.
- Dichek, H. L., W. Brecht, J. Fan, Z-S. Ji, S. P. A. McCormick, H. Akeefe, L. A. Conzo, D. A. Sanan, K. H. Weisgraber, S. G. Young, J. M. Taylor, and R. W. Mahley. 1998. Overexpression of hepatic lipase in transgenic mice decreases apolipoprotein B-containing and high density lipoproteins. *J. Biol. Chem.* 273: 1896-1903
- Doolittle, M. H. , H. Wong, R. C. Davis, and M. C. Schotz. 1987. Synthesis of hepatic lipase in liver and extrahepatic tissues. *J. Lipid Res.* 28 : 1326- 1334
- Dreon DM, Fernstrom HA, Campos H, Blanche P, Williams PT, Krauss RM. Change in dietary saturated fat intake is correlated with change in mass of large low-density-lipoprotein particles in men. *Am J Clin Nutr.* 1998 May;67(5):828-36.
- 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
- Dugi, K. A., B. L. Vaisman, N. Sakai, C. L. Knapper, S. M. Meyn, H. B. Brewer, Jr., and S. Santamerina-Fojo. 1997. Adenovirus- mediated expression of hepatic lipase in LCAT transgenic mice. *J. Lipid Res.* 38: 1822-1832
- 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
- Fan, J., J. Wang, A. Bensadoun, S. J. Lauer, Q. Dang, R. W. Mahley, and J. M. Taylor. 1994. Overexpression of hepatic lipase in transgenic rabbits leads to a marked reduction of plasma high density lipoproteins and intermediate density lipoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 8724-8728
- Farchi G, Mariotti S, Menotti A, Seccareccia F, Torsello S, Fidanza F: Diet and 20-y mortality in two rural population groups of middle-aged men in Italy. *Am J Clin Nutr* 50:1095–1103, 1989.
- Fielding, C. e Fielding, P. E. 1995. Molecular physiology of reverse cholesterol transport. *J. Lipid Res.* 26: 211-228
- Franceschini G (2001) Epidemiologic evidence for high-density lipoprotein cholesterol as a risk factor for coronary artery disease. *Am J Cardiol* 88:9N–13N.
- Fujimoto Y, Tsunomori M, Muta E, Yamamoto T, Nishida H, Sakuma S, Fujita T. High density lipoprotein inhibits platelet 12-lipoxygenase activity. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 1994; 85: 355–358.
- Fungwe Thomas V., Bhalchandra J. Kudchodkar, Andras G. Lacko and Ladislav Dory. Fatty acids modulate lecithin: cholesterol acyltransferase secretion independently of effect on triglyceride secretion in primary rat hepatocytes. *J. Nutr.* 128: 1270-1275, 1998
- Garner B, Waldeck AR, Witting PK, Rye KA, Stocker R. Oxidation of high density lipoproteins.II. Evidence for direct reduction of lipid hydroperoxides by methionine residues of apolipoproteins AI and AII. *J Biol Chem* 1998; 273: 6088–6095.
- Garner B, Witting PK, Waldeck AR, Christison JK, Raftery M, Stocker R. Oxidation of high density lipoproteins. I. Formation of methionine sulfoxide in apolipoproteins AI and AII is an early event that accompanies lipid peroxidation and can be enhanced by alpha-tocopherol. *J Biol Chem* 1998; 273: 6080–6087.
- Ginsberg HN. Lipoprotein physiology. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 1998 Sep;27(3):503-19.

- Giron M. D. , Mataix F. J., Suarez M. D. Long term effects of dietary monounsaturated and polyunsaturated fatty acids on plasma lipids in dogs. *Arch Int Physiol Biochim Biophys.* 1992. Sep-Oct; 100(5): 321-6
- Glomset, J. A. (1968)."The plasma lecithins:cholesterol acyltransferase reaction." *J Lipid Res* 9(2):155-67.
- Glomset, J. A. 1979. Lecithin:cholesterol acyltransferase: an exercise in comparative biology. *Prog. Biochem. Pharmacol.* 15: 41-66
- Goldberg, I. J., N. A. Le, J. R. Paterniti, Jr., H. N. Ginsberg, F. T. Lindgren, and W. V. Brown. 1982. Lipoprotein metabolism during acute inhibition of hepatic triglyceride lipase in the cynomolgus monkey. *J. Clin. Invest.* 70: 1184-1192
- Gordon T, Kannel WB, Castelli WP et al. Lipoproteins, cardiovascular disease, and death. The Framingham Study. *Arch Intern Med.* 1981;141:1128-1131
- Gotto AM Jr and Brinton EA (2004) Assessing low levels of high-density lipoprotein cholesterol as a risk factor in coronary heart disease: a working group report and update. *J Am Coll Cardiol* 43:717–724
- Grosser, J., O. Schrecker, and H. Greten. 1981. Function of hepatic triglyceride lipase in lipoprotein metabolism. *J. Lipid Res.* 22: 437-442
- Group, SSSS. Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S).*Lancet* 1994;344:1383e9.
- Grundy SM, Bilheimer D, Blackburn H, Brown WV, Kwiterovich PO Jr, Mattson F, Schonfeld G, Weidman WH. Rationale of the diet-heart statement of the American Heart Association. Report of Nutrition Committee. *Circ.*1982: 65:839A-854A.
- Gupta, S. V., Skola P. Palmitic and stearic acids similarly affect plasma lipoprotein metabolism in cynomolgus monkeys fed diets with adequate levels of linoleic acid. *J. Nutr.* 2001 Aug; 131(8): 2115-20
- Hegsted DM, McGandy RB, Myers ML, Stare FJ. Quantitative effects of dietary fat on serum cholesterol in man. *Am J Clin Nutr.* 1965; 17:281-295.

- Homanics, G. E. , H. V. De Silva, J. Osada, S. H. Zhang, H. Wong , J. Borensztajin, and N. Maeda. 1995. Mild dyslipidemia in mice following targeted inactivation of the hepatic lipase gene. *J. Biol. Chem.* 270: 2974-2980
- Hu FB, Willett WC. Optimal diets for prevention of coronary heart disease. *JAMA.* 2002; 288:2569-2578.
- Hydrogenation, trans fatty acids, and plasma lipids. *Arteriosclerosis and Thrombosis.* 1993; 13:154-161.
- Ignatowski A. Wirkung de tierischen Nahrung auf den Kaninchenorganismus. *Ber Milit-med Akad.* 1908; 16: 154-176.
- Jansen, H. , T. J. van Berkel, and W. C. Hulsmann. 1978. Binding of liver lipase to parenchymal and non-parenchymal rat liver cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 85: 148-152
- Ji, Z-S., H. L. Dichek, R. D. Miranda, and R. W. Mahley. 1997. Heparan sulfate proteoglycans participate in hepatic lipase and apolipoprotein E-mediated binding and uptake of plasma lipoproteins, including high density lipoproteins. *J. Biol. Chem.* 272: 31285-31292
- Jiyong 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.
- Kadowaki, H., G. M. Patton, and S. J. Robins. 1992. Metabolism of high density lipoprotein lipids by the rat liver: evidence for participation of hepatic lipase in the uptake of cholesteryl ester. *J. Lipid Res.* 33: 1689-1698
- Kannel WB, Castelli WP, Gordon T et al. Serum cholesterol, lipoproteins, and the risk of coronary heart disease; the Framingham Study. *Ann Intern Med.* 1971;74:1-12.
- Katan MB, Zock PL, Mensink RP. Trans fatty acids and their effects on lipoproteins in humans. *Ann Rev Nutr.* 1995; 15:473-493.
- Keller H, Dreyer C, Medin J, Mahfoudi A, Ozato K, Wahli W. Fatty acids and retinoids control lipid metabolism through activation of peroxisome proliferator-activated receptor-retinoid X receptor heterodimers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90(6):2160-4.

- Keys A, Anderson JT, Grande F. Effect on serum cholesterol in many of mono-ene fatty acids (oleic acid) in the diet. *Metabolism*. 1965; 14:747-787.
- Keys A, Menotti A, Karvonen MJ, Aravanis C, Blackburn H, Buzina R, Djordjevic BS, Dontas AS, Fidanza F, Keys MH, Kromhout D, Nedeljkovic S, Punsar S, Seccareccia F, Toshima H: The diet and 15-year death rate in the seven countries study. *Am J Epidemiol* 124:903–915, 1986.
- Keys A. Coronary heart disease in seven countries. *Circ*. 1970; 41(Suppl.1):1-198.
- Khera AV, Plutzky J. Management of low levels of high-density lipoprotein-cholesterol. *Circulation* 2013;128:72e8.
- Kinsell LW, Partridge J, Boling L, Margen S, Michaels G. Dietary modification of serum cholesterol and phospholipids levels. *J Clin Endocrinol Metab*. 1952; 12:909-913.
- Knight, B. L. (2004). "ATP-binding cassette transporter A1: regulation of cholesterol efflux." *Biochem Soc Trans* 32(Pt 1): 124-7.
- Kobayashi, J., D. Applebaum-Bowden, K. A. Dugi, D. Brown, V. Kashyap, C. Parrott, N. Maeda, H. B. Brewer, Jr., and S. Santamarina-Fojo. 1996. Analysis of protein structure-function in vivo: adenovirus-mediated transfer of lipase mutants in hepatic lipase deficient mice. *J. Biol. Chem*. 271: 26296-26301
- Koramomy, M., S. Azhar, and A. D. Cooper. 1996. Chinese hamster ovary cells expressing a cell surface-anchored form of hepatic lipase. *J. Biol. Chem*. 271: 16906-1914
- Kotosai M, 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.
- Kounnas, M. Z., D. A. Chappel, H. Wong, W. S. Argraves, and D. K. Strickland. 1995. The cellular internalization and degradation of hepatic lipase is mediated by low density lipoprotein receptor-related protein and requires cell surface proteoglycans. *J. Biol. Chem*. 270: 9307-9312.

- Krapp, A., S. Ahle, S. Kersting, Y. Hua, K. Kneser, M. Nielsen, J. Gliemann, and U. Beisiegel. 1996. Hepatic lipase mediates the uptake of chylomicrons and beta-VLDL into cells via the LDL receptor-related protein (LRP). *J. Lipid Res.* 37: 926-936.
- Kuusi, T., P. K. Kinnunen, and E. A. Nikkila. 1979. Hepatic endothelial lipase antiserum influences rat plasma low and high density lipoproteins in vivo. *FEBS Lett.* 104: 384-388
- Kuusi, T., E. A. Nikkila, I. Virtanen, and P. K. Kinnunen. 1979. Localization of the heparin releasable lipase in situ in the rat liver. *Biochem. J.* 181: 245-256
- Lange, Y. (1991). "Disposition of intracellular cholesterol in human fibroblasts." *J Lipid Res* 32(2): 329-39.
- Lepage G, Roy CC. Specific methylation of plasma nonesterified fatty acids in a one-step reaction. *J Lipid Res.* 1988 Feb;29(2):227-35.
- Lerch PG, Spycher MO, Doran JE. Reconstituted high density lipoprotein (rHDL) modulates platelet activity in vitro and ex vivo. *Thromb Haemost* 1998; 80: 316-320.
- Lichtenstein AH, Ausman LM, Carrasco W, Jenner JL, Ordvas JM, Schaefer EJ. Hydrogenation impairs the hypolipidemic effect of corn oil in humans.
- Linton MF, Fazio S. Class A scavenger receptors, macrophages, and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol.* 2001 Oct;12(5):489-95. Review.
- Loison C, Mendy F, Sérougne C, Lutton C. Dietary myristic acid modifies the HDL-cholesterol concentration and liver scavenger receptor BI expression in the hamster. *Br J Nutr.* 2002 Mar;87(3):199-210.
- Mackness B, Mackness M. The antioxidant properties of high-density lipoproteins in atherosclerosis. *Panminerva Med.* 2012 Jun;54(2):83-90.
- Marcil M., L. Yu, L. Krimbou, B. Boucher, J.F. Oram, J.S. Cohn, J. Genest Jr. Cellular cholesterol transport and efflux in fibroblasts are abnormal in subjects with familial HDL deficiency, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19 (1999) 159–169.
- Maron DJ (2000) The epidemiology of low levels of high-density lipoprotein cholesterol in patients with and without coronary artery disease. *Am J Cardiol* 86:11L–14L;

- Marques-Vidal, P., C. Azéma, X. Collet, C. Vieu, H. Chap, and B. Perret. 1994. Hepatic lipase promotes the uptake of HDL esterified cholesterol by the perfused rat liver: A study using reconstituted HDL particles of defined phospholipid composition. *J. Lipid Res.* 35: 373-384.
- Mathur SN, Watt KR, Field FJ. Regulation of intestinal NPC1L1 expression by dietary fish oil and docosahexaenoic acid. *J Lipid Res.* 2007; 48:395-404.
- Mattson FH, Grundy SM. Comparison of effects of dietary saturated, monounsaturated, and polyunsaturated fatty acids on plasma lipids and lipoproteins in man. *J Lipid Res.* 1985; 26(2):194-202.
- Mayneris-Perxachs J, Guerediain M, Castellote AI, Estruch R, Covas MI, Fitó M, Salas-Salvadó J, Martínez-González MA, Aros F, Lamuela-Raventós RM, López-Sabater MC; for PREDIMED Study Investigators. Plasma fatty acid composition, estimated desaturase activities, and their relation with the metabolic syndrome in a population at high risk of cardiovascular disease. *Clin Nutr.* 2014 Feb;33(1):90-7
- Mensink RP, Zock PL, Kester AD, Katan MB. Effects of dietary fatty acids and carbohydrates on the ratio of serum total to HDL cholesterol and on serum lipids and apolipoproteins: a meta-analysis of 60 controlled trials. *Am J Clin Nutr.* 2003; 77:1146-1155.
- Mensink RP. Metabolic and health effects of isomeric fatty acids. *Curr Opin Lipidology.* 2005; 16:27-30.
- Moore RB, Anderson JT, Taylor HL, Keys A, Frantz ID Jr. Effect of dietary fat on the fecal excretion of cholesterol and its degradation products in man. *J Clin Invest.* 1968; 47:1517-1534.
- Morton RE. Cholesteryl ester transfer protein and its plasma regulator: lipid transfer inhibitor protein. *Curr Opin Lipidol.* 1999 Aug;10(4):321-7.
- Nabel EG, Braunwald E. A tale of coronary artery disease and myocardial infarction. *N Engl J Med* 2012;366:54e63.
- Navab M, Ananthramaiah GM, Reddy ST, Van Lenten BJ, Ansell BJ, Fonarow GC, Vahabzadeh K, Hama S, Hough G, Kamranpour N, Berliner JA, Lusis AJ, Fogelman AM. The oxidation hypothesis of atherogenesis: the role of oxidized phospholipids and HDL. *J Lipid Res* 2004; 45: 993-1007.

- Nestel P, Noakes M, Belling B, McArthur R, Clifton P, Janus E, Abbey M. Plasma lipoprotein lipid and Lp[a] changes with substitution of elaidic acid for oleic acid in the diet. *J Lipid Res.* 1992; 33:1029-1036.
- Nicholls SJ, Dusting GJ, Cutri B, Bao S, Drummond GR, Rye KA, Barter PJ. Reconstituted high-density lipoproteins inhibit the acute pro-oxidant and proinflammatory vascular changes induced by a periarterial collar in normocholesterolemic rabbits. *Circulation* 2005; 111: 1543-1550.
- Nicolosi RJ, Stucchi AF, Kowala MC, Hennessy LK, Hegsted DM, Schaefer EJ. Effect of dietary fat saturation and cholesterol on LDL composition and metabolism. In vivo studies of receptor and nonreceptor-mediated catabolism of LDL in cebus monkeys. *Arteriosclerosis.* 1990; 10:119-128.
- Nofer JR, Brodde MF, Kehrel BE. High-density lipoproteins, platelets and the pathogenesis of atherosclerosis. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2010; 37: 726-735.
- Nofer JR, Kehrel B, Fobker M, Levkau B, Assmann G, von Eckardstein A. HDL and arteriosclerosis: beyond reverse cholesterol transport. *Atherosclerosis* 2002; 161: 1-16.
- Nofer JR, Walter M, Kehrel B, Wierwille S, Tepel M, Seedorf U, Assmann G. HDL3-mediated inhibition of thrombin-induced platelet aggregation and fibrinogen binding occurs via decreased production of phosphoinositide-derived second messengers 1,2-diacylglycerol and inositol 1,4,5-tris-phosphate. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18: 861–869.
- Noto D, Barbagallo CM, Cefalù AB, Falletta A, Sapienza M, Cavera G, Amato S, Pagano M, Maggiore M, Carroccio A, Notarbartolo A, Averna MR. The metabolic syndrome predicts cardiovascular events in subjects with normal fasting glucose: results of a 15 years follow-up in a Mediterranean population. *Atherosclerosis.* 2008 Mar;197(1):147-53. Epub 2007 Apr 26.
- Noto D, Rizzo M, Barbagallo CM, Cefalù AB, Verde AL, Fayer F, Notarbartolo A, Averna MR. Low-density lipoproteins generated during an oral fat load in mild hypertriglyceridemic and healthy subjects are smaller, denser, and have an increased low-density lipoprotein receptor binding affinity. *Metabolism.* 2006 Oct;55(10):1308-16.
- O'Flaherty M, Buchan I, Capewell S. Contributions of treatment and lifestyle to declining CVD mortality: why have CVD mortality rates declined so much since the 1960s? *Heart* 2013;99:159e62.

- Oram, J. F. (2002). "ATP-binding cassette transporter A1 and cholesterol trafficking." *Curr Opin Lipidol* 13(4): 373-81.
- Owen J. S. 2002. "ATP-Binding Cassette A1 Protein and HDL Homeostasis." *Atherosclerosis. Supplements* 3 (4) (December): 13–22.
- Pagano R, La Vecchia C: Overweight and obesity in Italy, 1990–91. *Int J Obesity* 18:665–669, 1994.
- Panagotopoulos, S. E., Witting, S. R., Horace, E. M., Hui, D. Y., Maiorano, J. N. and Davidson, W. S. (2002). "The role of apolipoprotein A-I helix 10 in apolipoprotein-mediated cholesterol efflux via the ATP-binding cassette transporter ABCA1." *J Biol Chem* 277(42): 39477-84.
- Parks JS, Rudel LL. Different kinetic fates of apolipoproteins A-I and A-II from lymph chylomicra of nonhuman primates. Effect of saturated versus polyunsaturated dietary fat. *J Lipid Res.* 1982; 23:410-421.
- Patsch W, Gotto AM Jr. Apolipoproteins: pathophysiology and clinical implications. *Methods Enzymol.* 1996;263:3-32.
- 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.
- Proudfoot JM, Barden AE, Loke WM, Croft KD, Puddey IB, Mori TA. HDL is the major lipoprotein carrier of plasma F2-isoprostanes. *J Lipid Res* 2009; 50: 716-722.
- Remaley, A. T.; Rust, S.; Rosier, M.; Knapper, C.; Naudin, L.; Broccardo, C.; Peterson, K. M.; Koch, C.; Arnould, I.; Prades, C.; Duverger, N.; Funke, H.; Assman, G.; Dinger, M.; Dean, M.; Chimini, G.; Santamarina-Fojo, S.; Fredrickson, D. S.; Deneffe, P.; Brewer, H. B., Jr. : Human ATP-binding cassette transporter 1 (ABC1): genomic organization and identification of the genetic defect in the original Tangier disease kindred. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 96: 12685-12690, 1999.
- Renaud S, Lanzmann-Petithory D. Coronary heart disease: dietary links and pathogenesis. *Public Health Nutr.* 2001; 4:459-474.

- Rigotti, A., Trigatti, B. L., Penman, M., Rayburn, H., Herz, J. and Krieger, M. (1997). "A targeted mutation in the murine gene encoding the high density lipoprotein (HDL) receptor scavenger receptor class B type I reveals its key role in HDL metabolism." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(23): 12610-5.
- Rinninger, F., W. A. Mann, T. Kaiser, S. Ahle, N. Meyer, and H. Greten. 1998 . Hepatic lipase mediates an increase in selective uptake of high density lipoprotein-associated cholesteryl esters by human HepB3 hepatoma cells in culture. *Atherosclerosis*. 141: 273-285.
- Rivellese A, Mancini M: Population diets influencing cardiovascular risk. *Curr Op Lipidol* 2:16–19, 1991.
- Ross R. Atherosclerosis is an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;340:115e26.
- Rudel LL, Johnson FL, Sawyer JK, Wilson MD, Parks JS. Dietary polyunsaturated fat modifies low-density lipoproteins and reduces atherosclerosis of nonhuman primates with high and low diet responsiveness. *Am J Clin J Nutr*.1995; 62:463S-470S.
- Rudel LL, Parks JS, Sawyer JK. Compared with dietary monounsaturated and saturated fat, polyunsaturated fat protects African green monkeys from coronary artery atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1995; 15:2101-2110.
- S. Rust, M. Rosier, H. Funke, J. Real, Z. Amoura, J.C. Piette, J.F. Deleuze, H.B. Brewer, N. Duverger, P. Deneffe, G. Assmann, Tangier disease is caused by mutations in the gene encoding ATPbinding cassette transporter 1, *Nat. Genet*. 22 (1999) 352–355.
- Sacks F. Dietary fats and coronary heart disease. Overview. *J Card Risk*. 1994; 1:3-8.
- Saemann MD, Poglitsch M, Kopecky C, Haidinger M, Horl WH, Weichhart T. The versatility of HDL: a crucial anti-inflammatory regulator. *Eur J Clin Invest* 2010; 40: 1131-1143.
- Santamarina-Fojo S, Remaley AT, Neufeld EB, Brewer HB Jr. Regulation and intracellular trafficking of the ABCA1 transporter. *J Lipid Res*. 2001 Sep;42(9):1339-45. Review.
- Santamarina-Fojo, S., C. Haudenschild, and M. Amar. 1998. The role of hepatic lipase in lipoprotein metabolism and atherosclerosis. *Curr. Opin. Lipidol*. 9: 211-219

- Sattler W, Christison J, Stocker R. Cholesterylester hydroperoxide reducing activity associated with isolated high- and low-density lipoproteins. *Free Radic Biol Med* 1995; 18: 421–429.
- Serafini M, Ghiselli A, Ferro-Luzi A: Red wine, tea and anti-oxidant protection [Letter]. *Lancet* 344:626, 1994.
- Sharrett AR, Ballantyne CM, Coady SA, Heiss G, Sorlie PD, Catellier D, and Patsch W (2001) Coronary heart disease prediction from lipoprotein cholesterol levels, triglycerides, lipoprotein (a), apolipoproteins A-I and B, and HDL density subfractions: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Circulation* 104: 1108–1113.;
- Shekelle RB, Shryock AM, Paul O, Lepper M, Stamler J, Liu S, Raynor WJ Jr. Diet, serum cholesterol, and death from coronary heart disease. The Western Electric Study. *N Engl J Med.* 1981; 304:65-70.
- Shelness GS, Sellers JA. Very-low-density lipoprotein assembly and secretion. *Curr Opin Lipidol.* 2001 Apr;12(2):151-7.
- Shepherd J, Cobbe SM, Ford I, et al. Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. West of Scotland Coronary Prevention Study Group. *N Engl J Med* 1995;333:1301e7.
- Shepherd JC, Packard CJ, Patsch JR, Gotto AM, Taunton OD. Effects of dietary polyunsaturated and saturated fat on the properties of high density lipoproteins and the metabolism of apolipoproteins A-I. *J Clin Invest.* 1978; 61:1582-1592.
- Spady David K., Denise M. Kearney, and Helen H. Hobbs. Polyunsaturated fatty acids up-regulate hepatic scavenger receptor B1 (SR-B1) expression and HDL cholesteryl ester uptake in the hamster *J. Lipid Res.* 40: 1384-1394, 1999
- Spady DK, Bilheimer DW, Dietschy JM. Rates of receptor-dependent and independent low density lipoprotein uptake in the hamster. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1983; 80:3499-3503.
- Suc I, Escargueil-Blanc I, Troly M, Salvayre R, Negre-Salvayre A. HDL and ApoA prevent cell death of endothelial cells induced by oxidized LDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 2158-2166.
- Sugano M, Tsuchida K, Makino N. High-density lipoproteins protect endothelial cells from tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 272: 872-876.

- Surya II, Gorter G, Akkerman JW. Arachidonate transfer between platelets and lipoproteins. *Thromb Haemost* 1992; 68: 719-726.
- Tabas I. 2002. "Consequences of Cellular Cholesterol Accumulation : Basic Concepts and Physiological Implications." *October* 110 (7). doi:10.1172/JCI200216452.The.
- Tabet F, Lambert G, Cuesta Torres LF, Hou L, Sotirchos I, Touyz RM, Jenkins AJ, Barter PJ, Rye K-A. Lipid-free apolipoprotein A-I and discoidal reconstituted highdensity lipoprotein differentially inhibit glucose-induced oxidative stress in human macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011; 31: 1192-1200.
- Tholstrup T, Marckmann P, Jespersen J, Sandström B. Fat high in stearic acid favorably affects blood lipids and factor VII coagulant activity in comparison with fats high in palmitic acid or high in myristic and lauric acids. *Am J Clin Nutr.* 1994 Feb;59(2):371-7.
- Tholstrup T, Marckmann P, Vessby B, Sandström B. Effect of fats high in individual saturated fatty acids on plasma lipoprotein[a] levels in young healthy men. *J Lipid Res.* 1995;36(7):1447-52.
- Uehara Yoshinari, Thomas Engel, Zhengchen Li, Christian Goepfert, Stephan Rust, Xiaoqin Zhou, Claus Langer, Christian Schachtrup, Johannes Wiekowski, Stefan Lorkowski, Gerd Assmann, and Arnold von Eckardstein 2002. Polyunsaturated Fatty Acids and Acetoacetate Downregulate the Expression of the ATP-Binding Cassette Transporter A1. *Diabetes* 51: 2922-2927
- Van Lenten BJ, Navab M, Shih D, Fogelman AM, Lusis AJ. The role of high-density lipoproteins in oxidation and inflammation. *Trends Cardiovasc Med* 2001; 11: 155-161.
- Vasandani C, Kafrouni AI, Caronna A, Bashmakov Y, Gotthardt M, Horton JD, Spady DK. Upregulation of hepatic LDL transport by n-3 fatty acids in LDL receptor knockout mice. *J Lipid Res.* 2002; 43:772-784.
- von Eckardstein A, Hersberger M, Rohrer L. Current understanding of the metabolism and biological actions of HDL. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2005;8(2):147-52.
- Wang Yutong and John F. Oram. 2002. Unsaturated Fatty Acids Inhibit Cholesterol Efflux from Macrophages by Increasing Degradation of ATP-binding Cassette Transporter A1 *J. Biol. Chem* 277: 5692-5697
- Wang, N., Arai, T., Ji, Y., Rinninger, F. and Tall, A. R. (1998). "Liver-specific overexpression of scavenger receptor BI decreases levels of very low density

- lipoprotein ApoB, low density lipoprotein ApoB, and high density lipoprotein in transgenic mice." *J Biol Chem* 273(49): 32920-6.
- Willett WC, Sacks F, Trichopoulou A, Drescher G, Ferro-Luzzi A, Helsing E, Trichopoulos D: Mediterranean diet pyramid: a cultural model for healthy eating. *Am J Clin Nutr* 61 (Suppl 6):1402S-1406S, 1995. Chong, K. S., R. J. Nicolosi, R. F. Rodger, D. A. Arrigo, R. W. Yuan, J. J. Mackey, S. Georas and P. N. Herbert. 1987. Effects of dietary fat saturation on plasma lipoproteins and high density lipoprotein metabolism of the rhesus monkey. *J. Clin. Inv.* 79:675-683
- Wilson PW (1990) High-density lipoprotein, low-density lipoprotein and coronary artery disease. *Am J Cardiol* 66:7A–10A.
- Woodside JV, Kromhout D. Fatty acids and CHD. *Proc Nutr Soc.* 2005;64:554-564.
- Yancey, P. G., Bortnick, A. E., Kellner-Weibel, G., de la Llera-Moya, M., Phillips, M. C. and Rothblat, G. H. (2003). "Importance of different pathways of cellular cholesterol efflux." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23(5): 712-9.
- Yao HR, Liu J, Plumeri D, Cao YB, He T, Lin L, Li Y, Jiang YY, Li J, Shang J. Lipotoxicity in HepG2 cells triggered by free fatty acids. *Am J Transl Res.* 2011 May 15;3(3):284-91.
- Yvan-Charvet L, Pagler TA, Seimon TA, Thorp E, Welch CL, Witztum JL, Tabas I, Tall AR. ABCA1 and ABCG1 protect against oxidative stress-induced macrophage apoptosis during efferocytosis. *Circ Res* 2010; 106: 1861-1869.
- Zerrad-Saadi A, Therond P, Chantepie S, Couturier M, Rye K-A, Chapman MJ, Kontush A. HDL3-Mediated inactivation of LDL-associated phospholipid hydroperoxides is determined by the redox status of apolipoprotein A-I and HDL particle surface lipid rigidity: relevance to inflammation and atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009; 29: 2169-2175. Hunter JE, Zhang J, Kris-Etherton PM. Cardiovascular disease risk of dietary stearic acid compared with trans, other saturated, and unsaturated fatty acids: a systematic review. *Am J Clin Nutr.* 2010 Jan;91(1):46-63. doi: 10.3945/ajcn.2009.27661. Epub 2009 Nov 25.