



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CAMERINO
SCUOLA DI BIOSCIENZE E MEDICINA VETERINARIA

Corso di Laurea in
BIOLOGIA DELLA NUTRIZIONE
(CLASSE L-13)

Profili Cardio-Metabolici di Rischio

Laureanda
Lisa Patrizi

Tutor Unicam
Prof. Francesco Alessandro Palermo

Tutor
Dott. Michele Spina
Dr. Antonio Fusco
In collaborazione nel progetto
Dr. Emidio Troiani
Dr. Attilio Cavezzi
Dr. Luca Bastiani

ANNO ACCADEMICO 2021/ 2022

INDICE

INTRODUZIONE

1. IL DUPLICE PARADOSSO DEL COLESTEROLO

1.1 Nuove linee guida europee sulla prevenzione cardiovascolare e dati di laboratorio nel trimestre 2023

2. INFLAMMAGING: STATO DELL'ARTE

2.1 Modello di calcolo predittivo

3. PROFILO LIPIDICO ATEROGENO

3.1 Apolipoproteina-B

3.2 Small-dense-LDL (sd-LDL)

3.2.1 Limiti di riferimento delle sd-LDL

3.3 Ruolo pro-aterogeno delle Lipoproteine Remnants

3.4 LDL ossidate (ox-LDL)

3.5 Lipoproteina a (Lpa)

3.5.1 Modulazione della Lp(a) con alimentazione e nutraceutica

4. PROFILO D'INFIAMMAZIONE CELLULARE

4.1 Infiammazione e CAD

4.2 Meccanismi cardioprotettivi degli acidi grassi ω -3 e ruolo innovativo delle pro-resolvine nella gestione dell'inflammaging

4.2.1 Lipidomica eritrocitaria e indici utili

4.2.2 Esempi di impiego della lipidomica

5. CONCLUSIONI

5.1 Modello di calcolo

5.2 Studio osservazionale

5.3 Risultati e grafici statistici

5.4 Un significato clinico osservazionale alle sd-LDL

5.5 Analisi statistica dei dati presso il CNR di ROMA

BIBLIOGRAFIA

INTRODUZIONE

Focus: la vera prevenzione

Moderne ricerche scientifiche e nuove discipline, come la fisica quantistica, l'epigenetica e le neuroscienze, stanno cambiando il paradigma della Medicina, ma ci vorrà ancora tempo prima che i protocolli ufficiali di prevenzione e cura delle malattie si adattino alle nuove e rivoluzionarie conoscenze. Intanto si assiste però alla crescita esponenziale di malattie cardiovascolari, oncologiche, metaboliche (diabete mellito) e neuro-degenerative (Alzheimer, Parkinson, demenze).

Si è scoperto da tempo che tutte queste patologie, più che nell'eredità del DNA, affondano le radici principalmente nell'*infiammazione cronica silente* e nello *stress ossidativo cellulare*, condizioni dovute allo stile di vita - peculiarmente occidentale - che si sviluppano fin da giovani, ma non si manifestano con sintomi evidenti e non sono diagnosticabili con i tradizionali esami di laboratorio.

Per rilevare tali condizioni, occorre quindi *valutare*, con esami di laboratorio particolari:

- *la condizione delle membrane cellulari*, espressione di eventuale infiammazione cronica silente (Lipidomica di membrana eritrocitaria)
- *lo stress ossidativo*, cioè il rapporto tra la produzione di radicali liberi e antiossidanti (d-ROMs)
- *eventuali danni causati dagli zuccheri* (Glicazione)
- *la tipologia delle molecole del colesterolo LDL*, per comprendere la possibile pericolosità di questo tipo di lipoproteine (LDL-ossidate, Lipoprint, small-dense LDL)
- *la condizione del microbiota intestinale* (Disbiosi Test)
- *altri valori plasmatici* da ricercare in base alle condizioni del paziente (eventuali carenze di Vitamina D, condizioni di insulino-resistenza, etc...)

I primi due esami sono fondamentali e imprescindibili per valutare il livello di rischio individuale e per poter attuare la vera prevenzione epigenetica, attraverso modifiche dello stile di vita: corretta alimentazione e attività fisica, integrazione mirata di vitamine, sali minerali e acidi grassi omega-3, il tutto in relazione alle condizioni accertate con le analisi di laboratorio specifiche.

Il seguente lavoro di tesi, nello specifico, si articolerà in un'iniziale disamina di tutti i markers più rilevanti nella valutazione di un *rischio cardio-metabolico*, con relativi studi a sostegno della loro validità come indicatori. Si prenderanno in considerazione sia i parametri attualmente indagati con le analisi di routine, sia ulteriori markers proposti nella letteratura scientifica più e meno recente.

Questi parametri saranno poi radunati e associati tra loro in un foglio operativo Excel, in cui verranno inseriti i valori risultanti dalle analisi di individui oggetto di osservazione e studio principalmente da parte del dottor Antonio Fusco, cardiologo in collaborazione nel progetto.

1. IL DUPLICE PARADOSSO DEL COLESTEROLO

A livello biologico, il *colesterolo* è una molecola organica con funzioni fondamentali per l'organismo, sia di tipo strutturale che metabolico.

È uno sterolo ubiquitario nelle membrane citoplasmatiche delle cellule animali, oltre che un importante componente delle guaine mieliniche dei nervi. È inoltre la molecola di partenza nella sintesi degli ormoni steroidei, degli acidi biliari e della vitamina D.

Nell'organismo umano si fa distinzione tra un *pool esogeno* ed uno *endogeno*, di colesterolo: a seconda che sia assunto con la dieta, o prodotto dalla via biosintetica. L'equilibrio tra i due è finemente regolato da meccanismi che ne bilanciano la produzione, in base alle quantità assunte con l'alimentazione. Non esistono meccanismi specifici di degradazione, solo di conversione nelle molecole di cui è precursore (per lo più i sali biliari), questo proprio in riflesso del fatto che è una molecola essenziale che l'organismo non prevede in nessun caso di catabolizzare.

A livello clinico, sono stigmatizzati come nocivi eventuali difetti di tale meccanismo di regolazione - o eccessi nella dieta - che portino il colesterolo totale sopra livelli stabiliti accettabili, indicativamente di 200 mg/dL.

Recenti studi e revisioni della letteratura scientifica in merito hanno messo in luce, però, la natura paradossale e limitata di questa concezione del colesterolo, ancora troppo legata al calcolo del suo valore totale.

Anzitutto, infatti, si è dovuto correggere il radicato assioma per cui alti livelli di colesterolo (totale) implicassero - o potessero predire – malattie cardiovascolari, o peggio mortalità ad esse correlata.

Già con questa iniziale revisione si è fatta una prima rilevante distinzione tra colesterolo “buono” (associato alle *high-density lipoproteins*, **HDL-C**) e “cattivo” (associato invece alle *low-density lipoproteins*, **LDL-C**).

Successivamente si è però rivelata necessaria un'ulteriore distinzione: neanche il valore del colesterolo associato alle LDL-C è di per sé sufficiente a essere predittivo di patologie cardiovascolari, in quanto ne va analizzata (e quantificata) specificamente la *frazione ossidata (LDL-ossidata)*. È quest'ultima, infatti, quella effettivamente coinvolta nelle formazioni aterogene e nelle patologie cardiovascolari ad esse conseguenti.

Proprio alla luce di queste ultime considerazioni, si rivela incompleta, quindi, la concezione del colesterolo associato alle LDLs come nocivo in assoluto.

La riduzione del valore, consigliata dalle linee guida sia in via preventiva che terapeutica, si ottiene agendo sulla dieta e/o assumendo farmaci nei casi più gravi. Sia la dieta che la terapia sono indicate, quindi, qualora si stia raggiungendo, o superando, una soglia stabilita (mediamente 160 mg/dL), che però non distingue tra le porzioni ossidata e non ossidata.

La pericolosità di tale “appiattimento” dei valori, è da individuare nel fondamentale coinvolgimento delle *LDLs non ossidate* in importanti meccanismi di *difesa innata* dell’organismo: è appurato, infatti, che esse leghino microrganismi, o loro prodotti tossici, neutralizzandone la patogenicità [1].

Quindi un abbassamento drastico del livello totale delle LDLs, porta, sì, a un ridimensionamento del rischio cardiovascolare – andando a ridurre la frazione di LDLs ossidate, aterogene -, ma allo stesso tempo espone l’organismo a un più alto rischio di sviluppare forme tumorali indotte da virus, o di contrarre più frequentemente infezioni virali – poiché riduce anche la frazione di LDLs non ossidate, coinvolte nei meccanismi di difesa necessari.

È relativamente recente – risale al 2016 – proprio una revisione di tutti gli studi sulla *correlazione tra i livelli di LDLs e la mortalità*, dovuta a cause generali o collegata a malattie cardiovascolari, specificamente in campioni che rappresentano la popolazione generale di persone oltre i 60 anni (principale target terapeutico di elezione) [2].

In tutti i 19 studi di coorte selezionati e presi in esame per la revisione, il colesterolo associato a LDLs era assunto come un fattore di rischio predittivo di mortalità (generale e/o per patologie cardiovascolari): veniva ipotizzata, cioè, una relazione lineare tra i valori di LDL-C e la mortalità. Quindi all’aumentare dei primi, ci si aspettava un aumento (statisticamente significativo) anche del numero di morti, per cause generiche o per patologie cardiovascolari.

In 16 dei 19 studi, tuttavia (e, in 14 di questi, con significatività statistica), si è disegnata invece un’inaspettata *correlazione inversa*, per cui - al contrario - la frequenza della mortalità (sia generica, che per patologie cardiovascolari) aumentava nelle coorti con più bassi livelli di LDL-C.

Authors	Race if indicated	Sex	N	Age; years	Obs. Years	All-cause mortality LDL-C tertiles or quartiles (HRs)				CV mortality	Exclusion criteria
						I	II	III	IV		
Zmetbaum <i>et al</i> ¹		MF	350	75-85	6, 3	No association				NI	Terminal illness, dementia
Kronmal <i>et al</i> ²		MF	747	66-75	10	No association				NI	None
			176	>75		No association				NI	
Råhä <i>et al</i> ¹⁰		MF	347	>65	11	NI				No association	Living in an institution
Fried <i>et al</i> ³		MF	5201	>65	4.8	1.0	?	?	0.66 (significant)	NI	Wheelchair user; cancer treatment
Chyou and Eaker ¹¹		M	367	>65	8-10	No association				NI	None
		F	622			No association				NI	
Weverling-Rijnsburger <i>et al</i> ¹²		MF	599	>85	4	1.0	0.57	0.71	p for trend*	No association	None
Schupf <i>et al</i> ¹³		MF	2277	>65	3	1.0	0.79	0.63	0.53	NI	Dementia
Tikhonoff <i>et al</i> ¹⁴		M	1233	>65	11, 1	Mirror-J-formed association with the highest risk in the lowest quartile				Almost U-formed association with the highest risk in the lowest quartile* Mirror-J-formed association with the highest risk in the lowest quartile*	Dementia
		F	1887			Inverse association*					
Störk <i>et al</i> ¹⁵		M	403	>70	4	No association				No association	None
Akerblom <i>et al</i> ⁶		MF	705	>65	3.5	1.0	0.89	0.72	0.56*	NI	Dementia, first year deaths
		MF	797			1.0	0.79	0.58	0.53*		
		MF	1054			1.0	0.79	0.79	0.71		
Upmeyer <i>et al</i> ⁷		MF	1032	70	12	No association				No association	None
Nilsson <i>et al</i> ⁸		M	210	75	10	No association				NI	None
		F	222			No association				NI	
Werle <i>et al</i> ⁹		MF	187	>80	8, 7	No association				No association	None
Bathum <i>et al</i> ^{20†}		M	13 733	60-70	1-9	1.0	0.67***	0.49***	0.45***	NI	Terminal disease, CVD, diabetes, patients with a prescription of statin during the last year before test date
		F	7493	>70		1.0	0.71***	0.60***	0.52***		
		F	14 298	60-70		1.0	0.56***	0.45***	0.47***		
		F	9142	>70		1.0	0.66***	0.52***	0.46***		
Linna <i>et al</i> ²¹		MF	1260	>64	10	Inverse association**				NI	None
Jacobs <i>et al</i> ²²		MF	512	78-85	8	No association				NI	None
		MF	702	85-90	5	No association				NI	None
Takata <i>et al</i> ²³		MF	207	85	10	Survivors 3.2 mmol/L; non-survivors: 2.9 mmol/L**				No association	None
Lv <i>et al</i> ²⁴		M	266	>80	3	1.0	0.67	0.43	0.41*	NI	First year deaths
		F	596			1.0	0.69*	0.57**	0.59*		
		MF	596			1.0	0.72*	0.59**	0.60*		
Blekenhorst <i>et al</i> ²⁵		F	1469	>70	10	NI				No association	None

In the study by Fried *et al*, degree of significance was not reported.
†p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001.
‡HR for 7415 men and 8314 women on statin treatment was 0.63 and 0.61, respectively.
F, females; M, males; NI, no information.

Figura 1

Correlazione tra colesterolo-LDL e mortalità rispettivamente per tutte le cause e per CVD, in 19 studi comprendenti 30 coorti con 68.094 individui della popolazione generale di età superiore a 60 anni [2]

Le evidenze dunque non erano coerenti con una visione del colesterolo associato a lipoproteine a bassa densità (LDL-C) come connaturatamente aterogeno, costringendo a prendere in esame altre variabili e spiegazioni, in primis considerando l'ipotesi della *modificazione ossidativa lipidica* nell'eziogenesi dell'aterosclerosi.

Un'alternativa proposta, per tenere in considerazione il rischio di bias dei dati, era quella della *causalità inversa*: cioè che patologie molto gravi potessero comportare un drastico abbassamento dei livelli di LDL-C, a ridosso della morte dei soggetti. Parziale supporto a tale congettura si è trovato in studi da cui erano stati esclusi soggetti con malattie terminali, o morti entro il primo anno di osservazione, dai quali è risultata o l'assenza di una correlazione tra l'LDL-C e la mortalità (generale o per patologie cardiovascolari), o una correlazione inversa (e questo con significatività statistica).

Ma esperimenti su animali e *in vitro*, hanno evidenziato come più probabile l'ipotesi che siano proprio i bassi livelli di LDL-C a rendere i soggetti più suscettibili a gravi patologie [3, 4], e non viceversa: si è appurato infatti il ruolo delle LDLs nell'*inattivazione diretta*

di microrganismi e loro metaboliti tossici per l'uomo [1], e inoltre da un importante studio (Iribarren et al) [5] con tempo di osservazione di 15 anni, di individui inizialmente sani, è risultato che soggetti con livelli di LDL-C più bassi all'inizio, sono stati ospedalizzati significativamente più spesso per patologie infettive, verificatesi anche oltre il periodo di osservazione. Quindi il basso livello di colesterolo, in questi casi, era stato registrato in un periodo in cui le persone risultavano sane, pertanto non poteva essere stato provocato da malattie che ancora non avevano contratto al momento della misurazione.

Una revisione ancora successiva (del 2018), ipotizza che altri fattori congeniti, non lipidici, abbiano un ruolo ancora più marcato nella valutazione del rischio cardiovascolare, rispetto al solo colesterolo-LDL, nel caso specifico in soggetti con ipercolesterolemia familiare [6].

Il focus della revisione era quello di proporre un aggiornamento e/o un'integrazione di nuovi parametri da indagare specificamente, per una valutazione più affidabile e completa del rischio cardio-metabolico.

Dopo un'iniziale disamina sull'incompletezza del solo colesterolo - totale o associato a LDL-C - come indicatore predittivo di rischio cardiovascolare, nel report vengono nominati, ad esempio, dei fattori non lipidici plausibilmente associati al genotipo FH (*familial hypercholesterolemia*). L'eredità di tali fattori spiegherebbe come soggetti con ipercolesterolemia familiare, pur presentando valori lipidici negli standard, possano incorrere ugualmente e prematuramente in patologie cardiovascolari. Proprio tra soggetti con simili anamnesi, l'anormalità più comune e documentata è risultata a livello di *sistemi di coagulazione*, il che potrebbe far orientare la terapia a un'azione anche su questi ultimi. Nel report si esamina inoltre, in soggetti con FH in eterozigosi, un altro fattore di rischio: la *lipoproteina a*, proteina del plasma costituita da due apolipoproteine (Apo-A e Apo-B) [7, 8]. La sua concentrazione è geneticamente determinata e resta relativamente costante, ma studi angiografici hanno dimostrato che livelli alti sono associati a eventi di CHD (*coronary heart disease*) [9]; inoltre, il rischio collegato a elevati valori plasmatici di lipoproteina a, risulta dello stesso ordine di grandezza di quello indicato da alti livelli di colesterolo-LDL [10, 11]. Prove di tale similare aterogenicità sono state fornite dalla localizzazione di entrambe le proteine (la lipoproteina a e le LDL-C) in arterie ateromatose e innesti di vene [12 - 14]. Nonostante la stretta correlazione strutturale con

le LDL-C, però, i livelli di lipoproteina A risultano regolati indipendentemente [9], il che la rende un marker analizzabile separatamente.

È inoltre importante sottolineare che la sua porzione proteica sia responsabile di due meccanismi entrambi critici e rilevanti (*come verrà più ampiamente spiegato nel paragrafo 3.4*): infatti apo-B è coinvolta nel trasporto del colesterolo e l'adesione alle LDL-C, mentre apo-A è coinvolta nell'inibizione della degradazione del coagulo ematico, con ripercussioni sui sistemi di coagulazione di cui ampiamente disserta lo studio sopracitato [6].

Una recentissima review del 2020, va a sostegno della tesi per cui il marker LDL-C, isolatamente, è uno scarso indicatore di rischio di CHD, sia nella popolazione generale che nei casi di FH [15], e come ci sia una necessità di rivalutare tutti i markers di rischio cardiovascolare.

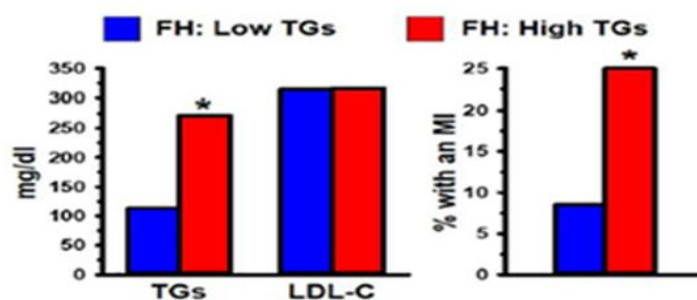


Figura 2

A destra: trigliceridi plasmatici a digiuno (TGs) di uomini con FH in eterozigosi basso (< 200mg/dL; blu) o alto (> 200mg/dL; rosso).

A sinistra: Il gruppo con alti TG presenta un'incidenza significativamente maggiore di IM rispetto al gruppo con bassi TG.

FH, ipercolesterolemia familiare; LDL-C, colesterolo lipoproteico a bassa densità; IM, infarto del miocardio. [15]

Bittencourt *et al* [16] hanno recentemente riportato come una percentuale di individui con LDL-C molto alto (> 190 mg/dL) avessero un punteggio di calcio delle arterie coronariche (CAC) pari a zero. Quindi, nonostante il loro alto livello in LDL-C, mostravano un rischio molto basso di futuri eventi coronarici.

Le ultime revisioni scientifiche indicano in definitiva come quantità elevate di LDL-C non giustifichino da sole l'aterogenicità associata a queste particelle, ed è significativo che *livelli plasmatici simili di LDL possano essere associati a gradi diversi di rischio cardiovascolare*. Ad esempio altri studi hanno evidenziato che pazienti FH con elevati

trigliceridi (TG > 200 mg/dl) erano più esposti all'infarto del miocardio rispetto a pazienti FH con livelli di trigliceridi inferiori (TG < 200 mg/dl), indipendentemente dal valore di LDL-C, che era medesimo in entrambi i gruppi di studio [16].

Inoltre è stato individuato come l'**ADRT** (*Atherogenic dyslipidaemia risk triad*) sia costituita da elevati trigliceridi (TG) e small-dense-LDL, associati a bassi livelli di HDL [15]. Molti autori hanno evidenziato che l'ipercoagulazione è un fattore di rischio più importante di CHD rispetto ai livelli di LDL-C nei pazienti FH [15].

Un'importantissima meta-analisi del 2014, che ha coinvolto il Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA) e il Framingham Heart Study (FHS), condotto su una popolazione di 7142 individui di entrambi i sessi che non avevano avuto segnali di Fibrillazione Atriale (AF), ha individuato come nei successivi dieci anni di follow-up sia il colesterolo-HDL che i trigliceridi, ma non il colesterolo-LDL né quello totale, sono associati a fattori di rischio di AF [17].

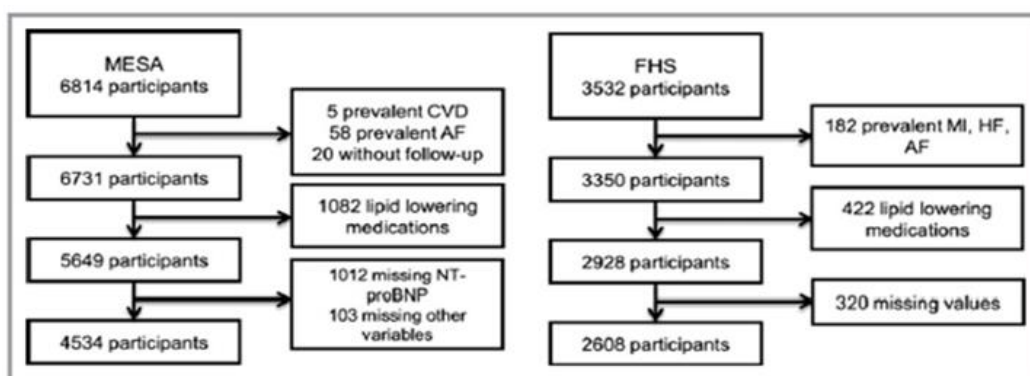


Figura 3

Diagramma di flusso dei partecipanti allo studio: MESA, 2000–2002 e FHS, 1995–1998.

AF fibrillazione atriale; CVD, malattie cardiovascolari; FHS, Studio sul cuore di Framingham; HF, scompenso cardiaco; MESA, studio multietnico sull'aterosclerosi; IM, infarto miocardico; NT-proBNP, pro-ormone N-terminale di tipo B peptide natriuretico.

[17]

Alti livelli di HDL e bassi livelli di TG, secondo lo studio diminuiscono l'incidenza di AF. Nessuna incidenza di rischio si è avuta con i livelli di colesterolo-LDL.

Sempre partendo dall'osservazione di premature manifestazioni di patologie CAD (*coronary artery disease*), un interessante studio indiano [18] propone l'utilizzo di avanzati indici aterogeni (*advanced atherogenic index, AAI*) in alternativa a quelli attualmente calcolati, basandosi su una selezione di parametri lipidici.

Proprio l'elevata frequenza di CAD anche in soggetti normolipidemicici ha fornito lo spunto per il calcolo di ulteriori indici, statisticamente meglio predittivi della patogenesi dell'aterosclerosi, malattia degenerativa alla base degli episodi di CAD.

I nuovi indici proposti tengono conto specificamente della frazione ossidata delle LDLs (Ox-LDL), delle LDLs piccole e dense (sd-LDLs), dell'apolipoproteina A1 (Apo-A1), della lipoproteina A (Lpa) e infine dell'apolipoproteina B (Apo-B).

Fondamentale (soprattutto per la prevenzione) risulta proprio la valutazione delle **LDLs piccole e dense**, che risultano associate ad un più alto rischio di incorrere in CAD, perché tendono più facilmente ad ossidarsi, e una volta ossidate si depositano nei macrofagi formando le cellule schiumose [19].

Le analizzeremo più dettagliatamente nel *paragrafo 3.2*.

1.1 Nuove linee guida europee sulla prevenzione cardiovascolare e dati di laboratorio nel trimestre 2023 [1]

Le ultime LG sono del 2021 [2]. Nell'elaborazione delle funzioni predittive per la valutazione del rischio cardiovascolare (RCV) sono stati aggiunti ai maggiori eventi CV fatali (infarto, ictus) gli eventi non fatali. Inoltre sono state elaborate considerazioni e stime specifiche per coloro che hanno già avuto un evento CV o sono affetti da altre patologie.

Per raggiungere questo scopo è stato aggiornato lo strumento *SCORE* (Systematic COronary Risk Evaluation), già elaborato nel 2003, attraverso l'analisi di dati provenienti da studi epidemiologici condotti tra il 1990 e il 2009. Questa nuova carta, applicabile alle persone dai 40 ai 69 anni, è stata identificata come SCORE 2.

Nelle LG 2021 sono riportate alcune novità rispetto alle precedenti del 2016, in particolare nell'utilizzo della carta del rischio:

- i) la valutazione del RCV può essere eseguita sulle persone apparentemente sane di tutte le età a partire dai 40 anni e provenienti da paesi diversi (inclusi anche i paesi dell'est Europa e quelli che si affacciano sul mediterraneo, per dar modo di valutare anche i migranti);
- ii) le nuove stime comprendono la probabilità di andare incontro a un primo evento CV maggiore anche non fatale - mentre nelle precedenti si consideravano solo gli eventi fatali;

- iii) al posto del colesterolo totale si utilizza il colesterolo-non-HDL;
- iv) in queste LG l'Italia passa dalla categoria di paese a rischio basso a quella di paese a rischio moderato, indicando che nella popolazione italiana dagli anni '80 agli anni '90 il valore medio di alcuni fattori di rischio è aumentato (per esempio il fumo nelle donne).

Nelle persone *senza malattie cardiovascolari accertate*, indipendentemente dal rischio, le raccomandazioni suggeriscono - considerando le preferenze del paziente - di raggiungere valori di pressione sistolica < 140 mmHg, e se tollerato anche ≤ 130 mmHg, e si consiglia di mantenere il *colesterolo-LDL* < 100 mg/dL, portandolo al di sotto di 70 mg/dl in chi è a rischio alto e inferiore a 55 mg/dl in chi è a rischio molto alto, o la riduzione del 50% del valore di partenza, se già basso, nell'ottica che *più basso è meglio (lower is better)*.

Scompare l'accettazione di colesterolo-LDL < 116 mg/dL nelle persone a basso rischio, previsto dalle LG europee del 2019 sul trattamento delle dislipidemie.

Coloro che hanno già avuto un infarto o un ictus sono considerati a rischio molto alto e i valori di colesterolo-LDL raccomandati sono inferiori a 55 mg/dl, quelli della pressione arteriosa sistolica sotto 140 mmHg, con tendenza ottimale fra 130 e 120 mmHg. Ovviamente i valori ottimali nelle persone a rischio alto o molto alto sono molto difficili da raggiungere senza un'adeguata terapia farmacologica che abbassi la pressione arteriosa e/o la colesterolemia.

Nel primo trimestre 2023 presso il Laboratorio Dr Fioroni di San Benedetto del Tronto (AP) sono stati eseguiti 3793 dosaggi del colesterolo-LDL.

Il 14% dei pazienti sono nella zona verde, il 27% nella zona borderline tra 80 e 114, e il 59% nella zona rossa secondo le linee guida 2021.

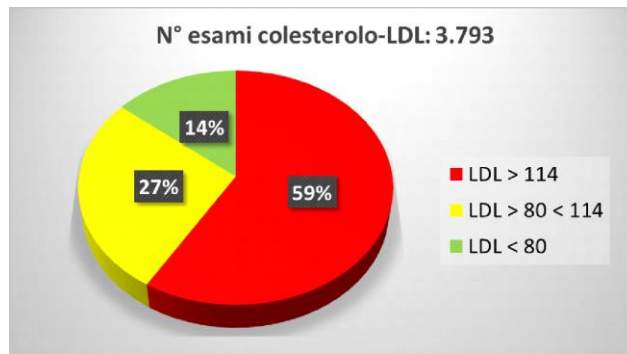


Figura 4

Numero di esami di LDL-C effettuati dal laboratorio di analisi Fioroni nel primo trimestre del 2023, e distribuzione dei valori risultanti per fasce di criticità.

Considerando che i pazienti con LDL < 80 mg/dl sono verosimilmente in terapia con statine, o molecole statin like, otteniamo che il **72,7 % dei pazienti esaminati dovrebbe avere una *terapia farmacologica ipocolesterolemizzante***, indipendentemente dal livello di rischio.

2. INFLAMMAGING E RISCHIO CARDIOVASCOLARE: STATO DELL'ARTE

La patogenesi dell'*aterosclerosi* risente sia di una suscettibilità genetica, sia di fattori ambientali e di rischio cardiovascolare individuali.

Evidenze sperimentali sempre più solide suggeriscono che, in associazione ai fattori di rischio cardiovascolare "classici", i *fenomeni infiammatori* ricoprono una posizione di rilievo nella dinamica del processo aterosclerotico coronarico e delle *Sindromi Coronariche Acute (SCA)*.

Pertanto i markers sistemici di infiammazione stanno assumendo un ruolo sempre più importante nella stratificazione prognostica e nella gestione terapeutica dei pazienti con SCA.

La risposta infiammatoria è sostenuta e/o stimolata dallo *stress ossidativo*, che può costituire la connessione tra i disturbi lipidici e l'infiammazione.

Da oltre 20 anni è noto che lo stress ossidativo - in particolare l'ossidazione delle LDL - può influenzare lo sviluppo della malattia aterosclerotica, e che alcuni marcatori di ossidazione delle LDL (LDL ossidate circolanti, autoanticorpi anti-LDL ossidate) potrebbero essere utili nel valutare il rischio di sviluppo di patologie nei pazienti [1-3].

Le lipoproteine a bassa densità, infatti, sono le principali proteine di trasporto per il colesterolo nel plasma umano, e (date le loro dimensioni ridotte) sono un substrato facilmente suscettibile all'ossidazione.

Una volta ossidate sono più reattive con i tessuti circostanti, e possono depositarsi all'interno del rivestimento delle arterie, dando avvio all'aterogenesi e le patologie cardiovascolari conseguenti. Protagonisti ulteriori sono i macrofagi.

Gli eventi iniziali dell'*aterogenesi* sono da identificarsi sia nel danno dell'endotelio, sia nell'accumulo e la modificazione (per aggregazione, ossidazione e/o glicosilazione) delle lipoproteine a bassa densità nell'intima delle arterie, eventi precoci e sinergici.

Penetrati nell'intima, i macrofagi fagocitano le lipoproteine modificate e, a causa dell'impossibilità di metabolizzare il colesterolo in esse contenuto, si trasformano nelle cellule schiumose (o spumose), caratteristiche delle strie lipidiche (*fatty streaks*).

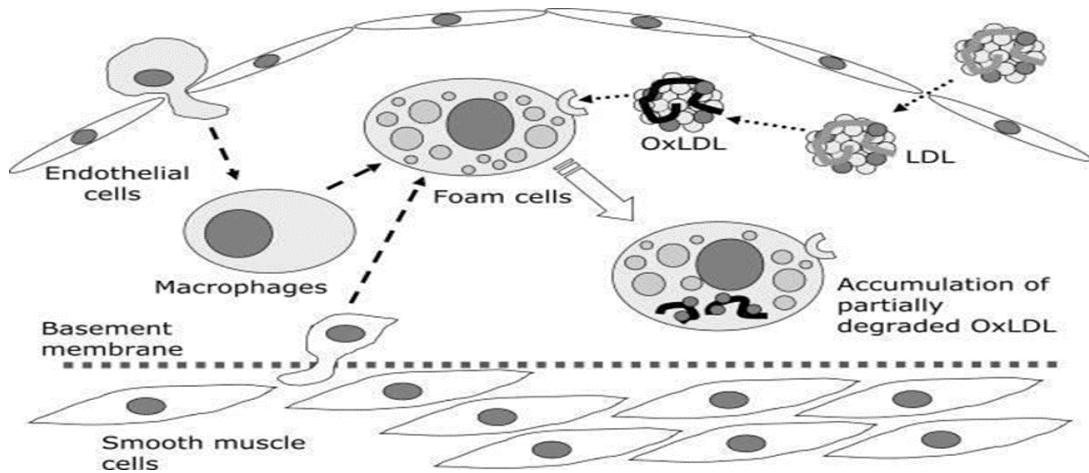


Figura 5

Ipotesi della “Oxidative Modification” nella patogenesi dell’aterosclerosi. In figura viene schematizzata la formazione delle cellule schiumose nelle lesioni aterosclerotiche. L’LDL nativo penetra all’interno della tonaca intima arteriosa e qui viene ossidato [ox-LDL] per poi essere fagocitato dai macrofagi reclutati, che diventano Cellule Schiumose (Foam Cells) ad alto contenuto lipidico. L’ox-LDL ha un’affinità inferiore per i recettori delle LDL, e sviluppa invece un’affinità elevata per i recettori di cattura dei macrofagi. [4]

Quindi il modello della “*modificazione ossidativa*” per la patogenesi dell’aterosclerosi, ipotizza la formazione della placca aterogena in seguito a:

1. Ossidazione, cioè modificazione delle LDL a causa di agenti chimici altamente reattivi (stress ossidativo)
2. Infiammazione, processo biologico in cui si promuove l’espressione sia di molecole di adesione sulla membrana cellulare, sia di sostanze di secrezione, biologicamente attive e chemiotattiche, come *citochine*, *fattori di crescita* e *radicali liberi*; queste sostanze favoriscono il richiamo e la successiva infiltrazione di leucociti, e la trasformazione dei monociti in macrofagi.

In tabella vengono evidenziati i valori di LDL-ossidate correlati con gruppi di controllo e gruppi con sindromi coronariche conclamate (SCA), riportati in un’importante rivista medica [5].

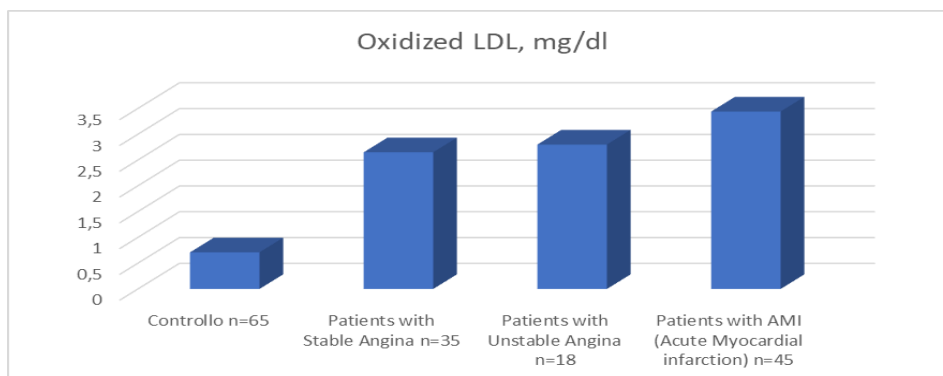


Figura 6

Valori di LDL-ossidate correlati con gruppi di controllo e gruppi con sindromi coronariche conclamate (SCA), riportati in un'importante rivista medica [5]

La comunità scientifica sta quindi dando sempre più importanza al controllo dell'infiammazione e dell'ossidazione, in ottica preventiva e di aumento della longevità del paziente, per valutare il rischio di patologie sia cardiovascolari [6] che degenerative, legate all'*invecchiamento* e all'*inflammaging* (cancro, Alzheimer, Parkinson etc.) [7].

2.1 Modello di calcolo predittivo

Nella costruzione di un *modello di calcolo predittivo di rischio Cardio Metabolico (CM)*, si è pensato quindi di distinguere *quattro profili di rischio*, che in maniera sinergica possono avviare dei processi aterogeni e degenerativi.

In ognuno dei profili di rischio sono stati considerati sia i markers canonici che ad oggi la comunità scientifica indaga con le analisi di routine, sia parametri integrativi proposti per una predittività maggiore, che richiedono analisi più specifiche.

1. Profilo Lipidico aterogeno

Markers proposti:

- APO-B
- sd-LDL
- Lipoproteina a

Markers in valutazione:

- LDLox
- Indici di aterogenicità predittivi:
 - Lipid Tetrad Index (LTI)

- Lipid Pentad Index (LPI)

2. Profilo di infiammazione cellulare

Markers proposti:

- Rapporto AA/EPA (da lipidomica eritrocitaria)
- Omega_3 Index
- Omocisteina

3. Profilo ossidativo

Marker proposto:

- d-ROMs (perossidazione lipidica)

4. Profilo di insulino-resistenza

Markers proposti:

- Rapporto Trigliceridi/HDL
- Homa Index

Nei paragrafi successivi verranno approfonditi i principali profili, con una revisione della letteratura relativa ai markers specifici proposti.

La ricerca e la selezione degli articoli citati ha sempre tenuto conto dell'affidabilità di fonti, siti e riviste di pubblicazione, della significatività statistica degli studi condotti e dell'utilità dei lavori di revisione e meta-analisi.

Il presente elaborato e il lavoro di stage, si sono conclusi poi con uno **studio osservazionale** su un campione di 57 pazienti, con e senza patologie cardiovascolari pregresse. Sono stati selezionati infatti senza limiti di età (solo oltre i 18 anni) né esclusione per altri parametri, in modo da fornire un campione il più possibile eterogeneo.

Ognuno dei pazienti è stato sottoposto all'intero pacchetto di analisi, e per ognuno sono poi stati inseriti i valori nel foglio di lavoro costruito, verificando che la fascia di rischio risultante fosse coerente con la situazione patologica o meno dei soggetti, restituendo un quadro fedele della condizione cardio-metabolica di ognuno.

Si analizzeranno e descriveranno più dettagliatamente gli out-put dello studio nel *capitolo* 5, conclusivo.

3. PROFILO LIPIDICO ATEROGENO

3.1 Apolipoproteina-B (Apo-B)

La misura del colesterolo LDL (LDL-C) è il caposaldo della valutazione del rischio cardiovascolare, e si considera per la verifica dell'efficacia della terapia da quasi due decenni. Quando le lipoproteine furono identificate verso la metà del secolo scorso, esse venivano comunemente quantificate misurando il loro contenuto in colesterolo.

Più tardi, quando i costituenti proteici della lipoproteina vennero riconosciuti e caratterizzati, si raggiunse gradualmente la convinzione che, essendovi una sola molecola di apolipoproteina B (apo-B) per particella LDL (LDL-P), questa fosse un indicatore più rappresentativo della concentrazione delle LDL.

Ciononostante, nella gran parte degli studi di popolazione e di intervento, le LDL sono state misurate in termini di colesterolo. Di conseguenza, da quando le linee guida sono state sviluppate e promulgate, la caratterizzazione dei pazienti e il loro trattamento hanno continuato ad essere basati essenzialmente sul LDL-C. Si è andato sviluppando un acceso dibattito sui relativi vantaggi di misurare le LDL in termini di contenuto in colesterolo o di numero di particelle (ovverosia valutando la misura di apo B) allo scopo di accertare il rischio o monitorare la terapia.

I risultati degli studi prospettici generalmente depongono per la superiorità di apo-B o di LDL-P sul LDL-C per l'accertamento del rischio, confermando così che l'aggiunta della misura di apo-B agli usuali parametri lipidici potrebbe portare a migliorare la gestione del paziente.

Questa posizione è stata espressa in una recente rassegna nella quale un gruppo di esperti ha concluso che il rischio cardiovascolare è più correlato al numero di particelle aterogene circolanti che al contenuto in colesterolo delle lipoproteine [1].

Inoltre, un documento di consenso dell'“American Diabetes Association” e dell'“American College of Cardiology” ha consigliato la misura di apo B con metodi standardizzati nei pazienti con sindrome metabolica, in modo particolare per verificare l'efficacia della terapia [2].

L'apolipoproteina B è una frazione proteica comune a tutti gli aggregati lipoproteici deputati al trasporto di colesterolo e lipidi nel sangue. Nonostante la sua funzione non sia ancora completamente chiarita, sappiamo che essa funge da *ligando* per i recettori delle LDL situati in numerose cellule dell'organismo. In pratica, rappresenta la "chiave" che

una volta inserita nella serratura della rispettiva "finestra" situata sulla superficie esterna della cellula, permette l'ingresso del colesterolo.

La sua rilevanza, sia come componente delle LDLs, che come marker proposto in questo elaborato, è quindi da individuare nel quadro dell'*aterogenesi*.

È evidente che un aumento della concentrazione sierica di apo B è un importante fattore di rischio per malattia coronarica (CHD). Apo-B è una componente di tutte le particelle aterogeniche o potenzialmente aterogeniche, incluse le VLDL, le lipoproteine a densità intermedia (IDL), le LDL e la lipoproteina (a) [Lp(a)], nelle quali ogni particella lipoproteica contiene una singola molecola di apo-B. Apo-B, quindi, fornisce una *misura diretta del numero di lipoproteine aterogeniche in circolo*.

Anche nei pazienti ipertrigliceridemicici, la maggior parte dell'apo-B plasmatica è associata alle LDL, rendendo così questa apolipoproteina un buon surrogato della concentrazione delle LDL-P. L'intrappolamento di particelle di apolipoproteina (apo-B) all'interno della parete arteriosa è il passaggio fondamentale che avvia e guida il processo aterosclerotico dall'inizio alla fine, dalla prima comparsa di striature di grasso fino allo sviluppo finale delle lesioni complesse che sono vulnerabili alle trasformazioni acute, come la rottura della placca e l'erosione endoteliale, precursori di eventi clinici.

La concentrazione di particelle di apo-B all'interno del lume arterioso è correlata al numero di particelle di apo-B che saranno intrappolate nella parete arteriosa. Tuttavia, la percentuale di particelle apo-B che sono intrappolate all'interno della parete arteriosa, rispetto al numero che l'attraversa, è influenzata sia dalla dimensione delle particelle di apo-B (*size*) che dalla struttura dei glicosaminoglicani nello spazio sub-intimale della parete arteriosa.

Poiché il contenuto di colesterolo, e quindi la dimensione delle particelle di apo-B, varia in modo significativo e poiché altri componenti delle particelle di apo-B, come i fosfolipidi e l'apo-B stessa, se ossidati, sono forti fattori pro-aterogenici, né il colesterolo lipoproteico a bassa densità (LDL-C) né il colesterolo lipoproteico non ad alta densità (HDL-C) sono accurati quanto apo-B come marcatori di rischio cardiovascolare [3].

Inoltre, dati recenti indicano che il rischio CAD di lipoproteine a densità molto bassa (VLDL) si avvicina molto a quello di particelle LDL; cioè le VLDL e le LDL hanno un uguale rischio CAD.

Di conseguenza, apo-B *somma* il rischio aterogenico dovuto alle particelle di apo-B VLDL ricche di trigliceridi (TG) e alle particelle di apo-B LDL ricche di colesterolo:

apo-B risk factor: apo-B V-LDL (TG) + apo-B-LDL (C) [3, 4].

Tutte le lipoproteine contenenti apo-B sono particelle sferiche, formate da un monostrato fosfolipidico che ne disegna la circonferenza, intervallato da piccole quantità di colesterolo, e con una *singola* molecola di apo-B48 o apo-B100 a circondare ogni particella [5].

Nello specifico, apo-B rimane adesa alla superficie della particella e la stabilizza per tutta la sua emivita metabolica, mentre il core lipidico può variare ampiamente la sua composizione in trigliceridi ed esteri del colesterolo, anche tramite scambi di lipidi tra particelle diverse, mediati dalle CETPs, CE transfer proteins (proteine che trasferiscono gli esteri del colesterolo) [6, 7, 8].

In **figura 7** sono schematizzate le grandi differenze nei numeri relativi alle diverse particelle di apo-B. In individui con TG normale (TG <133mg/dL), per ogni chilomicrone e/o particella residua di chilomicrone, ci sono circa 10 particelle VLDL.

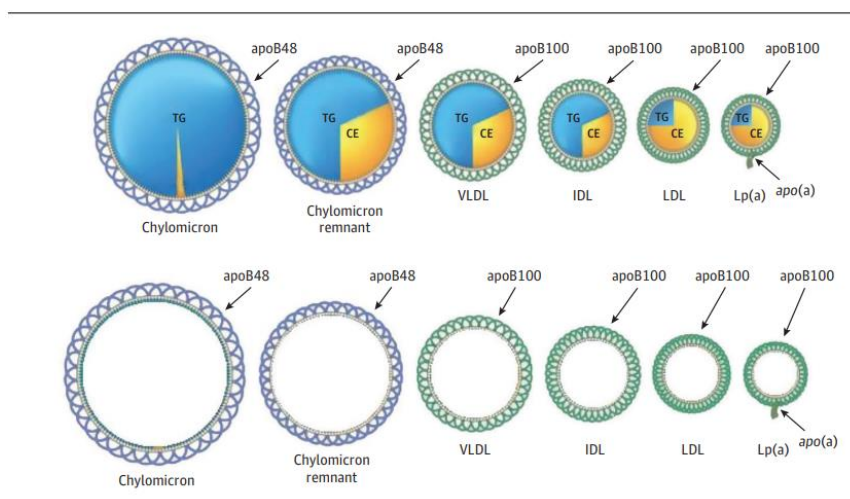


Figura 7

Particelle di apolipoproteina B48 e B100, 1 per ogni particella lipidica. Apo indica apolipoproteina; CE, estere di colesterolo; IDL, densità intermedia lipoproteine; LDL, a bassa densità lipoproteine; Lp(a), lipoproteina(a); TG, trigliceridi; VLDL, lipoproteine a bassissima densità [3]

Ecco perché, in generale, le particelle VLDL sono più importanti per il rischio aterogenico rispetto alle particelle residue di chilomicroni.

Allo stesso modo, poiché le particelle VLDL hanno una breve emivita nel plasma, mentre le particelle LDL hanno un'emivita più lunga, ci sono molte più particelle LDL che particelle VLDL. Pertanto, nei pazienti con livelli di TG normali, per ogni particella VLDL, ci sono circa 9 particelle LDL.

Con un significato clinico ancora più specificamente ripreso nel paragrafo successivo (3.2), proprio poiché una *singola* molecola di apo-B è comune a tutte le lipoproteine, essa va a rappresentare efficacemente il **numero delle lipoproteine** presenti in circolo, indipendentemente dalla massa – di colesterolo o trigliceridi - che esse trasportano, dando un'informazione (il numero delle particelle) più affidabile rispetto alla massa di C e TG trasportati.

Facciamo un esempio: se una molecola di TG viene scambiata da una lipoproteina VLDL a una LDL attraverso il CETP, la particella VLDL si arricchisce di CE.

I livelli di TG nelle LDL crescono e in percentuale diminuisce la quantità di CE.

La successiva idrolisi di TG all'interno delle LDL, probabilmente dovuta a lipasi epatiche, può produrre piccole particelle di LDL (sd-LDL). Nelle dislipidemie con TG > 133 mg/dl, le particelle LDL in media conterranno meno colesterolo, e saranno più piccole della media (size), di conseguenza la misura del colesterolo LDL sottostimerà il numero di particelle LDL, che sarà sicuramente maggiore.

In queste dislipidemie da sindrome metabolica si verificano tre potenziali fenomeni di rischio aterogeno incontrollato (**triade aterogena**): diminuzione del colesterolo HDL, iper-trigliceridemia, aumento di particelle LDL piccole e dense (sd-LDL),

In una recente review pubblicata sulla nota rivista JAMA nel 2019 [3] è stato proposto un modello in cui si descrive apo-B come marker predittivo maggiore del colesterolo-LDL per il rischio cardiovascolare: le particelle LDL (non il solo LDL-C) giocano un ruolo centrale nell'aterogenesi.

Il processo iniziale è la ritenzione sub-endoteliale delle lipoproteine contenenti apo-B.

Le particelle LDL si muovono poi verso l'intima delle arterie attraverso un processo determinato dal gradiente di concentrazione; la velocità di questa diffusione passiva perciò aumenta quando la concentrazione delle LDL circolanti è più elevata.

Una volta all'interno dell'intima, le particelle LDL si legano ai proteoglicani; ha inizio quindi un processo durante il quale le LDL vengono ossidate o modificate, e sono poi catturate dai monociti o dai macrofagi a formare le cellule schiumose.

Le molecole di colesterolo contenute nelle LDL sono i “passeggeri”, ma è la particella nel suo complesso a guidare il processo aterosclerotico.

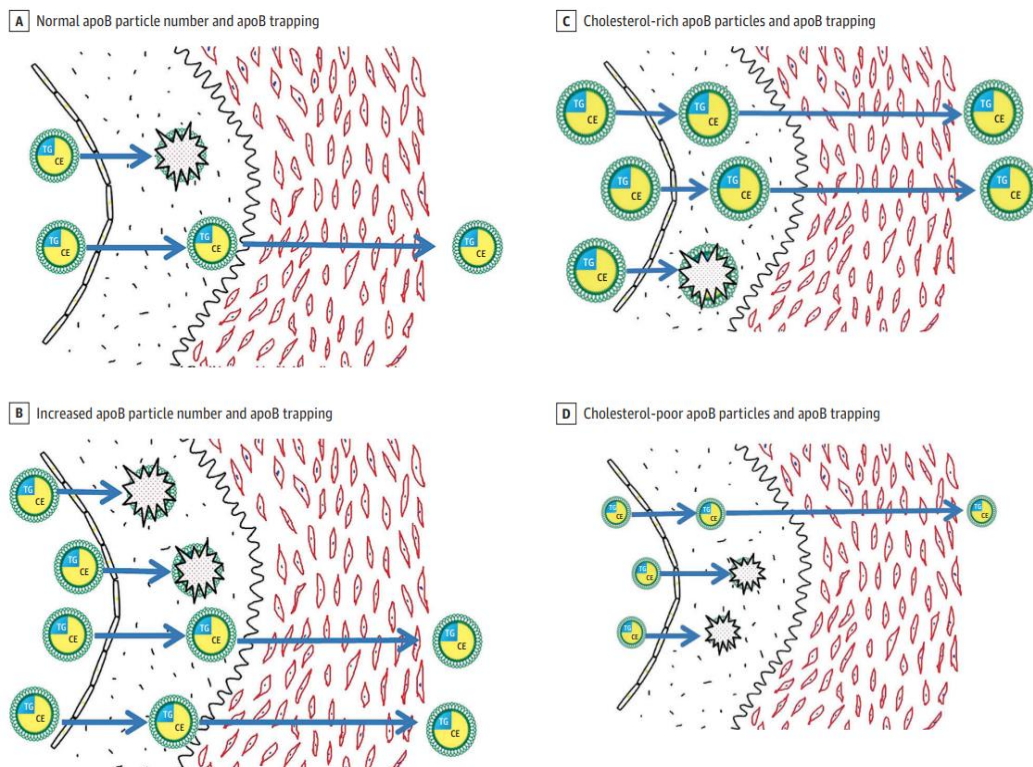


Figura 8

Più particelle di apo-B sono presenti nel lume dell'arteria, più particelle entreranno nella parete arteriosa e, a parità di condizioni (inflammaging ed ossidazione), più particelle saranno intrappolate all'interno della parete. Inoltre, particelle di apo-B più piccole contenenti meno colesterolo (sd-LDL) entreranno più facilmente nella parete arteriosa e si legheranno più avidamente ai glicosaminoglicani all'interno della parete arteriosa rispetto alle particelle di apo-B più grandi contenenti più colesterolo (figura C e D). [3]

Aumentando il numero di particelle intrappolate nella parete arteriosa, aumenterà il numero di contatti con i gruppi glicosaminoglicani e le interazioni aterogene con le

risposte immunitarie correlate all'inflammaging, comunemente chiamate *inflammatory-mediated destruction of the arterial wall*.

Ci sono almeno due eccezioni a questa proposta di ricalcolo di rischio aterogeno proposto dagli autori:

1. Iper-lipoproteinemia di tipo III (iper-colesterolemia, iper-trigliceridemia e apo-B normale): in questo caso verrà rilasciata una elevata quantità di colesterolo nel sito di intrappolamento delle apo-b che si equivarrà come rischio aterogeno al numero maggiore di apo-b intrappolate nei pazienti con iper-trigliceridemia e maggiore numero di sd-LDL
2. Livelli elevati di Lipoproteina a (Lpa), che secondo diverse metanalisi è un fattore di rischio primario cardiovascolare

In una review del 2011 [9] e in uno studio del 2013 [10] è stata poi messa a confronto la predittività di rischio di CVD del calcolo diretto di apo-B rispettivamente con la quantificazione del colesterolo-LDL, e con il calcolo indiretto delle particelle LDL (ottenuto tramite risonanza magnetica nucleare per spettroscopia del siero).

Rispetto alla sola concentrazione di colesterolo-LDL, che non dà indicazioni sulla sua ripartizione, il calcolo di apo-B permette proprio di individuare il numero ed il tipo di particelle presenti in circolo, cioè con la potenzialità di avviare la patogenesi meglio descritta in seguito.

In confronto invece alle particelle LDL totali, la loro efficacia come markers di rischio si è rivelata equiparabile con significatività statistica; entrambe le metodiche, quindi, danno informazioni ugualmente affidabili sul numero di particelle con potenzialità aterogena, ma la tecnica più accessibile e semplice è quella per il calcolo di apo-B, per questo preferibile.

È dimostrato, infatti, che il colesterolo può penetrare la parete arteriosa solo se associato a particelle di apo-B, alle quali – come detto - si associa con masse altamente variabili da particella a particella [6]. Il contenuto di LDL-C non riflette la concentrazione di particelle LDL in quanto durante il metabolismo lipoproteico vengono modificate sia la dimensione delle lipoproteine che la loro composizione lipidica. La quantità relativa di colesterolo e trigliceridi nelle LDL può variare di molto tra individui.

In uno studio di 118 soggetti sani (maschi e femmine), il rapporto tra colesterolo e trigliceridi nelle LDL variava da 1,8 a 11,5. La maggioranza dei soggetti aveva grandi LDL, con un rapporto colesterolo/trigliceridi > 4 . Tuttavia, il 21% dei soggetti aveva LDL con scarso contenuto in colesterolo, che presentavano un rapporto colesterolo/trigliceridi < 4 , dimostrando così che anche una misura accurata di LDL-C può sottostimare la concentrazione delle LDL e presumibilmente anche il rischio di CHD [11].

Anche dati recenti hanno dimostrato che il rischio aterogeno dato da particelle VLDL approssima strettamente quello dato da particelle LDL [4], confermando che il valore di apo-B rappresenta efficacemente sia l'aterogenicità delle VLDL ricche di trigliceridi, sia quella delle LDL ricche di colesterolo, in quanto apo-B48 o apo-B100 si trovano sulla superficie di tutte le lipoproteine a densità bassa o molto bassa. Analizzando più dettagliatamente il processo: è proprio l'intrappolamento di particelle di apo-B nell'endotelio arterioso ad avviare e dirigere il processo aterosclerotico, dalla precoce formazione di strie lipidiche fino allo sviluppo di lesioni complesse e trasformazioni acute, immediati precursori degli eventi clinici [12].

Ed è per questo motivo che apo-B si rivela un marker più completo e descrittivo del rischio aterogeno, in quanto riassume, unifica e semplifica le informazioni date dai più convenzionali markers lipidici attualmente indagati/considerati.

Infatti sia in base al contenuto in colesterolo, sia per via di componenti intrinseche (per esempio i fosfolipidi), se ossidate le particelle di apo-B sono un fattore pro-aterogeno più forte, e più predittivo, del solo colesterolo-LDL o non-HDL [13-15].

I diabetici o i soggetti con sindrome metabolica tendono ad avere un aumentato numero di LDL piccole e dense, ma una concentrazione di LDL-C relativamente normale. Considerato poi che la terapia con gli inibitori dell'enzima 3-idrossi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) reduttasi riduce il colesterolo LDL in misura maggiore che non le LDL, apo B o LDL-P sembrano fornire, rispetto alla misura di LDL-C, una migliore stima del rischio residuo dopo trattamento [11].

3.1.1 Studi prospettici su APO-B in prevenzione primaria e secondaria

Lo studio AMORIS ("Apolipoprotein-related mortality risk study") è tra quelli più significativi [1]. Più di 175.000 soggetti, maschi e femmine con più di 60 anni, sono stati seguiti per circa 5 anni. Un infarto miocardico (MI) fatale ha riguardato 864 maschi e 359 femmine. Anche dopo aggiustamento per età e fattori di rischio lipidici tradizionali, apo-

B rimaneva un significativo indice predittivo di MI con un rischio relativo di 1,33 [intervallo di confidenza (CI): 1,17–1,51] per i maschi e di 1,53 (1,25–1,88) per le femmine a fronte di un aumento pari a 1 DS. Da segnalare che LDL-C si dimostrava un fattore di rischio non significativo per le femmine e solo modestamente associato a MI nei maschi.

Il “Quebec cardiovascular study” ha seguito per 5 anni 2039 maschi con età compresa tra 45 e 76 anni [2]. Apo-B si è dimostrato un fattore di rischio significativo e indipendente per eventi cardiaci futuri anche dopo aggiustamento per età, fumo, pressione arteriosa sistolica, diabete e uso di farmaci.

Come hanno dimostrato gli studi “Quebec cardiovascular study” e AMORIS, negli studi su larga scala nei quali sono stati impiegati metodi precisi e standardizzati per apo-B, il parametro mantiene la significatività statistica anche quando nei modelli di regressione vengono inclusi come co-variate le misure di lipidi e lipoproteine tradizionali.

Questo risulta evidente anche nell’“Health professionals follow-up study” [3]. Quando apo-B e LDL-C erano entrambi inclusi simultaneamente nel modello, il rischio relativo rimaneva fortemente associato con apo-B, mentre LDL-C e non-HDL-C perdevano la significatività statistica.

Tra i molti studi prospettici pubblicati di prevenzione primaria che prendono in considerazione apo-B [4], tutti tranne uno hanno dimostrato un’associazione statisticamente significativa con CHD, anche dopo aggiustamento per i fattori di rischio non lipidici. Tra i 13 studi di prevenzione primaria che hanno fornito dati anche per LDL-C, solo 9 hanno riportato una correlazione significativa tra LDL-C e CHD sia nei maschi che nelle femmine. Gli studi che hanno preso in considerazione sia apo-B che LDL-C hanno tutti dimostrato che apo-B era il fattore di rischio principale.

3.2 Small dense-LDL (sd-LDL)

Le *lipoproteine a bassa densità (LDL)* sono particelle proteiche circolanti, addette al trasporto dei lipidi in tutto l’organismo.

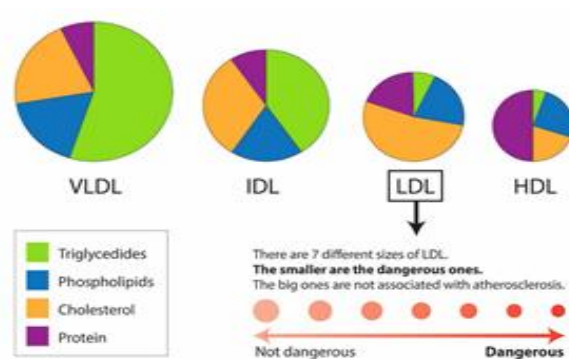


Figura 9

Schematizzazione della composizione in lipidi delle lipoproteine di trasporto a bassa densità

Ciascuna particella (come descritto in precedenza) è composta da una diversa combinazione di proteine, colesterolo, trigliceridi e molecole fosfolipidiche, perciò hanno dimensioni, densità e composizioni chimiche eterogenee, il che permette una classificazione in due fenotipi distinti: un *fenotipo A* associato a LDLs più grandi e a densità inferiore, ed un *fenotipo B* con una predominanza di particelle *piccole e dense* (*small dense LDLs, sd-LDL*) [1, 2].

Concentrazioni elevate di LDLs piccole e dense (sd-LDLs) si correlano positivamente con il rischio di *coronaropatie* (*Coronary Artery Disease, CAD*): la loro elevata aterogenicità è dovuta alla maggiore capacità di penetrare nella parete arteriosa, e inoltre hanno una minore affinità di legame per il recettore LDL, il che ne comporta un'emivita prolungata in circolo, con conseguente maggior esposizione allo stress ossidativo (sono perciò le particelle LDL più facilmente ossidabili) [1 - 5].

Secondo il National Cholesterol Education Program (NCEP), solo la metà della percentuale del rischio di malattia coronarica può essere attribuita ai fattori di rischio “convenzionali” (cioè LDL, HDL e trigliceridi), ma fattori di rischio più specifici aumentano il potere predittivo di malattie cardiovascolari, e individuano soggetti a rischio che altrimenti potrebbero non essere inclusi.

Le *LDLs piccole e dense* costituiscono uno di questi indicatori più specifici di rischio, e possono essere indipendenti dagli altri fattori di rischio convenzionalmente considerati ad oggi e da cinquant'anni [4].

La *Sindrome Metabolica* (detta anche *sindrome da insulino-resistenza*, anche questa meglio analizzata più avanti) è una combinazione pericolosa di alcuni fattori di rischio

cardiovascolare che, correlati tra loro, possono dare forma ad un quadro clinico più facilmente esposto al rischio di infarto o ictus. Diversi studi clinici, hanno evidenziato la forte correlazione tra l'elevato numero di sd-LDLs e markers che caratterizzano il “fenotipo lipoproteico pro-aterogeno” (Trigliceridi e Apo-B elevati, bassi livelli di colesterolo-HDL), che spesso coesistono senza comportare evidenti aumenti del colesterolo-LDL [1].

L'apolipoproteina B (apo-B) è una componente di tutte le particelle aterogene o potenzialmente aterogene, incluse le VLDLs, le lipoproteine a densità intermedia (IDLs), le LDLs e la lipoproteina (a) [Lp(a)], nelle quali ogni particella lipoproteica contiene una singola molecola di apo-B, il cui calcolo restituisce quindi una misura diretta del numero di lipoproteine aterogene in circolo. Anche nei soggetti che presentano ipertrigliceridemia, la maggior parte dell'apo-B plasmatica è associata alle LDLs, il che rende questa apolipoproteina un buon indicatore del *numero* di particelle LDL (LDL-P), piuttosto che della loro *concentrazione* (LDL-C) [6]. E tale distinzione si rivela di fondamentale importanza, perché a parità di concentrazione di LDLs (anche a valori accettabilmente bassi), il numero ed il tipo di proteine può variare significativamente, con particolare criticità laddove il numero di particelle piccole e dense – facilmente ossidabili – sia più elevato, preludio di un'aumentata reattività che può sfociare in aterogenesi.

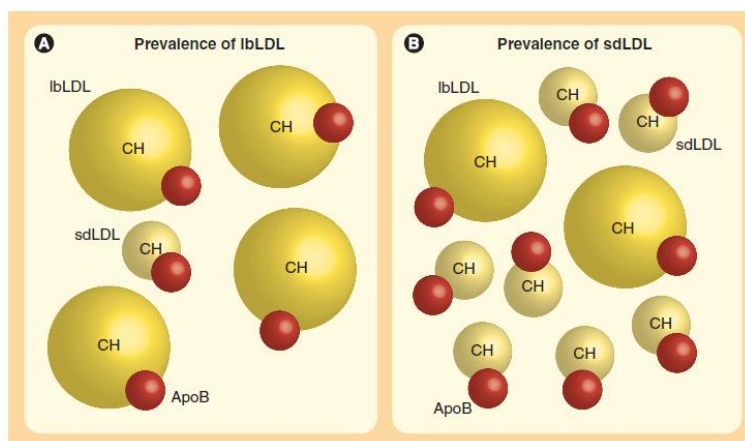


Figura 10

Il colesterolo LDL sottostima maggiormente il numero di particelle LDL nei soggetti con una prevalenza di LDL piccole e dense, povere di colesterolo.

La concentrazione di LDL-C è uguale sia in (A) che in (B). Tuttavia, poiché tutte le particelle LDL contengono una sola molecola di apoB, la concentrazione di apoB è molto più elevata in caso di prevalenza di colesterolo associato alle sd-LDL (B) rispetto al caso di prevalenza di lb-LDL ricche di colesterolo (A).

CH: contenuto di colesterolo delle particelle LDL; lb-LDL: grande LDL galleggiante; sd-LDL: LDL piccole e dense [7]

In **figura 10** sono schematizzati un fenotipo A non aterogeno e un fenotipo B aterogeno, entrambi con la stessa concentrazione di colesterolo-LDL, ma con valori di apo-B differenti (marcatamente più alti nel fenotipo B), per la diversa distribuzione di LDL [7]. Nel 2013, l'Associazione Americana di Chimica Clinica (AACC), ha redatto un documento dove si pongono a confronto - come indicatori di aterogenesi - i classici marcatori lipidici (per esempio il colesterolo-LDL), con l'apolipoproteina B (apo-B) e le particelle sd-LDL; dal paragone, è emerso che il valore di quest'ultime è più specificamente predittivo del rischio cardiovascolare [8].

Si ipotizza, infatti - come precedentemente descritto - un ruolo di rilievo delle sd-LDL nella patogenesi dell'aterosclerosi [7], coinvolte nella trasformazione dei macrofagi in cellule schiumose, nelle lesioni aterosclerotiche.

Questa ipotesi, sempre più accreditata dalle ultime review internazionali [8 - 10], dà una nuova e importante rilevanza alla determinazione delle sd-LDLs, per la loro suscettibilità molto più alta alla modificazione ossidativa da parte dei ROS. Vi è infatti una marcata correlazione tra l'aumento delle sd-LDLs e l'aumento delle LDL-ossidate.

3.2.1 Limiti di riferimento delle sd-LDL

È stato svolto uno studio relativo all'intervallo di riferimento in conformità al protocollo EP28-A3c del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).

I soggetti idonei, arruolati in due regioni degli USA, hanno acconsentito a sottoporsi ad un unico prelievo di sangue dopo un digiuno notturno. I partecipanti sono stati suddivisi per età e genere sulla base di 4 parametri: (1) uomini di 21-44 anni, (2) uomini di 45-75 anni, (3) donne di 21-54 anni (in presunta pre-menopausa/peri-menopausa) e (4) donne di 55-75 anni (in presunta post-menopausa).

Per le popolazioni di riferimento, i criteri di inclusione erano la capacità deambulatoria e lo stato di presunta buona salute, e valori di:

- a. HDL-C \geq 1.035 mmol/L (40 mg/dL)
- b. LDL-C $<$ 4.139 mmol/L (160 mg/dL)
- c. Trigliceridi $<$ 2.258 mmol/L (200 mg/dL)
- d. Glicemia a digiuno $<$ 6.993 mmol/L (126 mg/dL).

Le differenze di età associate al livello di sd-LDL-C sono parse significative in entrambi i sessi ($p = 0.0030$ negli uomini e $p < 0.0001$ nelle donne).

Non sono state osservate differenze significative invece tra uomini e donne per quanto riguarda il livello di sd-LDL-C ($p = 0.7564$).

I valori normali sono stati fissati tra il 2.5° percentile e il 97.5° percentile, secondo le linee guida del CLSI, come illustrato in **figura 11** (dati interni alla metodica ROCHE).

Gruppo	Partecipanti allo studio	Intervalli di riferimento
Gruppo più giovane	Uomini di 21-44 anni e donne di 21-54 anni (n = 240)	0.329-1.249 mmol/L 12.7-48.3 mg/dL
Gruppo meno giovane	Uomini di 45-75 anni e donne di 55-75 anni (n = 202)	0.326-1.337 mmol/L 12.6-51.7 mg/dL

Figura 11

Valori di riferimento relativi allo studio multietnico dell'aterosclerosi (MESA, Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis [1])

In base all'Adult Treatment Panel (ATP) del National Cholesterol Education Program (NCEP), generalmente il 75° valore percentile per il colesterolo LDL è associato ad un rischio elevato di CAD.

Sulla base di questo principio, è stato selezionato il 75° percentile nei soggetti normolipidemicici e dislipidemicici che non mostravano segni di CAD o di diabete mellito al basale (n = 3938). Con riferimento alla popolazione MESA, l'analisi indicava un colesterolo sd-LDL-C di 1.252 mmol/L (48.4 mg/dL), arrotondato a 1.293 mmol/L (50.0 mg/dL) come valore di cutoff.

Per ulteriori informazioni sullo studio MESA, si consiglia di visitare il sito web www.mesa-nhlbi.org [1].

L'ultima Review uscita nel 2022 rafforza ancora di più la determinazione della sottoclasse LDL che migliora sia la previsione del rischio di malattia coronarica sia la guida al trattamento appropriato [2].

Nello studio ARIC (Atherosclerosis Risk in Communities) è stato individuato un cut-off di sd-LDL > 50 mg/dl (1,29 mmol/L) sopra il quale è aumentato il rischio CAD, si veda la **figura 12**.

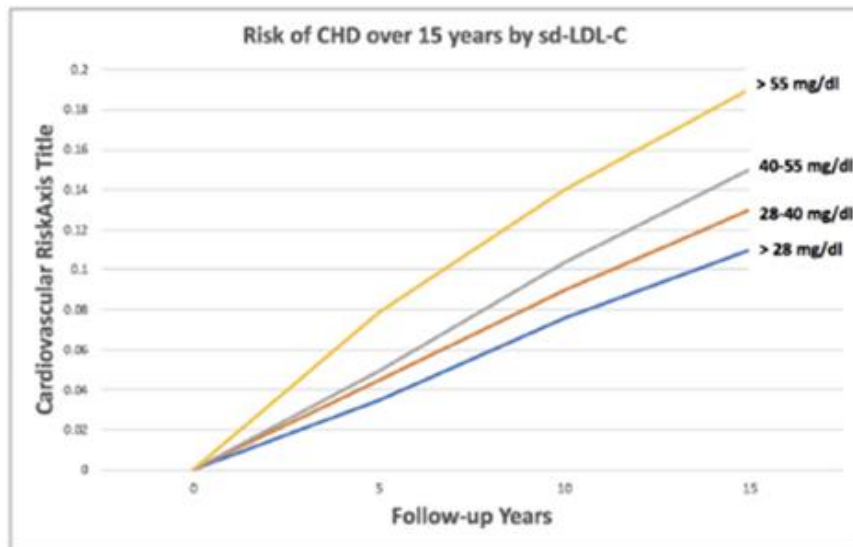


Figura 12

Incidenza cumulativa di eventi cardiovascolari nei sottogruppi con LDL-C < 100 mg/dL (< 25° percentile) e/o sdLDL-C < 27,8 mg/dL (< 25° percentile), da modelli di rischio proporzionale aggiustati per età, sesso, e razza. [3]

Inoltre, nello studio ARIC un aumento di sd-LDL-C ha predetto eventi CHD anche nel gruppo con LDL-C < 100 mg/dL, che inizialmente era ritenuto a basso rischio di malattia coronarica.

L'importante studio MESA [1] ha dato risultati analoghi, con un aumento significativo di eventi CHD con valori di sd-LDL superiori a 46 mg/dL.

In un altro studio condotto in Giappone poi [4], valori di LDL-C sopra la mediana di 100 mg/dL non supporta un aumento di rischio CHD, mentre valori di sd-LDL sopra la mediana di 35 mg/dL supporta un significativo aumento di eventi CHD nei pazienti con malattia coronarica stabile.

In definitiva, dai risultati delle recentissime review, oggi si hanno a disposizione opportuni strumenti diagnostici e limiti di riferimento appropriati per meglio prevenire un rischio coronarico. La domanda su cui si basa il lavoro sperimentale è: quando utilizzare questi nuovi markers predittivi?

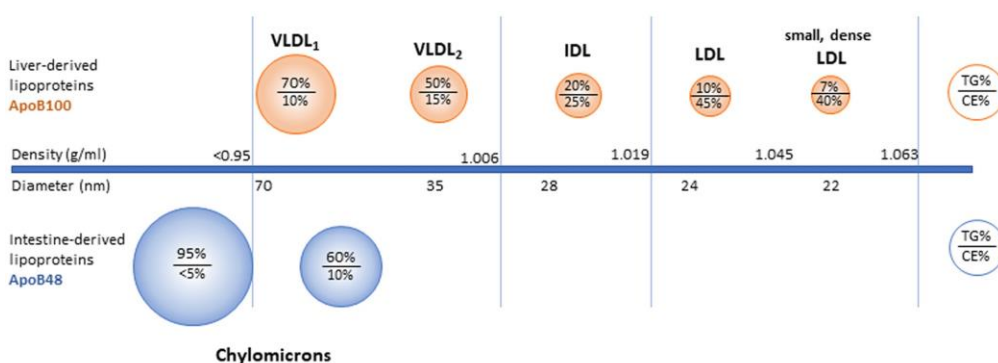
3.3 Ruolo pro-aterogeno delle Lipoproteine Remnants

Un marker aterogeno emergente di rischio cardiovascolare è quello delle **Lipoproteine Remnants**: durante la lipolisi, la rimozione dei trigliceridi dalla superficie periferica di

chilomicroni e VLDL porta ad un aumento di particelle di piccole dimensioni (*chilomicroni remnants* o *TRL remnants*) con un ruolo *pro-aterogeno* e ricche di *colesterolo*.

I trigliceridi (TG) sono un mezzo efficiente per immagazzinare l'energia in eccesso, principalmente nel tessuto adiposo. Nel sangue, i TG e gli esteri di colesterolo (CE) circolano all'interno del nucleo di lipoproteine (TRL) sferiche, ricoperte da un "guscio" monostrato di fosfolipidi e colesterolo libero, con le apolipoproteine che hanno la funzione di stabilizzarne la struttura. L'apolipoproteina (apo-B) è la principale proteina strutturale della TRL.

Size and density profile of major apolipoprotein B-containing lipoprotein classes



Size and density profile of apoB48- and apoB100-containing remnant lipoproteins

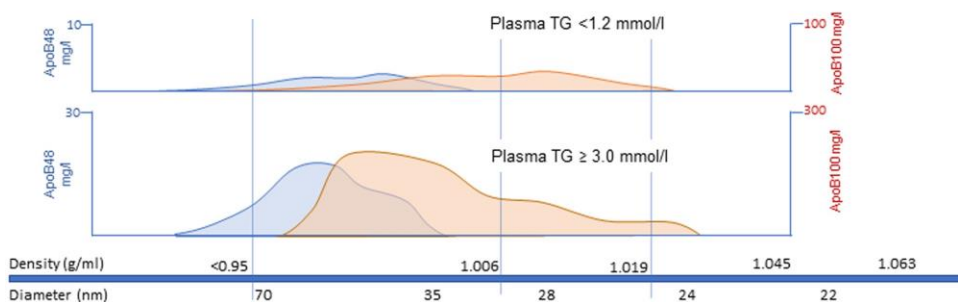


Figura 13

In alto: rappresentazione delle dimensioni e la densità delle principali classi di apolipoproteine contenenti lipoproteina B.

In basso: rappresentazione delle dimensioni e la densità di lipoproteine rimanenti contenenti apoB48 e apoB100 [1]

Le lipoproteine a bassissima densità (VLDL), prodotte nel fegato, contengono una apoB100 e vengono metabolizzate in residui di VLDL (VLDL-remnants), lipoproteine a densità intermedia (IDL) e LDL. I chilomicroni invece sono prodotti nell'intestino, contengono una apoB48 e vengono metabolizzati a chilomicroni remnants, ma non anche a IDL e LDL.

Durante la lipolisi le TRL diminuiscono in size: il contenuto di TG nel core idrofobico diminuisce e aumenta in percentuale il colesterolo esterificato (CE).

Parallelamente, apo-B rimane all'interno delle TRL e con buona approssimazione possiamo indicare come per ogni TRL vi è una APO-B associata: per questo motivo, come precedentemente esposto, apo-B è correlata al *numero di particelle TRL*.

Andiamo a descrivere le *caratteristiche chimico-fisiche* delle particelle remnants schematizzate in *figura 14*.

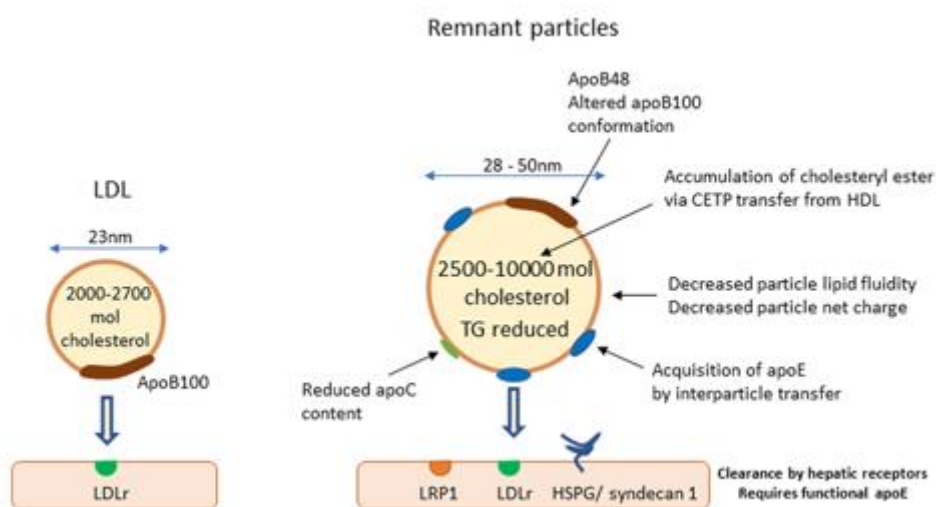


Figura 14
Caratteristiche chimico-fisiche delle particelle remnants. [1]

Le VLDL-remnants sono prodotte durante la lipolisi dalla *lipoproteina lipasi*: la rimozione di molecole di TG arricchisce in percentuale la TRL sia di colesterolo libero che esterificato. La clearance di queste particelle avviene nel fegato o attraverso la normale conversione a IDL e LDL.

Nei livelli ottimali di TG (< 1.2mmol/L o < 100 mg/dL), una efficiente lipolisi comporta un limitato accumulo di particelle remnants.

A livelli elevati di TG (e.g. > 3.0 mmol/L o > 260mg/dL) c'è una lipolisi inefficiente con accumulo di chilomicroni e VLDL-remnants.

Livelli plasmatici di TG molto elevati (> 10mmol/L o > 880mg/dL) aumentano il rischio di pancreatite acuta, ma è da considerare anche il fatto che livelli a digiuno a partire da 1,2mmol/L (100 mg/dL) possono essere associati ad un insieme di anomalie metaboliche

che includono l'accumulo di TRL e residui, nonché un aumento degli eventi di malattia cardiovascolare. Queste particelle lipoproteiche aterogene diventano più abbondanti man mano che le concentrazioni di TG aumentano da "borderline" a "moderate", "gravi" ed "estreme":

Così come per l'LDL-C, è inappropriato utilizzare le classiche soglie percentuali (5°, 95° percentile) per definire "normali" e "anormali" i livelli di TG plasmatici.

Category	Triglyceride level mmol/L (mg/dL)
Optimal	<1.2 (<~100)
Borderline	1.2-1.7 (100-150)
Moderately elevated	1.7-5.7 (150-500)
Severe	5.7-10.0 (500-880)
Extreme	>10 (>880)

Figura 15

I cut-point qui indicati sono derivati da precedenti linee guida, da indagini epidemiologiche e da studi sul metabolismo dei TG.

La divisione tra "ottimale" e "borderline" si basa sulle raccomandazioni delle linee guida precedenti e sui risultati di studi di popolazioni in cui vengono valutati i livelli di TG plasmatici con gli aumenti contemporanei di TRL-remnants e sd-LDL.

Questi cut-point sono arbitrari, ma secondo il Gruppo di Consenso possono servire come definizione di lavoro di utilità clinica. Non c'è distinzione per sesso. [1]

In una recente Review del 2021 [1] gli autori hanno proposto due modelli predittivi di rischio cardiovascolare (si veda la **figura 16**).

In una efficiente lipolisi (**pannello in verde**), quindi in condizioni di:

- i) livelli di Tg ottimali
- ii) assenza di insulino resistenza
- iii) normale produzione di VLDL,

si avrà una rapida conversione a normal size LDL con una bassa produzione di TLR remnant, che in parte vengono lavate attraverso la clearance epatica, e in parte convertite ad IDL e successivamente a LDL normal size.

In condizioni invece di insulino-resistenza o pre-diabete, con elevati livelli di Tg (moderato-severo-elevato) avremo una cattiva lipolisi ed over produzione di VLDL dalla sintesi epatica.

Questa inefficiente lipolisi incrementa l'emivita in circolo delle TRL-remnant, che subiscono un rimodellamento del loro core idrofobico, così da avere una *particella che non è più suscettibile a lipolisi e clearance epatica*: avremo un **“end-product remnant”** ad aumentata aterogenicità.

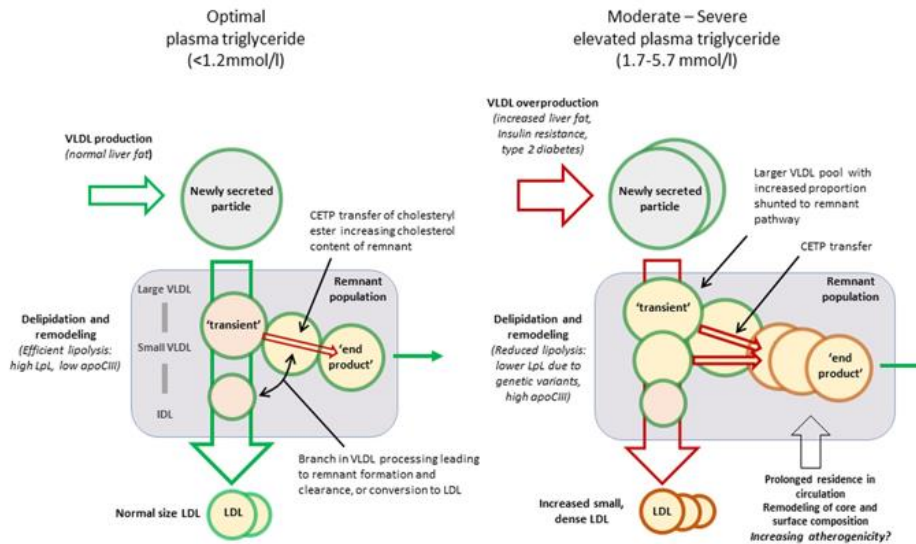


Figura 16

A sinistra (in verde): schematizzazione dei processi di un'efficiente lipolisi.

A destra (in rosso): rappresentazione dei processi in caso di dismetabolismo - per esempio in condizioni di insulino-resistenza o pre-diabete. [1]

A causa delle loro dimensioni ridotte (size < 70 nm), chilomicroni remnants, VLDL-remnants e IDL possono entrare nella parete arteriosa mediante transitosi con conseguente accumulo di particelle nello spazio sub-endoteliale.

Questi *TRL-remnants end products* possono aderire alla matrice extracellulare (specificamente ai proteoglicani): un'interazione potenziata dalla presenza di due apolipoproteine, apo-CIII e apo-E, sulla superficie delle particelle (rimodellamento del core idrofobico).

La degradazione *in situ* di TRL-remnants end products rilascia *lipidi bioattivi* che causano disfunzioni endoteliali ed infiammaging: si avvia il reclutamento di macrofagi-monociti per eliminare le componenti lipidiche depositate con formazione di placche schiumose aterogene e comparsa di lesioni endoteliali. Con ripetuti cicli di ingresso di TRL-remnants e migrazione di macrofagi si genera quindi una placca lipidica (*fatty streaks*) instabile. L'erosione o la rottura meccanica della placca possono portare alla formazione di trombi e potenzialmente all'occlusione del lume con un conseguente evento clinico.

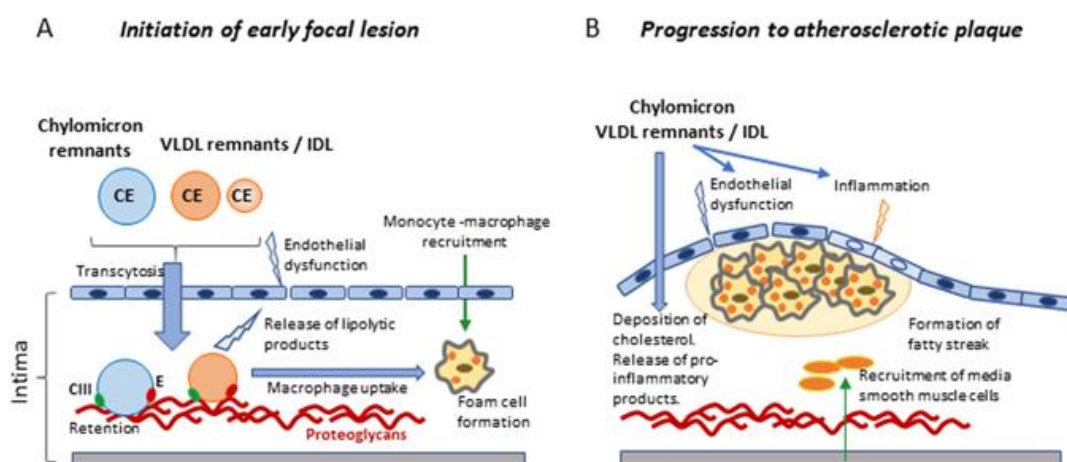


Figura 17

A: schematizzazione della formazione di una lesione focale precoce.
B: progressione della formazione della placca aterosclerotica [1]

Questo *modello aterogeno integrato* proposto recentemente può essere predetto attraverso la **misura diretta delle sd-LDL**: abbiamo visto come la variazione nel metabolismo delle VLDL impatti nella struttura, composizione, e funzione delle LDL.

L'ipertrigliceridemia favorisce la formazione di sd-LDL dando origine ad un lipidoma e proteoma altamente perturbato con un aumento netto del rischio cardiovascolare.

3.4 LDL ossidate (ox-LDL)

Le LDL ossidate (Oxidized LDL, o ox-LDL) costituiscono la frazione di lipoproteine a bassa densità che ha subito modificazioni ossidative. Tali modificazioni sono da intendere come danni cellulari, provocati dai ROS (radicali prodotti dall'ossigeno) e altre specie reattive.

La formazione di questi radicali liberi è in realtà fisiologica, in conseguenza al normale metabolismo energetico; tuttavia una produzione eccessiva (il cosiddetto *stress*

ossidativo) ne comporta un accumulo, che sovraccarica i sistemi predisposti alla loro eliminazione, provocandone un'incontrollata presenza in circolo. Sarà proprio questa condizione a permettere a tali radicali di entrare in contatto con altri distretti cellulari, provocando l'ossidazione – ossia la perdita di elettroni – dei substrati più suscettibili (cioè più facilmente ossidabili).

Le LDLs piccole e dense sono la porzione delle LDLs non solo più soggetta al danno ossidativo, ma che più efficacemente resta in circolo: per via delle dimensioni ridotte, infatti, si ossidano ma non arrivano ad attivare i recettori scavenger di molecole circolanti, che le eliminerebbero [1, 2].

Rispetto alle LDL non ossidate, di cui si è precedentemente nominato il ruolo nelle risposte immunitarie ai microrganismi, le LDL ossidate rappresentano invece un *substrato dannoso* per l'organismo. È infatti sempre più chiaro il loro ruolo nella *patogenesi dell'aterosclerosi* [3, 4], in quanto il processo aterosclerotico risulta avviato e poi alimentato proprio dalle ox-LDL.

Come anticipato nel *paragrafo 2*, si sta affermando un *modello di aterogenesi* (quindi di formazione della placca ateromatosa) articolato come segue:

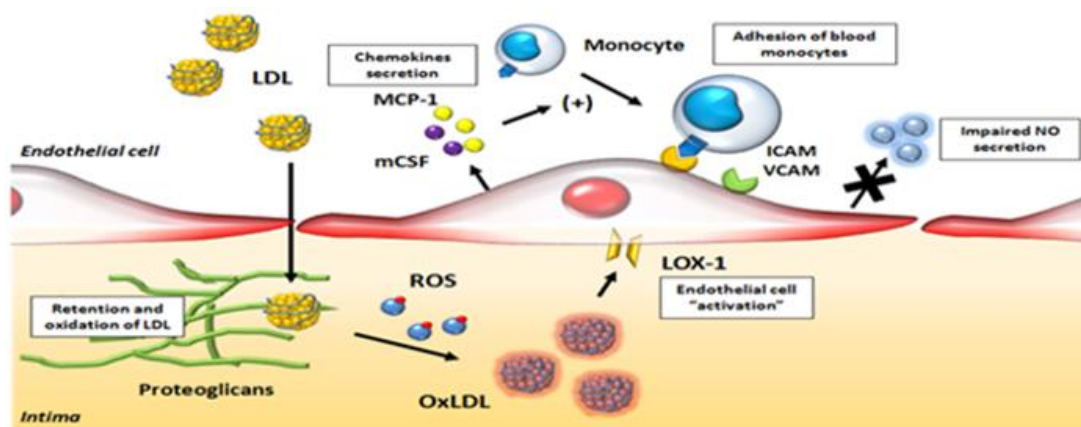


Figura 18

Ruolo delle LDL ossidate nella disfunzione endoteliale [3]

- 1) **Figura 18:** L'evento precoce è la formazione della cosiddetta **disfunzione endoteliale**, ossia una condizione patologica per cui risultano danneggiati i sistemi di regolazione anti-infiammatori, anti-coagulanti e vascolari. È considerato proprio l'evento di avvio a tutto il processo, e le ox-LDL contribuiscono già fin da questo stadio: le ox-LDL formate e trattenute nello spazio sub-endoteliale, infatti, vanno ad

agire sulle cellule endoteliali in modo quasi analogo alle citochine (molecole pro-infiammatorie), inducendo l'espressione di molecole di adesione sia intercellulari che vascolari, che comporteranno il rolling e l'adesione di monociti e cellule T dal sangue [5].

Inoltre, sempre le ox-LDL, inducono la produzione di chemochine sia da parte delle cellule endoteliali che dalle muscolari lisce; le chemochine guidano poi la migrazione dei leucociti nella tonaca intima, con reclutamento di monociti nella parete endoteliale [6-8]. Contenendo liso-fosfatidilcolina, tra l'altro, le stesse ox-LDL risultano chemotattiche sia per i monociti e i linfociti T, sia per i macrofagi [9].

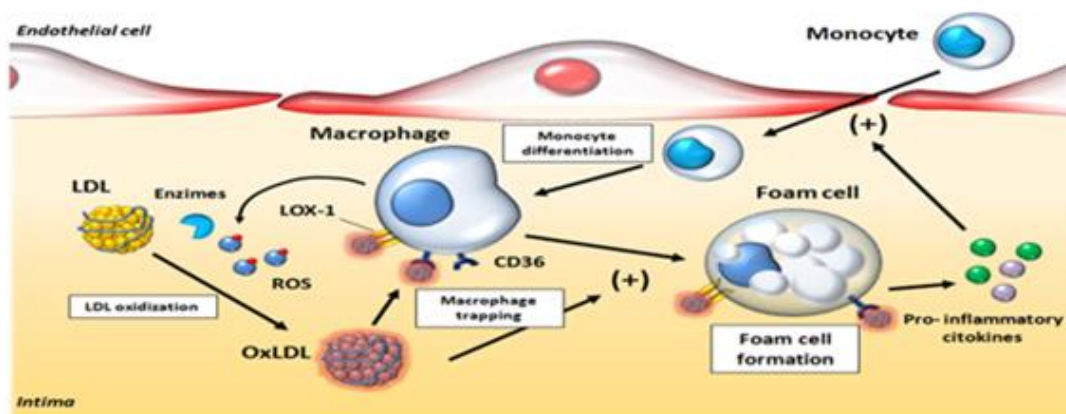


Figura 19

Ruolo delle LDL ossidate nella formazione di cellule schiumose [3]

- 2) **Figura 19:** Secondo evento del processo è la **formazione delle cellule schiumose**. Una volta all'interno della matrice extracellulare sub-endoteliale, infatti, i monociti si differenziano in macrofagi che esprimono recettori specifici (scavenger receptors, CD36, LOX-1 e toll-like receptors). L'espressione di queste molecole di superficie avviene in maniera estremamente lenta in caso di internalizzazione di LDL native, ossia non ossidate, quindi non conduce alla formazione di cellule schiumose, e anzi si assiste a una down-regolazione dell'espressione di recettori per LDL. Viceversa, i recettori scavenger hanno un'altissima affinità per le ox-LDL, quindi non vanno incontro a down-regolazione e comportano un accumulo massivo intracellulare di lipidi [10] che provoca la formazione di cellule schiumose [11, 12].

La differenziazione in macrofagi ingenera un “circolo vizioso” detto *macrophage trapping*, che con meccanismi pro-infiammatori provoca la ritenzione nella cellula, l’ossidazione di nuove LDLs e il reclutamento di altri monociti [13].

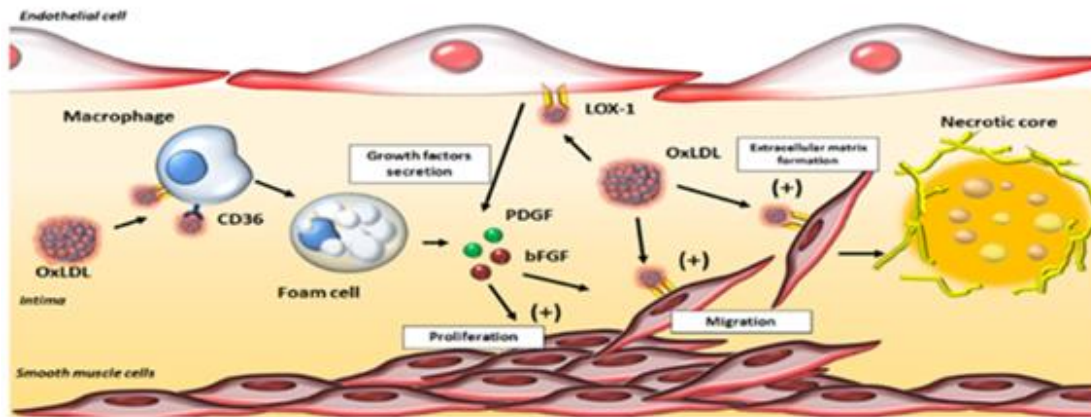


Figura 20

Ruolo delle LDL ossidate nella proliferazione e migrazione delle cellule muscolari lisce [3]

- 3) **Figura 20:** Avviene poi un’anomala **migrazione e proliferazione focale di cellule muscolari lisce** nella tonaca intima; questo stadio rappresenta proprio un hallmark del fenomeno ateromatoso.

Le cellule muscolari lisce migrano dalla tonaca media allo spazio sub-endoteliale, e lì proliferano in risposta a fattori di crescita - platelet-derived growth factors (PDGF) e basic fibroblast growth factors (bFGF) -, la cui espressione e secrezione (nei macrofagi e nelle cellule endoteliali) è stimolata dalle ox-LDL [14, 15].

Si è osservato inoltre che le ox-LDL inducono direttamente cambiamenti fenotipici nelle cellule muscolari lisce, con produzione aumentata di matrice extracellulare [16], quindi di collagene ed elastina interstiziali, che vanno a formare un vero e proprio *tappo fibroso* a copertura della placca aterosclerotica in formazione, formando un “core necrotico” che contiene cellule schiumose, detriti cellulari, lipidi extracellulari ed enzimi lisosomiali [17]. Tutto questo contribuisce ovviamente all’espansione della lesione aterosclerotica.

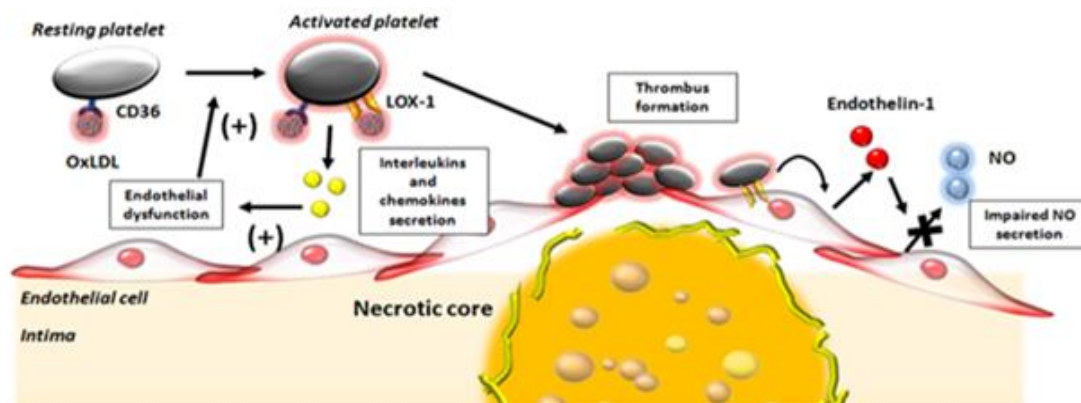


Figura 21

Ruolo delle LDL ossidate nella funzione pro-aterosclerotica delle piastrine [3]

4) **Figura 21:** Infine, *giungono in sede le piastrine*, con un ruolo rilevante nello sviluppo della placca, e ancora di più in seguito alla sua rottura, in quanto promuovono la formazione di trombi.

Anche a questo livello, sono coinvolte le ox-LDL: queste infatti inibiscono la produzione di ossido nitrico nelle cellule endoteliali, comportando un'aumentata secrezione di prostaglandine, e quindi l'aggregazione piastrinica [17].

Inoltre anche le piastrine, come i macrofagi, esprimono CD36, e l'interazione delle ox-LDL con questo recettore provoca l'attivazione delle piastrine [18].

Infine, le piastrine che interagiscono con le ox-LDL rilasciano chemochine che favoriscono lo sviluppo aterosclerotico [19] e promuovono la disfunzione endoteliale e la formazione di cellule schiumose, ossia gli stadi precedentemente descritti dell'aterogenesi [20, 21].

La pericolosità delle ox-LDL, comunque, non si limita al già preoccupante ruolo nel processo aterosclerotico, ma è da individuarsi anche in relazione alla *sindrome metabolica*.

La sindrome metabolica è una condizione patologica che provoca negli individui che ne sono affetti un aumentato rischio di sviluppare diabete di tipo II, patologie coronariche (CHD) e mortalità collegata a quest'ultime [22, 23]. L'incidenza della sindrome metabolica è correlata all'età, con un aumento del 6,7% in età compresa tra 20 e 29 anni, del 43,5% in individui tra i 60 e i 69 anni, e infine del 42,0% in soggetti di 70 anni e oltre.

Un importante studio del 2008 [24] ha dimostrato come ci sia una correlazione molto stretta tra i livelli di ox-LDL circolanti e l'incidenza (5 anni dopo la rilevazione) della sindrome metabolica.

Dalle osservazioni, è risultato che la sindrome sia *correlata specificamente alle LDLs ossidate, e non alle totali*. In seguito a rilevazione con saggi immunoenzimatici, infatti, alte concentrazioni di ox-LDL circolanti sono risultate associate a uno stato di elevato rischio di CHD [25], anche dopo aggiustamento dei valori per il colesterolo-LDL.

Per lo studio CARDIA (Coronary Artery Risk Development in Young Adults) [24] si sono raccolti partecipanti tra il 1985 e il 1986, in aree metropolitane degli Stati Uniti, che sono stati ri-esaminati anche dopo 2, 5, 7, 10, 15 e 20 anni dalla prima rilevazione.

Dopo 15 anni, in 2823 partecipanti si sono rilevate ox-LDL, e da questi sono stati esclusi soggetti in gravidanza, che non svolgessero attività fisica di almeno 8 ore settimanali o con dati mancanti.

Si è preso poi come riferimento il report ATP III [26] (Third Report of the National Cholesterol Education Program Expert Panel on Detection) per stabilire i *parametri* da considerare per confermare o meno lo sviluppo della sindrome metabolica:

- i) elevata circonferenza vita
- ii) alti trigliceridi
- iii) basso colesterolo-HDL
- iv) ipertensione
- v) iperglicemia

Si considerano affette dalla sindrome persone con *almeno 3* di queste caratteristiche.

Al follow-up del quindicesimo anno, a 372 partecipanti è stata diagnosticata la sindrome metabolica, e sono stati perciò esclusi dall'analisi. Al ventesimo anno invece le diagnosi positive sono state del 12,9%.

Tra i 1889 partecipanti selezionati infine per l'analisi longitudinale, le ox-LDL sono risultate associate positivamente con il sesso maschile, la razza nera, un BMI rientrante nell'obesità e la proteina C reattiva (vedi Tabella 1). Altro risultato interessante è stato il coefficiente di correlazione dello 0,6 tra ox-LDL e LDL totali, e invece una correlazione inversa tra ox-LDL e HDL-C e adiponectina.

Andando nello specifico dell'analisi statistica dei dati raccolti, le ox-LDL sono risultate associate all'incidenza della sindrome metabolica con OR (odds ratio) di 3,5 nel quintile più alto di ox-LDL, in confronto al quintile più basso, e in un modello aggiustato che include età, sesso, razza, centro di studi, fumo di sigarette, BMI, attività fisica e LDL-C.

La correlazione resta significativa aggiustando per gli altri parametri, ma si perde del tutto se si aggiusta per le ox-LDL. Quindi, si è osservato che concentrazioni più alte di ox-LDL circolanti sono specificamente correlate – e con significatività statistica - ai 3 fattori di rischio principali e caratteristici della sindrome metabolica: l'obesità addominale, l'ipertrigliceridemia e l'iperglicemia. Tutt'ora comunque resta ignoto se le LDL ossidate siano un marker collegato a fattori meccanici sottostanti (mechanistic underlying factors) che già conducono allo sviluppo della sindrome metabolica, o se siano esse stesse intermedi funzionali del pathway.

	Quintiles of Oxidized LDL (U/L)					P Value for Trend ^a
	1 (<55.4)	2 (55.4-69.1)	3 (69.2-81.2)	4 (81.3-97.3)	5 (≥97.4)	
Participants, No.	377	378	373	386	375	
Age, y	40.1	40.2	40.2	40.2	40.4	.45
Men, %	34.8	38.3	40.5	51.5	56.5	<.001
African American, %	33.8	36.2	43.5	42.2	47.8	<.001
BMI						
Mean	25.8	26.4	27.7	27.9	28.7	<.001
>30, %	15.4	17.9	27.4	25.7	32.9	<.001
Current smoker, %	17.5	18.1	20.4	14.7	18.3	.77
Cholesterol, mean, mg/dL						
LDL	87.1	102.1	109.9	122.3	141.4	<.001
HDL	57.4	54.0	53.6	50.9	48.6	<.001
Triglyceride, mean, mg/dL	67.9	77.1	83.8	91.2	116.3	<.001
Glucose, mean, mg/dL	81.9	83.1	83.0	84.1	84.9	<.001
Insulin, mean, μU/mL	10.3	11.4	12.0	12.3	14.1	<.001
Blood pressure, mean, mm Hg						
Systolic	108.9	109.7	111.3	110.3	112.1	<.001
Diastolic	70.7	72.6	73.5	72.8	73.7	.001
Waist circumference, mean, cm	81.9	84.0	86.4	86.8	90.1	<.001
C-reactive protein, mean, mg/L	1.6	1.7	1.9	1.7	2.0	.04
Adiponectin, mean, mg/L	13.1	12.1	11.6	11.0	10.2	<.001

	Quintiles of LDL Cholesterol (mg/dL)					P Value for Trend ^a
	1 (<86)	2 (86-101)	3 (102-118)	4 (119-138)	5 (≥139)	
Participants, No.	367	381	396	364	381	
Age, mean, y	40.2	40.0	40.3	40.1	40.5	.15
Men, %	34.2	36.0	42.3	50.5	58.7	<.001
African American, %	41.9	35.4	41.1	43.2	42.1	.30
BMI						
Mean	25.6	27.2	27.6	27.6	28.5	<.001
>30, %	16.0	23.0	24.9	25.1	29.8	<.001
Current smoker, %	23.4	19.2	14.8	16.0	15.7	.003
Oxidized LDL, mean, U/L	56.6	67.8	76.9	84.7	99.9	<.001
HDL cholesterol, mean, mg/dL	57.0	53.7	52.4	51.1	50.4	<.001
Triglyceride, mean, mg/dL	76.0	80.7	84.2	93.1	102.1	<.001
Glucose, mean, mg/dL	81.2	82.8	83.5	84.2	85.3	<.001
Insulin, mean, μU/mL	10.6	11.5	12.2	12.5	13.2	<.001
Blood pressure, mean, mm Hg						
Systolic	109.5	110.1	110.5	110.3	111.7	.02
Diastolic	71.4	72.1	73.3	72.7	73.8	<.001
Waist circumference, mean, cm	82.3	84.9	86.2	86.8	88.9	<.001
C-reactive protein, mean, mg/L	1.8	1.6	2.0	1.7	1.8	.60
Adiponectin, mean, mg/L	13.0	11.8	11.6	10.8	10.8	<.001

Abbreviations: BMI, body mass index, which is calculated as weight in kilograms divided by height in meters squared; HDL, high-density lipoprotein; LDL, low-density lipoprotein. SI conversion factors: To convert glucose to millimoles per liter, multiply values by 0.0555; C-reactive protein to nanomoles per liter, multiply by 9.524; HDL cholesterol to millimoles per liter, multiply by 0.0259; and triglycerides to millimoles per liter, multiply by 0.0113.

^aTabulated data are linear regression estimates of means that were adjusted for age, sex, race, and study center.

Figura 22

Associazioni trasversali tra LDL ossidate a 15 anni o LDL-C e demografia, abitudini salutari e variabili cliniche (N = 1889 senza sindrome metabolica all'anno 15) [24]

Quintiles of Oxidized LDL (U/L)						
	1 (<55.4)	2 ($55.4-69.1$)	3 ($69.2-81.2$)	4 ($81.3-97.3$)	5 (≥ 97.4)	P Value for Trend
Cases/No.	20/377	39/378	51/373	57/386	76/375	
Model ^b						
1	1 [Reference]	2.0 (1.2-3.6)	2.7 (1.6-4.7)	3.0 (1.7-5.1)	4.1 (2.4-7.0)	$<.001$
2	1 [Reference]	2.0 (1.1-3.6)	2.2 (1.3-4.0)	2.5 (1.4-4.5)	3.1 (1.8-5.4)	$<.001$
3	1 [Reference]	2.1 (1.1-3.8)	2.4 (1.3-4.3)	2.8 (1.5-5.1)	3.5 (1.9-6.6)	$<.001$
Quintiles of LDL Cholesterol (mg/dL)						
	1 (<86)	2 ($86-101$)	3 ($102-118$)	4 ($119-138$)	5 (≥ 139)	
Cases/No.	30/367	51/381	42/396	56/364	64/381	
Model ^b						
1	1 [Reference]	1.8 (1.1-2.9)	1.3 (0.8-2.2)	2.0 (1.2-3.2)	2.1 (1.3-3.4)	.002
2	1 [Reference]	1.5 (0.9-2.5)	1.0 (0.6-1.8)	1.7 (1.1-2.9)	1.5 (0.9-2.5)	.07
3	1 [Reference]	1.2 (0.7-2.0)	0.7 (0.4-1.3)	1.1 (0.6-1.9)	0.9 (0.5-1.5)	.55

SI conversion factors: To convert low-density lipoprotein (LDL) cholesterol to millimoles per liter, multiply values by 0.0259.

^aData are presented as odds ratio (95% confidence interval).

^bModel 1 is adjusted for age, sex, race, and study center. Model 2 is adjusted for model 1 variables and for year 15 cigarette smoking status, physical activity, and body mass index (calculated as weight in kilograms divided by height in meters squared). Model 3 is adjusted for model 2 variables and for year 15 LDL cholesterol or oxidized LDL.

©2008 American Medical Association. All rights reserved.

(Reprinted) JAMA, May 21, 2008—Vol 299, No. 19 2291

Figura 23

Incidenza al 20° anno della sindrome metabolica dal 15°, per LDL ossidate o LDL-C a bassa densità. Concentrazioni (N = 1889 senza sindrome metabolica all'anno 15) [24]

Quintiles of Oxidized LDL (U/L)						
	1 (<55.4)	2 ($55.4-69.1$)	3 ($69.2-81.2$)	4 ($81.3-97.3$)	5 (≥ 97.4)	P Value for Trend
High blood pressure No./total No. of participants	38/338	44/330	41/318	37/328	50/307	
OR (95% CI)	1 [Reference]	1.0 (0.6-1.7)	0.8 (0.5-1.4)	0.7 (0.4-1.2)	0.9 (0.5-1.6)	.36
High fasting glucose No./total No. of participants	47/371	71/363	73/364	83/372	118/363	
OR (95% CI)	1 [Reference]	1.6 (1.1-2.5)	1.5 (1.0-2.4)	1.6 (1.0-2.5)	2.4 (1.5-3.8)	.002
Abdominal obesity No./total No. of participants	38/335	39/317	45/280	54/309	51/269	
OR (95% CI)	1.0	1.1 (0.7-1.9)	1.5 (0.9-2.4)	1.8 (1.1-3.1)	2.1 (1.2-3.6)	.004
Low HDL cholesterol No./total No. of participants	19/304	20/277	29/269	30/259	21/225	
OR (95% CI)	1 [Reference]	0.9 (0.5-1.7)	1.1 (0.6-2.1)	1.1 (0.6-2.2)	0.8 (0.4-1.8)	.84
High triglyceride No./total No. of participants	23/372	27/363	32/345	43/353	49/299	
OR (95% CI)	1 [Reference]	1.0 (0.6-1.8)	1.2 (0.6-2.1)	1.5 (0.8-2.7)	2.1 (1.1-4.0)	.008
Quintiles of LDL Cholesterol (mg/dL)						
	1 (<86)	2 ($86-101$)	3 ($102-118$)	4 ($119-138$)	5 (≥ 139)	
High blood pressure No./total No. of participants	39/321	43/338	37/339	44/315	47/308	
OR (95% CI)	1 [Reference]	1.1 (0.7-1.8)	0.9 (0.5-1.5)	1.2 (0.7-2.0)	1.2 (0.7-2.2)	.41
High fasting glucose No./total No. of participants	49/358	84/371	70/384	81/352	108/368	
OR (95% CI)	1 [Reference]	1.5 (1.0-2.3)	0.9 (0.6-1.4)	1.1 (0.7-1.7)	0.8 (0.6-2.0)	.86
Abdominal obesity No./total No. of participants	38/313	47/308	47/313	47/286	48/290	
OR (95% CI)	1 [Reference]	1.3 (0.8-2.1)	1.1 (0.7-1.9)	1.3 (0.7-2.1)	1.1 (0.6-2.0)	.76
Low HDL cholesterol No./total No. of participants	12/282	25/281	26/268	32/240	24/263	
OR (95% CI)	1 [Reference]	2.1 (1.0-4.4)	2.1 (1.0-4.6)	3.0 (1.4-6.4)	2.0 (0.9-4.8)	.10
High triglyceride No./total No. of participants	16/349	27/355	38/375	52/330	41/323	
OR (95% CI)	1 [Reference]	1.3 (0.7-2.6)	1.6 (0.8-3.1)	2.5 (1.3-4.8)	1.5 (0.7-3.0)	.13

Abbreviations: CI, confidence interval; HDL, high-density lipoprotein; LDL, low-density lipoprotein; OR, odds ratio.

SI conversion factors: To convert LDL cholesterol to millimoles per liter, multiply values by 0.0259.

^aData are adjusted for age, sex, race, study center, cigarette smoking, physical activity, body mass index (calculated as weight in kilograms divided by height in meters squared), and LDL cholesterol or oxidized LDL. (body mass index was not included in the model when abdominal obesity was the dependent variable). Each row is a separate logistic regression model in which prevalent cases of the dependent variable (that is, each component of metabolic syndrome) were excluded. The 5 metabolic syndrome components are defined in the "Methods" section.

2292 JAMA, May 21, 2008—Vol 299, No. 19 (Reprinted)

©2008 American Medical Association. All rights reserved.

Figura 24

Incidenza di ciascun componente della sindrome metabolica dal 15° al 20° anno. Concentrazioni di LDL ossidate o concentrazioni di lipoproteine a bassa densità (N = 1889 senza sindrome metabolica all'anno 15) [24]

3.5 Lipoproteina (a) (Lp(a))

La **Lipoproteina (a)** è un tipo di lipoproteina a bassa densità (LDL), responsabile del trasporto del colesterolo nel sangue.

Si è rivelata uno dei più robusti markers di rischio CAD, in pazienti con e senza dislipidemia familiare di tipo FH, in quanto fattore lipoproteico aterotrombogeno, indipendentemente dai livelli di colesterolemia LDL [1].

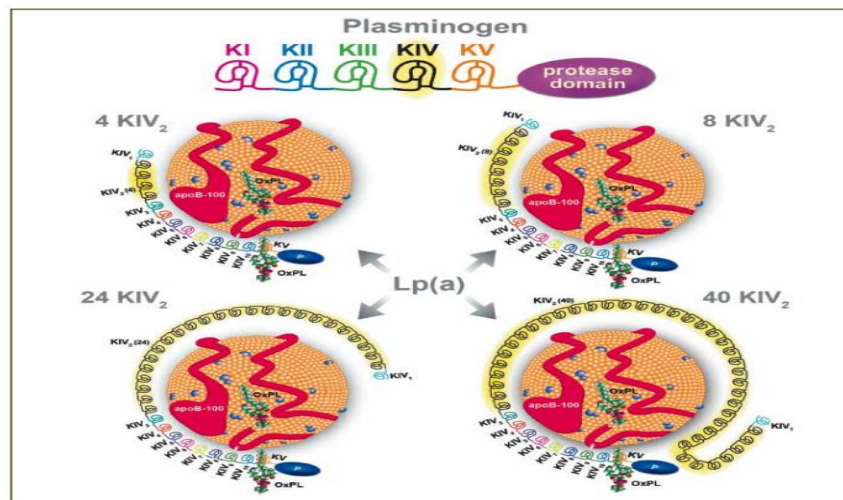


Figura 25

La lipoproteina(a) è costituita da una Lipoproteina LDL a cui si aggiunge la apolipoproteina(a) che si lega mediante formazione di un ponte disolfuro all'apoB100. Apo(a) deriva dal Kringle IV (KIV1) e KV, e dal dominio proteasico del plasminogeno. Il plasminogeno ha una sola copia di ciascun kringle (I-V) e un dominio proteasico attivo. Apo(a) contiene sottotipi di KIV1 ripetuti, composti ciascuno da 1 copia di KIV1, multiple copie di KIV2, e una copia di KIV3-10, KV, e un dominio P protease-like, inattivo. In questi esempi sono mostrate le isoforme di apo(a) di 4, 8, 24, e 40 KIV2 ripetizioni. [9]

La porzione proteica della Lp(a) è costituita da:

- Apolipoproteina B (apo B): coinvolta nel metabolismo dei lipidi, e maggior costituente di tutte le particelle LDLs e VLDLs (very low-density lipoproteins)
- Apolipoproteina A (apo A): glicoproteina plasminogen-like, legata covalentemente ad Apo B, rilevante per la sua potenzialità d'inibire la degradazione di coaguli ematici

Le dimensioni della porzione di apolipoproteina (a) contenuta nella Lp(a) variano da persona a persona, e al variare delle dimensioni varia anche la percentuale di rischio di sviluppare patologie cardiovascolari, con un rischio aumentato nel caso di complessi di minori dimensioni.

I livelli circolanti di Lp(a) sono determinati dal gene LPA, senza effetti significativi della dieta o altri fattori ambientali [2], motivo per cui la si considera un marker *genetico* di rischio cardiovascolare. Si è osservato che proprio il genotipo di apo-A determina sia la velocità di sintesi sia le dimensioni della molecola intera di Lp(a) [3, 4].

Anche il meccanismo di clearance dal plasma di Lp(a) rimane controverso, in quanto la rimozione per via recettoriale (mediante LDL receptors, LDL-Rs) risulta avere un ruolo modesto e disomogeneo: per esempio le statine, che per il loro meccanismo d'azione aumentano il numero dei LDL-Rs, non hanno effetto sui livelli di Lp(a), mentre gli inibitori PCSK9 - che pure aumentano il numero di LDL-Rs - ne determinano una più apprezzabile riduzione [5].

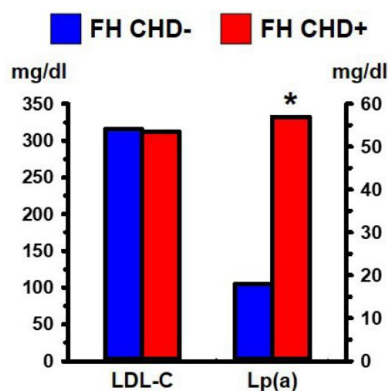


Figura 26

Individui con FH in eterozigosi raggruppati in base al fatto che avessero una malattia coronarica sintomatica (CHD+) o meno (CHD-).

I due gruppi non differivano significativamente nei loro livelli di LDL-C, ma differivano significativamente nei loro livelli di Lp(a).

FH, ipercolesterolemia familiare; LDL-C, colesterolo lipoproteico a bassa densità; Lp(a), lipoproteina a. [1]

Nel brillante lavoro di Seed et al. [6] viene mostrato che individui con dislipidemia familiare FH con patologie CAD hanno valori di Lp(a) maggiori rispetto ad individui FH in assenza di patologie CAD. E tale correlazione tra la Lp(a) e gli episodi CAD in individui FH risulta indipendente dai livelli di colesterolo-LDL. Anche più recentemente, in uno studio di Li et al. [7] mirato a valutare l'associazione tra Lp(a) e il fenotipo FH in 8.050 pazienti sottoposti ad angiografia coronarica, si è confermato un aumento dei livelli della Lp(a) nei pazienti con diagnosi clinica di FH.

Specificamente nei soggetti normolipidemici che incorrono – spesso precocemente - in patologie cardiovascolari [6, 8], si ipotizza la lipoproteina (a) come forte fattore

predisponente, per via di molteplici *meccanismi patogenici* in cui è coinvolta: *proaterogeni, protrombotici e proinfiammatori*.

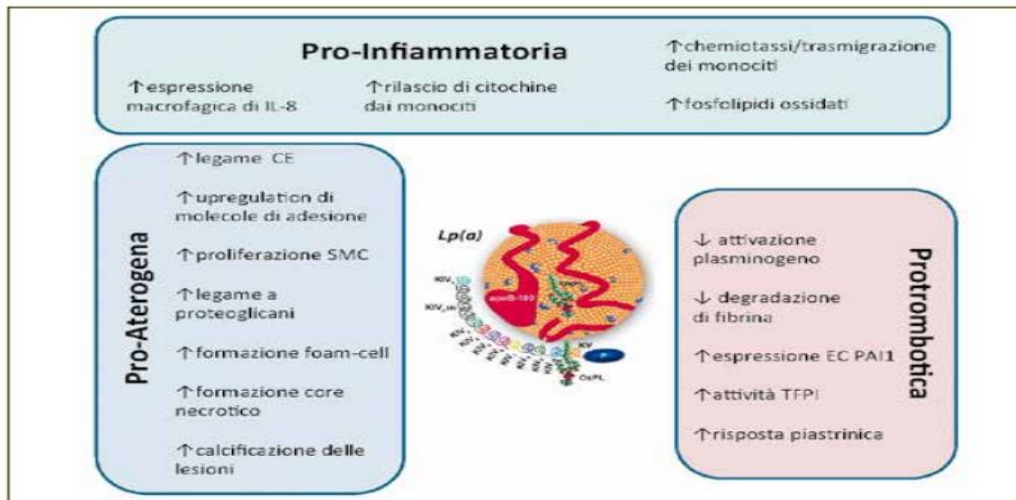


Figura 27

Meccanismi patogenici della Lipoproteina(a).

Vengono elencati i maggiori meccanismi individuati per ciascuna categoria.

EC = cellule endoteliali, IL = interleuchina, MCP = monocyte chemoattractant protein, PAI = plasminogen activator inhibitor, SMC = smoothmuscle cell, TFPI = tissue factor pathway inhibitor [9]

La sua particolare composizione, infatti, la rende più aterogena delle altre LDL, perché ne mantiene la suscettibilità all'ossidazione, ma ha anche una maggiore affinità per i proteoglicani e la fibronectina presenti sulla superficie endoteliale, accumulandosi di più sulla parete dei vasi e promuovendo la risposta infiammatoria e il processo aterosclerotico. Inoltre possiede un potenziale effetto antifibrinolitico, per un'omologia strutturale tra apo-A e il *plasminogeno*, enzima cui si sostituisce, con conseguente inibizione della degradazione di coaguli di sangue nei vasi sanguigni [9].

Studi angiografici asseriscono che livelli elevati di Lp(a) sono strettamente associati a eventi di **CHD (Coronary Heart Disease)** [10].

È dimostrato inoltre che individui con una concentrazione plasmatica di Lp(a) elevata (oltre i 50 mg/dL) presentano un rischio di infarto del miocardio, stroke ischemico e arteriopatia periferica 4 volte superiore rispetto a individui con valori inferiori, anche con livelli "normali" di LDLs [9, 11, 12].

Recentemente, è stato riconosciuto anche un suo ruolo causale nella patogenesi della calcificazione della valvola aortica in soggetti con ipercolesterolemia familiare, ma asintomatici [13].

Ulteriori conferme della sua - predittiva - aterogenicità arrivano da un altro studio in cui, in quasi 64000 soggetti con infarto miocardico, il sopracitato *gene Lp(a)* risulta avere l'associazione più forte con la patologia coronarica, superiore anche alla correlazione con le altre LDL [14].

Specificamente per lo stroke ischemico, invece, una meta-analisi del 2007 ha valutato 56.000 soggetti da 31 studi dimostrando che l'incidenza dell'ictus, negli studi prospettici, era più frequente nei pazienti del terzo più alto di distribuzione dei livelli di Lp(a) rispetto a quelli del primo terzo, portando alla conclusione che elevati livelli di Lp(a) siano un valido indice di rischio per l'incidenza di stroke [15].

Nel 2008 invece sono stati pubblicati i dati di 10 anni di follow-up dei 9.330 soggetti della popolazione generale del Copenhagen City Heart Study, in cui si sono osservati 498 casi di infarto del miocardio, con un incremento del rischio di IMA all'aumentare dei livelli di Lp(a) senza l'evidenza di un effetto soglia. I valori più elevati di Lp(a) (> 120mg/dL) predicevano un aumento di 3-4 del rischio di IMA nella popolazione generale [16].

Anche Erqou et al, su oltre 126.000 soggetti di 36 studi prospettici che riportavano i livelli di Lp(a) e dati di morbilità e mortalità cardiovascolare, ha evidenziato che vi era un'associazione continua e indipendente fra i livelli di Lp(a) con il rischio di CHD e stroke [17].

L'ipotesi che Lp(a) fosse un fattore di rischio indipendente per la malattia cardiovascolare è stata ulteriormente avvalorata da molti studi di biologia molecolare. Di particolare rilevanza quello del gruppo PROCARDIS [18], che analizzando il genotipo di 16.000 soggetti europei ha dimostrato che 2 particolari varianti del gene LPA (rs10455872 e rs3798220) sono associate ad un aumento del livello plasmatico di Lp(a), e svolgono un *ruolo causale* nello sviluppo della malattia coronarica e dell'infarto. Una persona su sei è portatrice di queste due varianti e ha di conseguenza livelli più elevati di Lp(a), ed un rischio di infarto raddoppiato rispetto ai soggetti con genotipo normale; i soggetti portatori di entrambe le varianti hanno un rischio elevato di più di quattro volte.

Non esiste ancora un trattamento farmacologico specificamente approvato per la riduzione dei livelli di Lp(a), e l'attuale protocollo – costituito da niacina, mipomersen e inibitori di PCSK9 -, pur apportando una riduzione dei livelli di Lp(a), non è stato valutato in studi clinici mirati a pazienti con Lp(a)-iperlipoproteinemia.

Attualmente il trattamento di elezione in soggetti ad alto rischio è rappresentato dall'aferesi lipoproteica, che si è osservato ridurre del 60-70% i livelli di Lp(a), e migliorare l'outcome cardiovascolare nei pazienti [19, 20].

Secondo le raccomandazioni dell'EAS [21], Lp(a) dovrebbe essere misurata in tutti i pazienti a rischio intermedio/alto: pazienti FH, con malattia cardiovascolare prematura e con storia di malattia cardiovascolare in assenza di elevati valori di LDL-C, o con recidiva di malattia coronarica nonostante il trattamento con statine (*si veda la figura 28*). Tuttavia, è auspicabile promuovere la valutazione dei livelli di Lp(a) non solo in pazienti con pregresse diagnosi di malattie cardiovascolari, ma anche in programmi di screening di popolazione.

Soggetti con
Malattia CV prematura
Ipercolesterolemia Familiare
Storia familiare di malattia CV prematura / o elevata Lp(a)
Ricorrenza di malattia CV nonostante trattamento ipolipemizzante ottimale
Rischio SCORE a 10 anni ≥5%

Figura 28

Soggetti in cui dovrebbe essere valutata Lp(a) secondo le linee guida EAS [9]

3.5.1 Modulazione della Lp(a) con alimentazione e nutraceutica

Storicamente, il marker Lp(a) è stato individuato e considerato come un fattore geneticamente determinato di rischio CAD, non influenzato dalla dieta né dall'utilizzo di statine di sintesi [1]. Tuttavia questo paradigma è basato esclusivamente su studi svolti su individui con una dieta a basso introito di grassi (*LFD*, Low Fat Diet), che sicuramente non modula i valori di Lp(a), o addirittura ne aumenta i livelli [2].

Ci sono studi, invece, che vanno a ipotizzare che le diete a basso introito di carboidrati (*LCD*, Low Carb Diet), tendano ad abbassare i livelli di Lp(a) [3].

Ad oggi, le soluzioni per la diminuzione di Lp(a) si basano su:

- La riduzione di grassi idrogenati dalla dieta
- L'aumento dell'attività fisica

Come già specificato, la Lp(a) non viene modulata dall'assunzione di statine, e l'unico presidio che la riduce significativamente è l'acido nicotinico a lento rilascio a dose piena.

Nel lavoro del 2014, Wood et al [3] hanno dimostrato che una dieta LCD (con rapporto % carboidrati:grassi:proteine di 13:60:27), proposta nella tabella seguente per 12 settimane, può ridurre del 12% i livelli di Lp(a) in pazienti sovrappeso (n = 30).

La riduzione di Lp(a) è stata correlata significativamente alla riduzione di colesterolo-LDL e massa grassa, ma non alla riduzione di peso.

Nutrient	Baseline (Habitual)	Week 12 of CRD	P Value (Time)
Total Energy (kcal)	2350 ± 676	1632 ± 496	< 0.001
Saturated Fat (g)	36.4 ± 16.2	36.8 ± 15.1	> 0.05
MUFA (g)	39.2 ± 15.9	45.2 ± 17.2	> 0.05
PUFA (g)	19.0 ± 7.2	17.9 ± 8.1	> 0.05
Trans Fats (g)	6.1 ± 2.7	3.8 ± 1.8	< 0.001
Methionine (g)	2.2 ± 0.7	2.7 ± 0.8	< 0.01
Total Folate (µg)	434.6 ± 174.1	455.0 ± 121.1	> 0.05
Vitamin B6 (mg)	2.0 ± 1.0	2.7 ± 0.6	< 0.001
Vitamin B12 (µg)	10.1 ± 16.5	11.2 ± 5.3	> 0.05

Figura 29

Cambiamenti dietetici di macro e micronutrienti tra diete abituali e d'intervento per 12 settimane in uomini in sovrappeso. I soggetti hanno consumato un CRD integrato da un multivitaminico standard consumato a giorni alterni per 12 settimane. MUFA = acidi grassi monoinsaturi; PUFA = acidi grassi polinsaturi. [3]

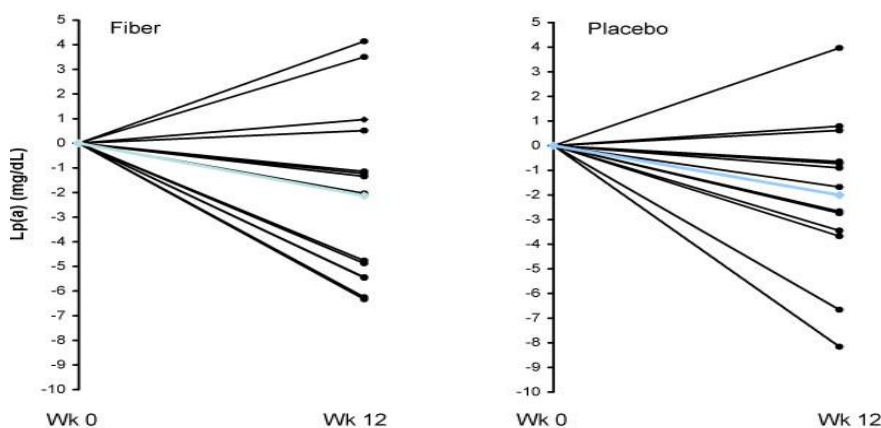


Figura 30

Risposte individuali di Lp(a) per i gruppi fibra (pannello di sinistra) e placebo (pannello di destra) dal basale alla settimana 12 per gli uomini in sovrappeso (n = 29) che hanno consumato una CRD. La linea blu rappresenta la media. [3]

Questi risultati fanno ipotizzare che, presumibilmente (i dati devono essere confermati su larga scala), i livelli di Lp(a) possano essere modulati da i) restrizione calorica, ii) attività fisica e iii) dieta povera di acidi grassi trans, con possibile sostegno dalla nutraceutica.

A tal proposito, uno studio recentissimo disamina approfonditamente sia il ruolo ed i meccanismi propri della lipoproteina (a), sia gli effetti sui suoi livelli plasmatici di alcuni interventi, sulla dieta e che con integrazione mirata [4].

Nonostante l'attuale scarsità di approcci specifici, infatti, si è osservato che l'impiego della L-carnitina e del coenzima Q10 possa dare risultati promettenti, per quanto da approfondire per appurarne i meccanismi d'azione e stabilirne le dosi necessarie/utili.

A livello nutrizionale, invece, il consumo di acidi grassi saturi e di basse concentrazioni di etanolo (soprattutto se da vino rosso) si è rivelato utile nella riduzione della concentrazione di Lp(a), anche se l'assunzione è da incoraggiare con cautela. Altri tipi di bevande con efficacia interessante sono il the e il caffè, in misura diversa in base ai tipi, ma anche qui dovranno essere svolte ulteriori indagini.

Sostanze comunemente consigliate per i benefici cardiovascolari "generici", invece, come la vitamina C, gli isoflavoni della soia, l'aglio e gli ω -3, non influiscono significativamente sui livelli di Lp(a).

4. PROFILO D'INFIAMMAZIONE CELLULARE

Si definisce “inflammaging” uno stato di infiammazione cronica (persistente) a bassa intensità, sviluppato in seguito alla perdita dei meccanismi protettivi dell'organismo verso agenti nocivi ambientali, chimici, fisici e biologici. Tale stato genera una rottura dell'equilibrio omeostatico fisiologico sviluppando malattie croniche su base infiammatoria (come cancro, alzheimer, patologie cardiovascolari) e accelerando il processo d'invecchiamento.

Il nodo centrale del sistema immunitario innato è il *fattore di trascrizione NF-kB* (fattore nucleare-kB). È questo l'interruttore principale in grado di attivare l'espressione di vari prodotti genici infiammatori, come ciclo-ossigenasi (COX-2), fattore di necrosi tumorale (TNF-alfa) e interleuchine (IL-6) che amplificano la risposta infiammatoria iniziale, segnalando alle cellule circostanti di aumentare la loro attività.

Alcuni fattori di matrice alimentare sono in grado di aumentare l'NF-Kb. Tra questi figurano lo stress ossidativo da eccessivo apporto calorico e l'iper-produzione di ormoni pro-infiammatori, causata dall'eccesso di acido arachidonico.

L'*infiammazione* si articola in due fasi distinte: la prima è l'innescò della risposta infiammatoria, la seconda è la risoluzione della stessa.

La fase risolutiva è controllata da un gruppo di ormoni (resolvine, maresine, protectine) che derivano dagli acidi grassi omega-3.

Finché le fasi di avvio e di risoluzione sono in equilibrio, si ha un'omeostasi infiammatoria; se, invece, l'infiammazione è troppo forte, o l'azione risolutiva troppo debole, il risultato è una *infiammazione cellulare a bassa intensità*. Questo *stato cronico* a livello cellulare è la forza propulsiva dell'insorgere di obesità, sindrome metabolica, diabete, e comorbidità associate.

I *PUFAs* (Poly Unsaturated Fatty Acids) possono essere classificati in due famiglie principali: *omega-3* e *omega-6*, definiti *essenziali* poiché il nostro organismo non può sintetizzarli, quindi si possono assumere solo con la dieta.

La famiglia omega-6 ha come precursore l'*acido linoleico*, mentre l'*acido α -linoleico* è il precursore degli omega-3.

Da questi acidi grassi essenziali, per desaturazione (quindi formazione di insaturazioni, doppi legami) ed allungamenti, si originano l'acido eicosapentaenoico (EPA), l'acido

diomo- γ -linoleico (DGLA) e l'acido arachidonico (AA), a loro volta precursori di molecole chiamate *prostanoidi*, con azione pro-infiammatoria o anti-infiammatoria.

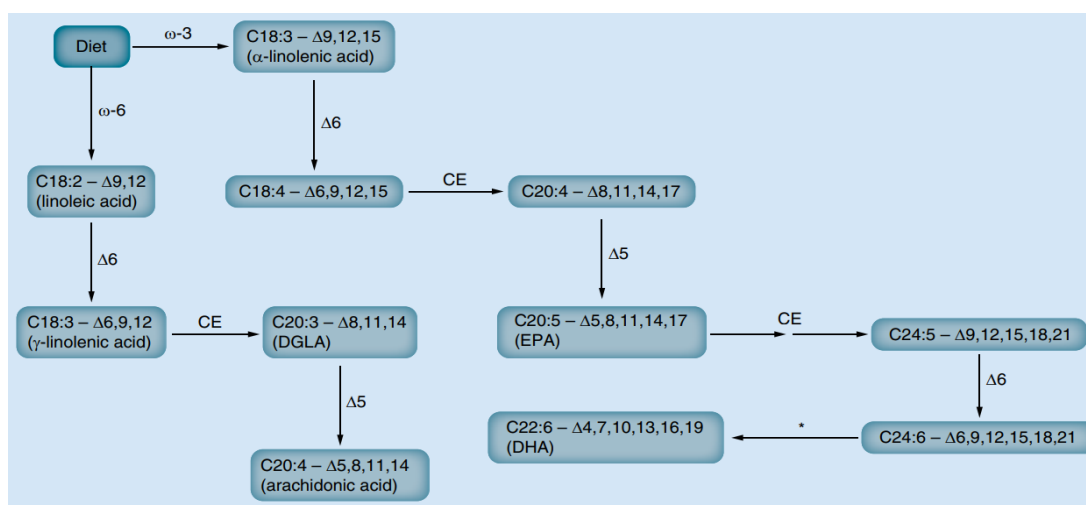


Figura 31

Principali vie biosintetiche degli acidi grassi polinsaturi (ω -3 e ω -6) nei tessuti animali. I doppi legami formati dalla desaturazione (Δ 5, Δ 6) sono nella configurazione geometrica *cis* e sono indicati da frecce verticali. Le frecce orizzontali indicano CE e accorciamento della catena a 2 atomi di carbonio (*).

CE: allungamento della catena 2-Carbonio; DGLA: acido diomo- γ -linolenico; DHA: acido docosaesaenoico; EPA: acido eicosapentaenoico [2]

La via omega-6 prevede la formazione di acido gamma linoleico (GLA) per azione dell'enzima Δ 6-desaturasi. Successivamente alla formazione di GLA interviene l'elongasi, con sintesi di acido diomo- γ -linoleico (DGLA), il quale ha diverse funzioni fondamentali: origina le prostaglandine di serie 1 ed i leucotrieni di serie 3, regola la fosfolipasi A2 (responsabile della liberazione di acido arachidonico dalla membrana cellulare), aiuta la maturazione dei linfociti.

Inoltre, il DGLA funge da substrato per la Δ 5-desaturasi, enzima che forma il quarto doppio legame e porta alla sintesi di acido arachidonico, a sua volta precursore dei prostanoidi del gruppo 2 (PGD2, PGE2, PGF2, PGI2, TXA2), dei leucotrieni della serie 4 e delle lipoxine.

Alcuni dei mediatori nominati hanno ben note attività infiammatorie e per questo l'acido arachidonico e la cascata omega-6 vengono definiti '*via infiammatoria tout court*'.

Quindi una concentrazione elevata di acido arachidonico indica una *tendenza pro-infiammatoria*, in quanto fungerà da segnalatore cellulare e precursore di prostaglandine.

Nella figura successiva, sono schematizzate le sostanze sintetizzate in seguito alla cascata dell'acido arachidonico, e la loro specifica patogenesi (nell'aterosclerosi, negli eventi infiammatori, nei processi apoptotici, etc).

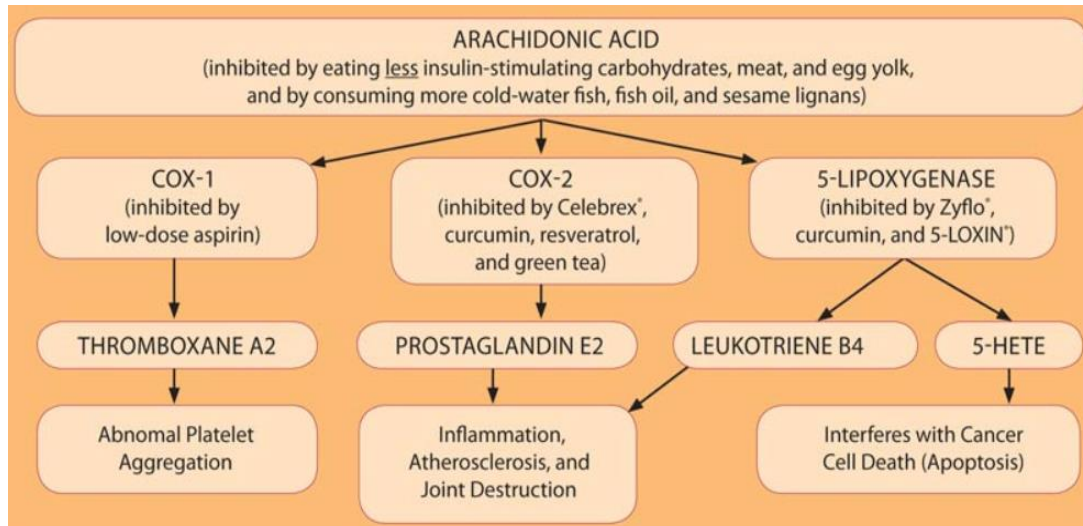


Figura 32

Diagramma di flusso della cascata dell'acido arachidonico, per evidenziare i pathways con cui l'AA può trasformarsi in un composto dannoso e provocare patologie artritiche, carcinogene e cardiovascolari.

La via omega-3 invece parte dall'acido α -linoleico, che viene trasformato dall'enzima $\Delta 6$ -desaturasi nel corrispondente derivato con 4 doppi legami, l'acido stearidonico.

La via prevede altri passaggi successivi di elongazione e di desaturazione ($\Delta 5$), che portano alla sintesi di acido eicosapentanoico (EPA) [1].

Come l'acido arachidonico, l'EPA è un substrato per la sintesi dei mediatori eicosanoidi prodotti dagli enzimi ciclo-ossigenasi e lipo-ossigenasi, e quindi compete con l'acido arachidonico per le stesse vie metaboliche.

Gli eicosanoidi della serie "2" prodotti dall'acido arachidonico hanno proprietà pro-infiammatorie, pro-aggreganti, di vasocostrizione e proprietà immunosoppressive.

Quelli della serie "3" prodotti dall' EPA hanno invece proprietà antinfiammatorie, antiaggreganti, vasodilatatorie e antiaritmiche, oltre a proprietà immuno-modulanti [2].

Sempre a partire da EPA, in seguito ad elongazione, saturazione e beta-ossidazione, si ottiene come prodotto finale l'acido docosaesanoico (DHA). Il ruolo principale di EPA e DHA è di bilanciare gli effetti infiammatori dell'AA e per questo risultano fondamentali. Nella figura sottostante viene descritta la competizione metabolica omega-6 e omega-3.

L'effetto anti-infiammatorio degli ω -3 si articola in tre vie distinte che lavorano in modo sinergico sull'inflammaging cellulare:

1. **Controllo della via della produzione di AA** attraverso la Δ 6-desaturasi, enzima chiave della via ω -6, e la Δ 5-desaturasi che catalizza la sintesi da DGLA ad AA. Un eccesso di precursore ω -3 (acido linolenico) è in grado di spostare l'equilibrio verso la via ω -3 e rallentare la via ω -6. Inoltre, alte concentrazioni di DHA possono rallentare l'azione della Δ 6-desaturasi, mentre elevate concentrazioni di EPA rallentano la via della Δ 5-desaturasi.

2. **Controllo della produzione di mediatori pro-infiammatori** in quanto l'EPA è in grado di competere con l'arachidonico per lo stesso enzima lipossigenasi, per la produzione di eicosanoidi. Un aumento di EPA sposterà l'equilibrio verso la produzione di ormoni risolutivi dell'inflammaging.

3. **Produzione a partire dall'EPA di una serie di mediatori ad azione anti-infiammatoria** (resolvine, maresine, protectine) capaci di risolvere l'infiammazione acuta.

In una recente review del 2016 vengono descritti tutti i meccanismi biochimici dell'azione cardio-protettiva in chiave anti-infiammatoria degli ω -3 [3].

L'alimentazione gioca un ruolo fondamentale, in quanto la quantità e la qualità degli acidi grassi essenziali introdotti attraverso la dieta influenza la quantità di ω -3 e ω -6 nel nostro organismo e, di conseguenza, la produzione di eicosanoidi [1].

Non è il singolo valore % di EPA e AA nella membrana eritrocitaria (substrato d'elezione che andremo a descrivere), a dare un quadro clinico dell'inflammaging cellulare, quanto piuttosto il rapporto AA/EPA e il rapporto Omega-6/Omega-3. Sono questi ad oggi i markers più robusti per individuare uno stato di infiammazione cronica, che può derivare da:

- i. deficit nutrizionali (carenza di omega-3 da pesce o di precursori omega-3 da frutta secca)
- ii. eccessivo utilizzo di oli vegetali e carne rossa (precursori della via omega-6)
- iii. stati di insulinemia in Sindrome Metabolica (l'insulina attiva la Δ 5-desaturasi).

Il rapporto AA/EPA è un marker dell'inflammaging cellulare, come confermato in diversi studi epidemiologici sulla popolazione italiana [4].

Nell'importante lavoro di Rizzo *et al.* i ricercatori individuarono il valore medio del rapporto AA/EPA eritrocitario in una popolazione italiana di controllo (healthy subject, n=300) ed in una classe di popolazione con patologie degenerative (pathological subject n=577). I due valori risultarono statisticamente differenti, con un aumento significativo del rapporto nella popolazione patologica.

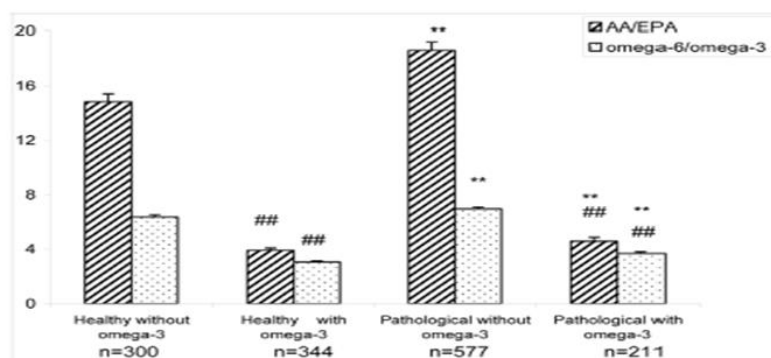


Figura 33

Rapporti AA/EPA e omega-6/omega-3 nel sangue intero di soggetti sani e in un gruppo di pazienti con varie patologie, con e senza consumo di omega-3. [4]

Gli stessi autori dimostrarono come il rapporto AA/EPA suddiviso in diverse popolazioni patologiche sia superiore alla media del rapporto della popolazione di controllo, ad indicare come lo sbilanciamento dell'equilibrio Omega-6/Omega-3 abbia un ruolo cruciale nell'insorgenza delle patologie.

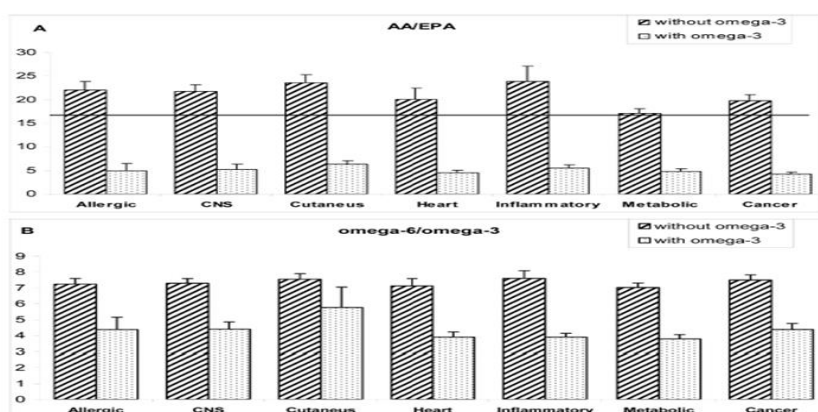


Figura 34

(A) Rapporti AA/EPA e (B) rapporti omega-6/omega-3 nel sangue intero di pazienti raggruppati in base alle loro specifiche patologie. Le linee orizzontali indicano il valore medio per tutti i soggetti sani che non fanno uso di omega-3. [4]

4.1 Infiammazione e CAD

Come descritto nei paragrafi precedenti, la teoria attualmente più accreditata per il processo di aterogenesi è quella infiammatoria, “*the response to injury*”, che vede nell’infiammazione il meccanismo con cui i fattori di rischio cardiovascolare scatenano una risposta riparativa nella parete vascolare, anzitutto con l’attivazione endoteliale, e conseguentemente con la formazione della placca aterosclerotica.

La stessa aterosclerosi è ormai correntemente considerata una patologia immuno-mediata [1], in quanto si è osservato per esempio che nei soggetti affetti da SCA (sindromi coronariche acute), l’ischemia miocardica provoca l’incremento dei livelli plasmatici di alcuni marcatori flogistici, tra cui anche alcune *citochine infiammatorie* (interleuchina IL-1, IL-6, fattore di necrosi tumorale TNF- α), con dimostrate implicazioni sulla prognosi a breve e medio termine.

In uno studio italiano del 2006 [2], si sono raccolte le evidenze che spiegano il ruolo dell’infiammazione nell’aterogenesi, e in particolare il ruolo delle citochine pro-infiammatorie nelle SCA.

Per SCA si intende un ampio spettro di situazioni cliniche che presentano una patogenesi comune, rappresentata dalla *trombosi coronarica*. Le differenti presentazioni cliniche dipendono dal fatto che l’occlusione coronarica sia completa, incompleta, intermittente o persistente.

La lesione principale, definita ateroma o placca fibrolipidica, è costituita da una *placca* localizzata e rilevata nell’intima, formata da un *cappuccio fibroso* e da un *core lipidico*. Il cappuccio fibroso è costituito da scarsi leucociti e da cellule muscolari lisce, migrate nell’intima dalla media, che secernono fibre collagene interstiziali. Il nucleo lipidico è costituito da aghi di colesterolo, detriti cellulari, cellule “schiumose”, fibrina, trombi in vario stadio di organizzazione e altre proteine plasmatiche [3, 4].

Le placche aterosclerotiche iniziano a formarsi già dai 25 anni sotto forma di *strie lipidiche*, inizialmente con distribuzione focale, aumentando poi di numero e dimensioni con la progressione della malattia. Le placche si accrescono e invadono progressivamente il lume dell’arteria, estendendosi alla tonaca media sottostante.

In vari modelli animali di aterosclerosi, i segni dell’infiammazione si riscontrano fianco a fianco con l’accumulo lipidico nella parete delle arterie. Per esempio, i leucociti si localizzano nelle lesioni aterosclerotiche più precoci, sia nei modelli animali che

nell'uomo. Le basi biologiche dell'infiammazione applicata all'aterosclerosi hanno fornito una nuova chiave di lettura dei meccanismi fisiopatologici, sottolineando proprio il ruolo del *reclutamento leucocitario* [5].

Una volta raggiunta la parete del vaso, le cellule infiammatorie partecipano e perpetuano una risposta infiammatoria locale. I macrofagi esprimono dei recettori "scavenger" per lipoproteine modificate, che portano alla fagocitosi di lipidi e alla formazione di cellule schiumose.

Le cellule T ricevono segnali che permettono loro di elaborare citochine infiammatorie, come IFN- γ e linfotossine (TNF- α), che a loro volta possono stimolare macrofagi, cellule endoteliali e cellule muscolari lisce [6].

I processi infiammatori non solo promuovono l'iniziazione e l'evoluzione dell'ateroma, ma contribuiscono anche a sviluppare *complicazioni trombotiche acute* della placca aterosclerotica. Molti trombi coronarici che causano infarto miocardico crescono a seguito di un'alterazione strutturale della placca.

I macrofagi attivati, abbondanti nell'ateroma, possono produrre enzimi proteolitici che degradano il collagene, portando ad un assottigliamento del cappuccio fibroso, di per sé protettivo della placca, rendendolo debole e suscettibile alla rottura.

L'IFN- γ prodotto dai linfociti T attivati nella placca può alterare la sintesi del collagene dovuta alle cellule muscolari lisce, limitandone la capacità di rinnovare il collagene che rinforza la placca, quindi indebolendo quest'ultima [7, 8].

I macrofagi producono anche fattore tissutale, il più importante *fattore pro-coagulante*, stimolo alla trombosi nella placca.

I mediatori infiammatori regolano l'espressione del fattore tissutale sui macrofagi delle placche, fornendo un legame essenziale tra l'infiammazione e i processi trombotici [9].

A seguito della rottura della placca viene esposto il core lipidico, che innesca una serie di eventi pro-coagulanti.

IL-CD40 ligand (o citochina CD154) si lega alle piastrine promuovendo ulteriormente lo stato infiammatorio e procoagulante [10-13].

Nella figura di seguito sono schematizzati gli eventi che generano e poi perpetuano l'aterogenesi, correlatamente alla presenza delle citochine e alla loro azione specifica su

tutti i principali substrati coinvolti (le cellule endoteliali, quelle muscolari lisce, i macrofagi e le piastrine).

Gli stimoli responsabili degli incrementi degli indici di flogosi associati agli eventi coronarici non sono ancora ben certi. Essi possono derivare dalle lesioni aterosclerotiche stesse, e riflettere sia l'estensione dell'aterosclerosi, sia l'infiammazione locale che predispone all'instabilità ed alla rottura di placca.

È anche probabile che gli aumentati livelli sierici dei marker di flogosi possano derivare da un'infiammazione sistemica di basso grado – cronica, stato di inflammaging - capace di esercitare un effetto pro-aterogeno e pro-coagulante.

Le SCA sono comunemente scatenate dalla rottura del cappuccio fibroso delle placche aterosclerotiche, che permette l'esposizione di materiale altamente trombogenico. La composizione cellulare delle placche vulnerabili è caratterizzata da infiltrati di linfociti T e macrofagi, entrambi attivati dalle *lipoproteine a bassa densità (LDL) ossidate*.

Queste possono stimolare i monociti a produrre fattori pro-infiammatori e citochine. Queste ultime possono avere un'attività soppressiva, come l'IL-10, oppure un'attività stimolante, come l'IL-8 e l'IL-12 che attivano i linfociti T, inducendo la produzione di IFN- γ [14].

Le citochine giocano un ruolo chiave nel promuovere e nel sopprimere risposte cellulari e umorali verso tossine endoteliali come le LDL ossidate, che (come precedentemente descritto) hanno anche azione pro-infiammatoria, stimolando l'ulteriore sintesi di chemochine e citochine, includendo fattori stimolanti, colonie macrofagiche, proteine chemoattrattanti, i monociti e TNF- α [15, 16, 17].

4.2 Meccanismi cardioprotettivi degli acidi grassi ω -3 e ruolo innovativo delle pro-resolvine nella gestione dell'inflammaging

Recenti indagini hanno dimostrato che la risoluzione dell'infiammazione non è un processo passivo, come in precedenza si ipotizzava, ma piuttosto un processo *biosinteticamente attivo*, regolato da mediatori biochimici e guidato da *specialized pro-resolving mediators (SPM)*.

In particolare sono state scoperte e studiate diverse classi di SPM derivati dagli acidi grassi ω -3, come schematizzato in *figura 35*.

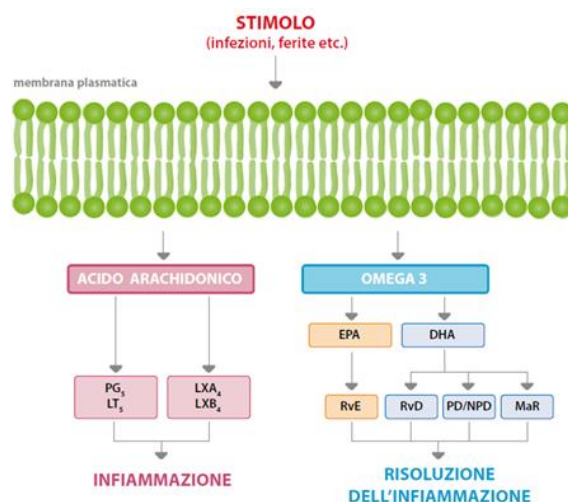


Figura 35
Classi di SPM derivanti dagli acidi grassi ω -3

EPA	DHA		
RESOLVINE DELLA SERIE E	RESOLVINE DELLA SERIE D	PROTECTINE/ NEUROPROTECTINE	MARESINE
Riducono l'infiltrazione di PMN (polimorfonucleati) nei loci infiammatori.	Riducono l'infiltrazione di PMN nei loci infiammatori.	Riducono l'infiltrazione di PMN nei loci infiammatori.	Riducono l'infiltrazione di PMN nei loci infiammatori.
Inibiscono il reclutamento leucocitario.	Inibiscono l'adesione leucocitaria: diminuiscono le interazioni leucocito-endoteliali.	Bloccano la migrazione delle cellule T.	Stimolano la fagocitosi aumentando la capacità dei macrofagi di rimuovere, dalla sede dell'infiammazione, le cellule apoptotiche, quelle necrotiche e le eventuali particelle microbiche.
Riducono l'espressione genica pro infiammatoria.	Stimolano la sintesi di prostaciclina vasoprotettiva.	Inibiscono la secrezione di TNF- α e di IFN γ .	
Mediano la fagocitosi non flogistica e la clearance linfatica dei neutrofili apoptotici da parte dei macrofagi attivati.	Promuovono la clearance batterica dipendente dai fagociti.	Promuovono l'apoptosi.	
Proteggono dalla distruzione ossea mediata dagli osteoclasti e prevengono la parodontite.	Riducono drasticamente i livelli di citochine pro infiammatorie.	Hanno azione immunoregolatoria e protettiva nei vari parenchimi, in particolare: sistema nervoso, retina e apparato respiratorio in corso di asma allergica.	
Promuovono la sintesi ed il rilascio di citochine anti infiammatorie: IL-6R, IL-10 e TGF- β 1.	Promuovono la sintesi ed il rilascio di citochine anti infiammatorie: IL-6R, IL-10 e TGF- β 1.	Regolano la sopravvivenza delle cellule del cervello e della retina stimolando l'espressione dei geni anti apoptotici e neuroprotettivi.	
Sopprimono la capacità dei monociti di sintetizzare IL-1, IL-1 mRNA, IL-1 β , IL-6, IFN, TNF- α , IL-8 e PAF nelle cellule endoteliali delle vene.	Sopprimono la capacità dei monociti di sintetizzare IL-1, IL-1 mRNA, IL-1 β , IL-6, IFN, TNF- α , IL-8 e PAF nelle cellule endoteliali delle vene.	Bloccano l'espressione di proteine pro infiammatorie come le COX ₂ .	
Riducono il dolore infiammatorio.		Riducono l'aggregazione piastrinica.	

Figura 36
Classi di SPM

Queste classi di molecole hanno una comune azione anti-infiammatoria, ma agiscono su recettori diversi, proteggendo i tessuti da stress ossidativo, infiammazione ed infezioni.

Già nel 1944 Sinclair descrisse il tasso ridotto di cardiopatia ischemica negli Inuit (Eschimesi della Groenlandia), ponendolo in rapporto all'elevato consumo dietetico di cetacei, foche e pesce. Queste osservazioni furono approfondite negli anni '70 del secolo scorso da Dyerberg e Bang, i quali evidenziarono che nonostante un basso apporto

alimentare di frutta e verdura ed un'elevata assunzione di grassi saturi e colesterolo, la concentrazione dei lipidi plasmatici era inferiore negli Inuit rispetto ai soggetti emigrati in Danimarca o ai nativi danesi, e minore l'incidenza di infarto miocardico anche dopo stratificazione per età e sesso. Documentarono che gli effetti benefici rivolti prevalentemente al sistema cardiovascolare erano verosimilmente correlati all'elevato apporto dietetico di **LC PUFA n-3** (long-chain polyunsaturated fatty acids: EPA, DPA, e DHA per circa 13 g/die vs 0,8 g/die dei danesi) [1, 2].

Gli effetti protettivi a livello cardiovascolare dei LC PUFA n-3 sono mediati da differenti meccanismi, a carico di diversi fattori di rischio e vie metaboliche (come illustrato in *figura 37 e 38*) [3].

Ruolo fisiologico degli AG ω3	Benefici clinici potenziali	Target
Regolazione pressoria	↓ pressione arteriosa	Iperensione; MCV
Regolazione piastrinica	↓ rischio di trombosi	MCV
Regolazione della coagulazione	↓ rischio di trombosi	MCV
Regolazione livelli di trigliceridi	↓ trigliceridemia	MCV
Regolazione funzione vascolare	↑ FMD	MCV
Regolazione ritmo cardiaco	↑ tono vagale, ↓ aritmie	MCV
Regolazione funzione miocardica	↑ compliance ed efficienza VS	MCV
Regolazione dell'infiammazione	↓ infiammazione	Malattie infiammatorie; MCV
Regolazione sensibilità insulinica	↑ sensibilità insulinica	Diabete tipo 2; MCV

Figura 37

Ruolo fisiologico e potenziali benefici dei PUFA ω-3 [3]

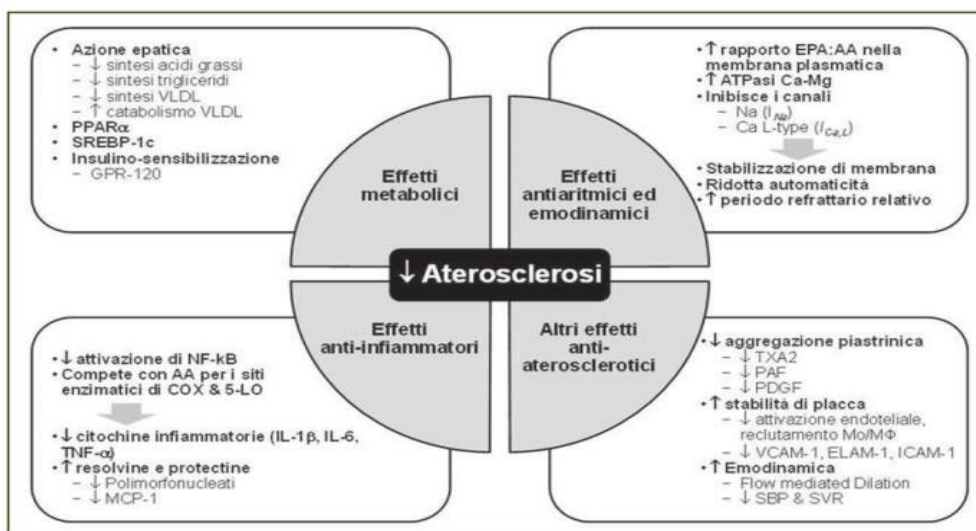


Figura 38

Potenziali effetti benefici dei PUFA ω-3.

AA, Acido Arachidonico; COX, Ciclossigenasi; 5-LO, 5 Lipossigenasi; TXA2, Trombossano A2; Mo/MΦ, sistema dei Monociti-Macrofagi; SBP, Pressione arteriosa Sistolica; SVR, Resistenze Vascolari Sistemiche [3]

I meccanismi attraverso cui agiscono sono molteplici: essi intervengono nell'inibizione di NF- κ B (nuclear factor - κ B), tramite il reclutamento di Toll-like receptor-4, inibizione delle cicloossigenasi (COX), in particolare COX-2, inibizione delle molecole di adesione (VCAM-1, ELAM-1, ICAM-1) e della sintesi di citochine pro-infiammatorie quali IL-1 β , IL-6, TNF- α [4].

Recentemente si è evidenziato come i LC PUFA n-3 siano anche trasformati in composti di nuova identificazione, quali epossidi, alcoli, dioli e chetoni. Queste sostanze, attive in un range di concentrazione nanomolare, sono stereoselettive, svolgono azioni antinfiammatorie e sono prodotte durante la fase di risoluzione dell'infiammazione attraverso vie sintetiche trans-cellulari: sono state definite "**resolution-phase interaction products**" (*resolvine*: protectine, maresine e lipoxine) [5]; tali citochine limitano l'infiltrazione tissutale di polimorfonucleati (PMN), favoriscono la degradazione dei PMN apoptotici da parte dei macrofagi, inibiscono l'espressione di COX-2, TNF- α e della proteina di chemo-attrazione dei macrofagi (MCP-1) [6, 7].

Tutte queste azioni sinergicamente inibiscono i meccanismi che portano alla formazione della placca aterosclerotica e assicurano una maggior stabilità delle lesioni vascolari già instaurate (per esempio con una riduzione della flogosi e un aumento dello spessore del cappuccio fibroso) [8, 9].

Parte di questi effetti antinfiammatori sono invece conseguenza diretta del processo di integrazione dei LC PUFA n-3 all'interno delle membrane cellulari. La loro presenza nei fosfolipidi di membrana rappresenta un meccanismo generale capace di determinare modifiche funzionali nelle cellule interessate; in particolare essi si localizzerebbero al di fuori di particolari domini della membrana cellulare (i cosiddetti "lipid-rafts", ricchi in colesterolo e sfingolipidi, e contenenti molte proteine coinvolte nella trasduzione di segnali cellulari) influenzandone la formazione e la funzione.

Proprio per le ragioni appena esposte si è identificato un parametro analitico, il cosiddetto *Indice Omega-3*, che sembra costituire un determinante biologico utile ad esprimere livelli efficaci di LC PUFA n-3.

Esso viene calcolato come somma di EPA+DHA presenti nelle *membrane eritrocitarie*, ed espresso come percentuale degli acidi grassi totali dei globuli rossi.

È stato validato in rapporto all'assunzione alimentare di LC PUFA n-3 e si è visto correlare da vicino con la riduzione della mortalità cardiovascolare [10].

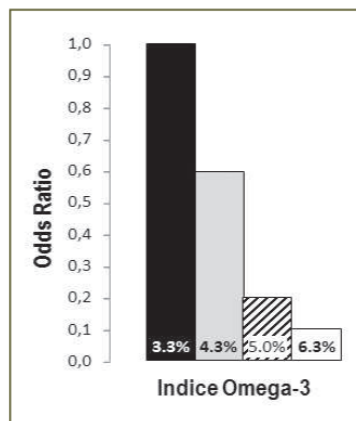


Figura 39

Rapporto tra l'indice Omega-3 ed il rischio di arresto cardiaco (Odds Ratio) in uno studio caso-controllo. [3]

4.2.1 Lipidomica eritrocitaria e indici utili

Per valutare le unità fondamentali delle *classi di acidi grassi* che compongono le membrane cellulari dell'organismo su diverse matrici biologiche, ci si avvale della **lipidomica**.

Questa ha lo scopo di studiare non solo la struttura, ma anche la funzione e le variazioni (i rapporti tra acidi grassi) che vengono a determinarsi in diverse condizioni fisiopatologiche, mettendo in stretta relazione le componenti di membrana con lo stato nutrizionale del paziente e con le sue disfunzioni metaboliche (cambiamenti ormonali, insulino resistenza, obesità etc.) [1].

L'indagine sfrutta il ruolo di *pacemaker metabolico* della membrana cellulare, centro di regolazione di tutte le funzioni cellulari.

Negli ultimi anni, infatti, soprattutto la **lipidomica su membrana eritrocitaria** è risultata di notevole importanza, poiché ha permesso di ottenere degli indici molto robusti per individuare carenze alimentari, deficit nutrizionali, disfunzioni metaboliche.

Le motivazioni che hanno portato ad utilizzare la membrana eritrocitaria quale matrice report per stabilire determinati indici, sono molteplici:

- Riflette l'apporto dietetico a medio termine, con un valore più stabile di quello dei lipidi plasmatici, che fluttuano secondo l'apporto a breve termine.
- L'eritrocita maturo non può più biosintetizzare lipidi, perciò la sua composizione di membrana dipende anche dagli scambi che effettua con le lipoproteine circolanti.

- Avendo un'emivita di 120 giorni, gli eritrociti permettono di monitorare variazioni nella biosintesi o nell'apporto dietetico sulla composizione delle membrane, con prelievi a distanza di circa 4 mesi l'uno dall'altro [2].

Gli indici prevalentemente ottenuti mediante la lipidomica sono:

➤ ***Omega-3 Index su membrana eritrocitaria: (EPA + DHA)%***

Considerato uno dei principali biomarkers per le patologie cardiovascolari [3, 4] e recentemente correlato all'aumento di patologie oncologiche [5, 6]. L'indice è la somma dei PUFA ω -3 (DHA + EPA, gli omega-3 da pesce), e indica se l'apporto nutrizionale è deficitario, buono o ottimale secondo linee guida internazionali [2].

- < 4% rischio cardiovascolare
- 4-6% valore basso
- 6-8% valore buono
- > 8% valore ottimale

➤ ***Rapporto Omega-6/Omega-3 (e rapporto AA/EPA)***

È ad oggi il test più significativo per individuare la *persistenza di infiammazioni silenti* ed è uno dei principali markers utilizzati dal biochimico Barry Sears nella lotta all'infiammazione cronica [7].

Mentre il rapporto tra grassi saturi e insaturi va progressivamente migliorando all'interno della popolazione, il rapporto tra PUFA ω -6 e ω -3 (la cui proporzione ideale è tra 4:1 e 2:1) è attualmente così squilibrato che l'ultimo rapporto della FDA statunitense parla di un rapporto medio nella comune alimentazione di ben 25:1 (in Europa siamo attorno al 15:1) [1]. Individuare un rapporto AA/EPA molto alto nella membrana eritrocitaria sottolinea una cascata pro-infiammatoria che non viene neutralizzata dagli ω -3 anti-infiammatori.

- 5-6 zona di Berry Sears
- < 15 valore ottimale
- 15-30 popolazione italiana
- 30-50 rapporto pro-infiammatorio
- > 50 stati patologici

➤ ***Il pattern lipidico ottimale per longevità e invecchiamento***

Una ricerca italiana del 2008 che ha esaminato 41 discendenti (figli) di longevi del Cilento ha riscontrato come la membrana dell'eritrocita di questi individui presenti una quantità significativamente più elevata di acidi grassi mono-insaturi (MUFA) [8], a conferma che questi ultimi mantengono la fluidità dell'assetto lipidico, a differenza dei saturi, senza creare predisposizioni aberranti, che generano invecchiamento e stress ossidativo (l'eccesso di PUFA è un ottimo substrato per l'ossidazione della membrana durante l'invecchiamento).

Di recente è stato individuato come variazioni nei rapporti tra MUFA e SFA (gli acidi grassi che possono subire forti variazioni anche attraverso il metabolismo endogeno) siano la spia di squilibri metabolici come obesità e insulinoresistenza, e siano il risultato di alterazioni dell'equilibrio ormonale che possono portare allo sviluppo di neoplasie (come riportato da Berrino per il tumore al seno) [9].

➤ ***Il corretto contenuto di DHA***

Il DHA è un acido grasso ω -3, ed è il principale componente del cervello, tanto che nelle membrane nervose e sinapto-somali plasmatiche rappresenta circa il 35% della porzione acidica totale.

Proprio per questo, è essenziale per il corretto sviluppo neurale dei bambini, e più in generale per la plasticità sinaptica.

Evidenti sono le correlazioni tra deficit gravi di DHA eritrocitario con forme di autismo, cefalee croniche e stati depressivi con sbilanciamento serotoninergico [10, 11].

Le linee guida della SINU (Società Italiana Nutrizione Umana), individuano la Lipidomica Eritrocitaria quale marker indispensabile per individuare carenze di DHA nelle alimentazioni vegetariane e vegane non controllate, in quanto prive di fonti primarie (ω -3 da pesce) per l'assunzione degli Acidi Grassi Essenziali (AGE) ω -3 [12].

Valori di riferimento Ferreri et al.: 5-7%

Nella tabella in figura sono riportati gli intervalli di normalità dei principali acidi grassi della membrana eritrocitaria nella popolazione italiana, determinati mediante analisi della letteratura e dallo studio della popolazione italiana stessa [2].

Di seguito sono indicate le percentuali relative sul contenuto totale in acidi grassi.

FA residues	Acronym	Normal values
C16:0		17–27
C16:1- Δ 9		0.2–0.5
C18:0		13–20
C18:1- Δ 9		9–18
C18:1- Δ 11		0.7–1.3
C18:2- Δ 9,12	LA	9–16
C20:3- Δ 8,11,14	DGLA	1.9–2.4
C20:4- Δ 5,8,11,14	AA	13–17
C20:5- Δ 5,8,11,14,17	EPA	0.5–0.9
C22:6- Δ 4,7,10,13,16,19	DHA	5–7
Total saturated FA	SFA	30–45
Total MUFA	MUFA	13–23
Total PUFA	PUFA	28–39
SFA/MUFA		1.7–2
ω -6/ ω -3		3.5–5.5
Sum of mono-trans	TRANS	\leq 0.4

Figura 40

Acidi grassi e intervalli dell'indice nelle membrane fosfolipidiche eritrocitarie della popolazione italiana sana (percentuali relative rispetto al contenuto totale di acidi grassi).

AA: acido arachidonico; DGLA: acido diomo- γ -linolenico acid; DHA: acido docosoesaenoico; EPA: acido eicosapentaenoico; FA: acido grasso; MUFA: acido grasso monoinsaturo; PUFA: acido grasso polinsaturo; SFA: acido grasso saturo. [2]

4.2.2 Esempi di impiego della lipidomica

Si riportano di seguito alcuni rilevanti studi con focus sulla lipidomica eritrocitaria come analisi diagnostica nell'ambito della prevenzione di patologie cardiache. Un primo eminente esempio è il Framingham Heart Study (2018) [1], vasto studio osservazionale con lo scopo di determinare l'associazione tra il livello di acidi grassi (FA) ω -3 e il rischio di morte per qualsiasi causa o per incidenza di CVD, patologie cardiovascolari. Il marker misurato inizialmente nei soggetti è l'Omega-3 Index (che dà informazioni sui livelli eritrocitari degli ω -3 EPA e DHA, rappresentandola percentuale di EPA e DHA rispetto ai FA totali – *Paragrafo 4.2*). I risultati presi in considerazione comprendevano sia la mortalità generale sia il totale degli eventi CVD in partecipanti che non li avessero all'inizio dello studio o in precedenza. Tra i 2500 partecipanti, si sono registrati 350 morti e 245 eventi CVD, e un alto Omega-3 Index è risultato, in diversi modelli aggiustati per altre variabili, correlato a un minor rischio di morte totale e di morte non dovuta a eventi CVD né a cancro. Nello specifico, nei soggetti nel più alto quintile dell'Omega-3 Index,

rispetto a quelli nel più basso, si è individuato un rischio di mortalità totale del 34% più basso, e un rischio di eventi CVD inferiore del 39%. Negli stessi modelli, poi, l'Omega-3 Index è risultato significativamente correlato ai risultati, mentre il colesterolo totale (messo a confronto) no.

In un recente (2021) studio correlato [2], il Framingham Offspring Cohort, viene valutata la lipidomica eritrocitaria come indice predittivo di mortalità totale in una popolazione selezionata di sessantenni (2240), senza noti eventi CVD, sottoposti a misurazione della lipidomica eritrocitaria (RBC FA), con 11 anni di follow-up per misurazioni e test. Presupposto dello studio era che una buona percentuale di FA ω -3 a lunga catena associati ai globuli rossi (rispetto ai totali) risulta associata a un rischio ridotto di mortalità totale; l'obiettivo era invece di paragonare i livelli di acidi grassi eritrocitari con fattori di rischio standard per patologie cardiovascolari (CVD), e valutarne l'efficacia predittiva di mortalità.

Specificamente, si è valutata la correlazione di mortalità totale rispettivamente con 28 parametri FA, e con 8 fattori standard di rischio (età, sesso, colesterolo totale, colesterolo HDL, trattamenti per l'ipertensione, pressione sanguigna sistolica, tabagismo e diabete). Dai risultati si è evinto che 4 dei 28 parametri FA si sono riscontrati in più di 5 modelli come significativi indici predittivi di mortalità totale. Rilevante, è che in un modello aggiustato per età e sesso, il quadro di 4 parametri FA si è rivelato valido almeno quanto un modello contenente anche gli altri 6 parametri standard. Inoltre, un modello che preveda sia 4 parametri FA che tabagismo e diabete, è risultato avere validità statistica superiore sia ai soli parametri FA che al solo fumo + diabete.

In conclusione, lo studio su popolazione ha rivelato la validità dei patterns RBC FA come markers predittivi del rischio di mortalità, almeno parimenti agli altri fattori di rischio.

L'importanza del Framingham Heart Study è quindi da individuare sia nelle innovazioni relative ai fattori di rischio da considerare per le CVD, sia per il conseguente sviluppo di un "*Framingham Risk Score*", con una baseline di 8 fattori di rischio standard (sopracitati), integrati da biomarkers avanzati per un'ulteriore valutazione delle scelte quotidiane che si possono attuare/cambiare per prevenire morbilità e morte. Nello specifico, gli acidi grassi (FA) sono tra i biomarkers associati alla dieta, su cui quindi si può agire compiendo scelte alimentari - o di supplementazione - consapevoli e,

all'occorrenza, mirate. I FAs più chiaramente associati con una riduzione di rischio CVD sono gli ω -3 EPA e DHA.

Un altro importantissimo studio su popolazione incentrato sulla lipidomica arriva dal Canada [3,4]. Fin dagli anni 60 in America si è tentato di ottenere un campione rappresentativo di popolazione per asserirne lo stato nutrizionale (con il NHANES, National Health And Nutrition Examination Survey); anche il più recente Canadian Health Measures Survey raccoglie sistematicamente i dati sulla ricchezza della nutrizione e sulla salute di adulti canadesi. Ma in particolare, il Canada è il primo Paese a raccogliere – formalmente e a livello nazionale - tra i dati di popolazione anche l'*Omega-3 Index*, unitamente al rapporto EPA/AA. L'assunzione fatta è che un Ω -3 Index inferiore al 4% sia un indicatore di rischio discreto di eventi CVD fatali, mentre percentuali tra il 4 e l'8 e oltre l'8 individuano, rispettivamente, un rischio intermedio e uno basso. L'osservazione si propone di caratterizzare i sottogruppi con OI "indesiderabile" (< 4%), identificando le principali caratteristiche associate ai vari OI, e secondariamente studiare la stessa correlazione ratio-caratteristiche per il rapporto EPA/AA. In precedenza, anche nello stesso NHANES, si erano indagati solo le concentrazioni *plasmatiche* di ω -3, ma i livelli eritrocitari danno una stima più affidabile e completa, nel lungo corso (similmente all'emoglobina glicata rispetto alla sola glicemia, per lo stato glicemico a lungo termine). Sia dall'indagine canadese che da quella americana, è risultato che la popolazione media ha un Ω -3 Index che configura un rischio intermedio (4,5%), mentre in Canada il 95° percentile dell' ω -3 Index raggiunge il 7,26% ma non supera il 7,80%, confermando che molto meno del 5% della popolazione ha livelli che rientrino nel range desiderabile (>8%). Questo quadra peraltro con le prospettive a livello mondiale, che attestano come rarissimo un livello superiore all'8% in Paesi con diete a basso contenuto di pesce.

5. CONCLUSIONI

5.1 Modello di calcolo

Date le evidenze scientifiche finora disaminate, il seguente lavoro di revisione della letteratura propone un *modello di calcolo* predittivo del rischio cardio-metabolico che tenga conto di markers che possono dare un valore aggiunto al clinico nel fare prevenzione e diagnosi.

In base all'intervallo di punteggi associato ad ogni marker, e all'effettivo punteggio assegnato (individuato in base al valore), la sommatoria di tutti i punti andrà a individuare una precisa *fascia di rischio*.

Si propone l'associazione per "pannelli" – correlati ai sinergici profili di rischio - dei markers disaminati nei capitoli precedenti, in un foglio operativo Excel così costruito:

RISCHIO CARDIO METABOLICO										
Dati Anamnestici Raccolti										
Nome	Cognome	Età	fumo	iper-tensione	Familiarità					
					Patologie CAD (infarto, ictus etc.)	Patologie Degenerative	Diabete	Obesità		
										0 20 PUNTEGGIO MASSIMO

Figura 41
Pannello di familiarità e abitudini

Nel primo pannello si inseriscono dei punteggi in base sia alle abitudini individuali, sia alla familiarità con varie patologie – sia CAD che degenerative e croniche.

Questo con lo scopo di schematizzare la *predisposizione genetica* ed *epigenetica* del soggetto, al netto dei valori dei markers di rischio specifici indagati e risultanti dalle analisi.

Più il punteggio è alto più il quadro finale è favorevole/ottimale, ossia associato a un rischio minore; quindi si assegnano:

- i) -1 punti se il soggetto fuma o se soffre di ipertensione
- ii) -1 punti a seconda che abbia uno o entrambi i genitori, fratelli, che soffrono/hanno sofferto di patologie CAD/patologie degenerative/diabete/obesità

In caso il soggetto non fumi e non soffra d'ipertensione, 1 punto alle due voci; se non ha alcuna familiarità con le suddette patologie, 2 punti ad ogni parametro.

Il punteggio massimo associato a questo pannello è quindi di 10.

Profilo Lipidico misurato			
analita	valore		
APO-b (mg/dl)			
APO-a (mg/dl)			
Small-Dense LDL (sd-LDL, mmol/L)			
Lipoproteina a - Lpa (nmol/L)			
Colesterolo (mg/dl)			
HDL (mg/dl)			
Trigliceridi (mg/dl)			
LDL (mg/dl)			
		LIMITI	
Indici di aterogenicità predittivi		rischio moderato	rischio elevato
LDLox (U/L)		75 - 90	> 90
APO-b/APO-a1	#DIV/0!	< 0,90	
Lipid Tetrad Index (LTI)	#DIV/0!	2,42 - 4,82 (mediana 3,62)	
Lipid Pentad Index (LPI)	#DIV/0!	3,86 - 6,44 (mediana 5,15)	

RISCHIO LIPIDICO ATEROGENO					
		punteggio	APO-B	sd-LDL	Lipoproteina a
APO-B (mg/dl)	0		Ottimale < 120 (PUNTI 2)	< 1 (PUNTI 3)	< 50 (punti 2)
sd-LDL (mmol/L)	0		Critico 120 - 140 (PUNTI 1)	1.1 - 1.25 (PUNTI 1)	50 - 75 punti 1
Lpa (nmol/L)	0		Molto critico > 140 (PUNTI 0)	> 1.25 (PUNTO NEGATIVO)	> 75 (punti 0)
		0	0	14 PUNTEGGIO MASSIMO	

Figura 42
Profilo Lipidico aterogeno

A individuare un profilo lipidico potenzialmente aterogeno concorrono i valori dell'apolipoproteina-B (apo-B), delle sd-LDL e della lipoproteina (a).

Sono stati inseriti i valori delle sd-LDL (small dense-LDL) poiché i valori di quest'ultime sono correlati statisticamente ai valori di apo-B, LDL-C e ox-LDL, come attestato dal CNR di Roma (su n=150 pazienti), a verifica dell'attendibilità come marker aterogeno già descritta in letteratura, ma non confrontata contemporaneamente con tutti i valori di cui sopra (si veda l'analisi statistica nel paragrafo seguente).

Si assegnano i punteggi in base ai range segnati in tabella, e si moltiplica poi la somma dei punti ottenuti per il valore assegnato in precedenza nel pannello della familiarità alla voce "patologie CAD". Si configura quindi un punteggio massimo di 14 (7 punti x 2, valore massimo assegnato nel primo pannello) per questo profilo.

Valori di sd-LDL sopra il cut-off aterogeno sono considerati ad alto rischio cardiovascolare e verrà assegnato un punto negativo al conteggio finale.

Per confrontare questo punteggio con dei valori predittivi del rischio CAD presenti in letteratura, sono stati calcolati i valori del Lipid Tetrad Index (LTI) e del Lipid Pentad Index (LPI) [1] e del rapporto apo-B/apo-A frequentemente utilizzato in routine.

Questi due parametri legano fortemente i valori della Lpa con gli altri indici aterogeni lipemici (Colesterolo Totale, Colesterolo HDL, Trigliceridi per LTI e Apo-b, Apo-a, Colesterolo Totale, Trigliceridi per LPI).

Lipidomica eritrocitaria	
analita	valore
rapporto AA/EPA	
% Omega_3 Index	

INFLAMMAGING (indici di infiammazione cellulare)				
	punteggio	AA/EPA	% Omega_3 Index	Omocisteina
Rapporto AA/EPA	0,0	Ottimale < 6 (PUNTI 3)	> 8 (punti 3)	< 13 (punti 2)
% Omega_3 Index	0,0	Buono tra 7 e 15 (PUNTI 2)	6 - 8 (PUNTI 2)	
Omocisteina (umol/L)	0,0	Critico tra 15 e 30 (PUNTI 1)	4 - 6 (PUNTI 0)	13 - 16 (punti 1)
		Molto critico > 30 (PUNTI 0)	< 4 (PUNTO NEGATIVO)	> 16 (PUNTI 0)
		0	8 PUNTEGGIO MASSIMO	

Figura 43
Profilo di infiammazione cellulare

Per osservare invece lo stato di infiammazione e ossidazione cellulare (inflammaging), si propone di monitorare con la lipidomica eritrocitaria il rapporto AA/EPA e l'Omega-3 Index.

Un Omega_3 Index sotto al valore del 4% è stato accertato essere un rischio cardiovascolare elevato, che verrà considerato con un valore negativo di un punto nel conteggio finale.

L'altro marker analizzato e frequentemente utilizzato in routine è l'omocisteina [2]. L'iperomocisteinemia è uno dei fattori di rischio per l'insorgenza di malattie cardiovascolari, in quanto promuove l'aterosclerosi e l'instaurarsi di uno stato pro-infiammatorio, che favorisce lo sviluppo di trombosi, infarto e ictus ischemico. L'alimentazione gioca, anche in questo caso, un ruolo importante, infatti è stato osservato che la carenza di alcune vitamine del gruppo B, coinvolte nel metabolismo

dell'omocisteina, è correlata all'aumento della concentrazione plasmatica di questa sostanza. Un adeguato apporto di tali nutrienti, associato a un corretto stile di vita, è in grado di mantenere i livelli ematici di omocisteina sotto controllo.

L'aumento della concentrazione plasmatica di omocisteina è collegato a maggior rischio di malattie cardiovascolari, in quanto:

- i) Promuove l'aggregazione piastrinica e la riduzione della produzione di ossido nitrico, importante regolatore del tono vascolare;
- ii) Favorisce lo stress ossidativo, in quanto determina l'aumento di specie reattive dell'ossigeno (ROS) le quali non solo danneggiano DNA, proteine, carboidrati e lipidi, ma contribuiscono anche all'ossidazione delle lipoproteine deputate al trasporto dei lipidi nel sangue, processo che si è visto essere alla base dello sviluppo dell'aterosclerosi;
- iii) Blocca gli enzimi coinvolti in reazioni di transulfurazione, provocando la deplezione di H₂S, anch'esso un mediatore importante nell'omeostasi endoteliale e nell'inibizione dell'aterogenesi;
- iv) Provoca l'errata incorporazione dell'omocisteina nelle proteine, generando complessi tossici, come l'omocisteina-tiolattone, in grado di interferire con la coagulazione del sangue e con vie di segnalazione biochimiche, ad esempio nella risposta all'insulina;
- v) Determina l'accumulo di S-adenosilhomocisteina, un inibitore di metiltransferasi che causa ipometilazione e di conseguenza alterazione di reazioni importanti per l'omeostasi vascolare.

Tutti questi fattori compromettono la funzione endoteliale, promuovendo lo sviluppo di uno stato pro-infiammatorio e pro-trombotico, con conseguente aumento del rischio di infarto, ictus ischemico, trombosi ed embolia polmonare.

Nel foglio operativo, per questo pannello si associano i punteggi in base ai range indicati in tabella.

Non dovendolo moltiplicare per alcun indicatore nel primo pannello, il punteggio massimo configurato è di 8.

Perdita di metilazione - aging			
analita		valore	
Omocisteina (umol/L)			
d-ROMs (U.C.)			

AZIONE OSSIDANTE			
d-ROMs (U.C.)	0	punteggio	d-ROMs
		ottimale	< 320 (PUNTI 4)
		lieve	321 - 360 (PUNTI 3)
		medio	361 - 399 (PUNTI 2)
		forte stress	400 - 500 (PUNTI 0)
		PATOLOGICO	> 500 (due punti negativi)
	0	0	8 PUNTEGGIO MASSIMO

Figura 44
Profilo ossidativo

Per inquadrare lo stato ossidativo (cioè l'aging cellulare) del soggetto, il valore di cui tenere conto è quello dei *d-ROMs*.

Si tratta di un test quantitativo, rapido e utilizzato in numerosi trials clinici per determinare il danno ossidativo (produzione dei *lipoperossidi*) subito dalle membrane cellulari ad opera dei *ROMs* (Reactive-Oxygen-Metabolites).

Il test è altamente riproducibile rispetto ad altri markers utilizzati in fase di ricerca (MDA, Isoprostani urinari in metodica ELISA) con limiti di riferimento definiti dall'Osservatorio Italiano sullo Stress Ossidativo ed espressi in Unità Carratelli (UC).

In una recente Review sono stati proposti tutti i trials clinici che hanno correlato eventi CAD con i valori di *d-ROMs* [3].

Dalla letteratura e dai database presenti in Laboratorio assumiamo: i) valori critici sopra il cut-off di 400 U.C. con 0 punti assegnati nel conteggio finale ii) valori ad alto rischio cardiometabolico con cut-off sopra 500 U.C. con un valore negativo di due punti assegnato nel punteggio finale.

Chapter	References	Hazard Ratio (HR), Odds Ratio (OR) or Risk Ratio (RR) (Confidence Interval 95%)	Event	Population Size	d-ROM Cut-Off (UCARR)
d-ROM prognostic value in small cohorts of individuals with known CVD	Masaki et al., 2016 [77]	(HR) 3.755 (1.108–12.730), $p = 0.034$	CVD events	265	395
	Hirata et al., 2015 [78]	(HR) 10.8 (2.76–42.4), $p = 0.001$	CVD events	395	346
	Vassalle et al., 2006 [80]	(OR) 8.6 (1.5–50.2), $p = 0.016$	Cardiac death	166	482
	Vassalle et al., 2012 [79]	(HR) 3.9 (1.4–11.1), $p < 0.01$	Cardiac death, MACEs, all-cause death	93	481
	Hirata et al., 2015 [81]	(HR) 14.3 (4.19–49.1), $p < 0.001$	CVD events	287	346
	Nishihara et al., 2021 [84]	(HR) 1.01 (1.001–1.009), $p = 0.02$	CVD events and HF-related events	201	353
	Hitsumoto et al., 2018 [82]	(HR) 2.35 (1.37–4.43), $p < 0.01$	Heart failure hospitalisation	428	319
d-ROM prognostic value in general population-based cohorts	Xuan et al., 2019 [96]	(OR) 2.04 (1.23, 3.37), $p < 0.05$	Myocardial infarction (MI)	2856	500
		(OR) 5.08 (1.78, 14.49), $p < 0.05$	fatal MI		500
		(OR) 1.21 (1.05–1.40), $p < 0.05$	MI odds ratio for 100 UCARR increase		-
		(OR) 1.17 (1.01–1.35), $p < 0.05$	Stroke odds ratio for 100 UCARR increase		-
	Schöttker et al., 2015 [97]	(HR) 1.63 (1.01, 2.63), $p < 0.05$	All-cause death	2932	381
		(HR) 1.33 (1.04, 1.70), $p < 0.05$	All-cause death per 100 UCARR increase		-
	Schöttker et al., 2015 [68]	(RR) 1.32 (1.10–1.59), $p < 0.05$	All-cause mortality	10,012	401–500
		(RR) 2.30 (1.40–3.77), $p < 0.05$			>500
		(RR) 1.49 (1.04–2.13), $p < 0.05$	Cardiovascular mortality		401–500
		(RR) 4.34 (2.06–9.15), $p < 0.05$			>500
	Xuan et al., 2019 [98]	(HR) 1.67 (1.05–2.67), $p < 0.05$	All-cause mortality	1029 *	368
		(HR) 2.49 (1.74–3.55), $p < 0.05$		1096 **	450
		(HR §) 2.50 (1.86–3.36), $p < 0.05$	All-cause mortality	2125 ***	-
(HR §) 1.65 (1.07–2.54), $p < 0.05$		MCE #	-		

* ESTHER cohort; ** DIANA cohort; *** meta-analysis, § HR is provided for the d-ROM/TTL ratio top tertile; # MCE (myocardial infarction, stroke, and cardiovascular mortality).

Figura 45

Elenco degli studi che valutano i valori d-ROM e il rischio di eventi CVD e mortalità in soggetti con CVD nota. [3]

La somma dei punti assegnati va moltiplicata stavolta per il valore indicato nel pannello della familiarità alla voce “patologie degenerative”. Quindi il punteggio massimo per questo profilo è di 8 punti (4 x 2, punteggio massimo assegnato nel primo pannello).

Glicemia - Insulinemia basale					
analita			valore		
Glicemia (mg/dl)					
Insulinemia (uU/ml)					
Homa Index			0,00		

INSULINO RESISTENZA					
		punteggio		Trigliceridi/HDL	Homa Index
Trigliceridi/HDL	#DIV/0!		Ottimale	< 1 (punti 3)	0.23 - 2.5
Homa Index	0,00		Buono	1 - 2 (PUNTI 2)	
			Critico	2-3 (PUNTI 1)	2.5 - 2.7 (1 punto negativo)
			Sindrome Metabolica	3 - 4 (PUNTI 0)	> 2.7 (tre punti negativi)
			Alto Inflammaging	> 4 (PUNTO NEGATIVO)	
		0	0	6 PUNTEGGIO MASSIMO	

Figura 46
Profilo di insulino-resistenza

Nella valutazione dell'insulino-resistenza, si monitorano i valori del *rapporto tra trigliceridi e HDL (TG/HDL)* insieme all'*Homa Index*.

L'insulino-resistenza sembra possedere un ruolo centrale nella genesi della sindrome metabolica e l'iperinsulinemia (che ne deriva) è risultata un fattore di rischio indipendente per cardiopatia ischemica; contribuisce all'esordio precoce del diabete, nonché alla sua progressione, e concorre alla comparsa delle numerose altre condizioni patologiche associate che si traducono in fattori di rischio cardiovascolare.

Per insulino-resistenza – come descritto in precedenza - si intende una condizione nella quale quantità fisiologiche di insulina producono una risposta biologica ridotta, con riduzione dell'azione precoce dell'insulina sul controllo glucidico dopo il pasto, associata a una inadeguata soppressione insulinica durante il digiuno notturno, in presenza di una sintesi conservata. Ne segue la contemporanea presenza di insulino-resistenza e iperinsulinemia, verificabile con il riscontro di elevate concentrazioni di insulina a digiuno e post-prandiali.

Le principali dislipidemie che abbiamo analizzato in questa Tesi (sd-LDL, apo-B, ipertrigliceridemia, e Lipoproteine Remnants) sono correlabili a segnali di Sindrome Metabolica.

Uno strumento ampiamente utilizzato per stimare la sensibilità all'insulina è il modello di valutazione omeostatico (homeostasis model assessment, *HOMA*), calcolato utilizzando la glicemia a digiuno e i livelli d'insulina a digiuno [4].

Tatjana Rundek, insieme con i colleghi della Miller School of Medicine dell'Università di Miami, ha valutato, utilizzando l'indice HOMA, l'insulino-resistenza di 1509 soggetti non diabetici che hanno partecipato al Northern Manhattan Study.

Una ricerca diretta all'osservazione dei diversi livelli di rischio, di incidenza e di prognosi dell'ictus in una comunità urbana multietnica [5].

Durante il periodo di follow-up, durato otto anni e mezzo, gli eventi cardiovascolari si sono verificati in 180 partecipanti, dei quali 46 hanno avuto ictus ischemici fatali o non fatali, 45 hanno avuto infarti miocardici fatali o non fatali e 121 sono morti di cause cardiovascolari.

I soggetti compresi nel primo quartile dell'indice HOMA avevano un rischio aumentato del 45 per cento rispetto al basale.

L'associazione tra insulino-resistenza e rischio cardiovascolare è rimasta statisticamente significativa anche una volta che sono stati normalizzati per gli altri fattori di rischio – glicemia, obesità e sindrome metabolica. Inoltre, la relazione è apparsa più forte negli uomini che nelle donne e non varia in modo significativo tra i diversi gruppi etnici.

Pertanto un valore riscontrato di Insulino Resistenza nel profilo di rischio cardiometabolico proposto ha un valore negativo di -3 punti nel punteggio finale.

Nel foglio di lavoro, la somma dei punti assegnati per questo pannello è da moltiplicare per il fattore di rischio di diabete di tipo 2, quindi con il valore inserito nel pannello della familiarità alla voce “diabete”. Il punteggio massimo assegnato è perciò di 6 punti (3 x 2, punteggio massimo assegnato nel primo pannello).

RISCHIO CARDIO-METABOLICO ELEVATISSIMO	PUNTEGGIO 0 o NEGATIVO - 10		
RISCHIO CARDIO-METABOLICO ELEVATO	PUNTEGGIO 10 - 19		
RISCHIO CARDIO-METABOLICO MEDIO	PUNTEGGIO 20-29	Totale	<input type="text"/>
RISCHIO CARDIO-METABOLICO BASSO	PUNTEGGIO 30 - 40		
RISCHIO CARDIO-METABOLICO MOLTO BASSO	PUNTEGGIO 41 - 44		

Figura 47
Punteggio totale e fasce di rischio

Il valore risultante dalla sommatoria di tutti i punti assegnati ai vari parametri, va a individuare una specifica fascia di rischio cardio-metabolico “totale”, risultante cioè dalla correlazione di tutti i pannelli.

Quindi, in realtà, il modello di calcolo non solo fornisce un indice generale del rischio - indicato dalla specifica fascia risultante - ma permette anche di individuare le eventuali criticità dei singoli pannelli, consentendo un intervento mirato a migliorare i soli profili alterati, sia con misure più blande (agendo per esempio sulla nutrizione e lo stile di vita, o ricorrendo all’integrazione) sia più marcate (prescrivendo terapie e farmaci, e misure più impattanti).

5.2 Studio osservazionale

Il presente elaborato, come anticipato nel *paragrafo 2.1*, è quindi il risultato di un lavoro di ricerca e selezione di tutti gli articoli riportati in bibliografia, che concorrono a spiegare la proposta di prendere in analisi markers più approfonditi e affidabili di quelli attualmente indagati con gli esami di routine, in particolare relativamente a quadri clinici inquadrati – o inquadrabili – a rischio cardiovascolare.

Unitamente al lavoro di elaborazione teorica, si è svolto su pazienti uno studio osservazionale in collaborazione con il dottor Antonio Fusco, cardiologo da anni attivo nell’ambito della prevenzione cardiovascolare che si è occupato di raccogliere adesioni tra pazienti sia in cura da lui stesso, sia ambulatoriali ospedalizzati in seguito a eventi cardiovascolari. Questo con l’obiettivo di fornire un campione abbastanza consistente (n = 57) ed eterogeneo di popolazione.

L’obiettivo finale è quello di fornire di una visione d’insieme che tenga conto della nutrizione, l’attività fisica e lo stile di vita generale, del paziente, con interventi mirati anche a questi ambiti, affiancati eventualmente da integrazione e terapie farmacologiche mirate e specifiche per il singolo individuo. Un approccio quindi che tenga conto

inderogabilmente sia della predisposizione genetica sia della condizione epigenetica del soggetto.

Obiettivo invece dello studio su pazienti era quello di confermare la validità e il vantaggio degli indici proposti e analizzati nel lavoro di tesi (ponendo in particolare l'accento sull'innovativo calcolo delle small dense-LDL), confrontando i risultati ottenuti compilando per ognuno il foglio operativo, con le condizioni patologiche/non patologiche effettivamente note.

Ne è risultato un quadro coerente e più approfondito rispetto alle condizioni di partenza.

5.3 Risultati e grafici statistici

In base ai dati raccolti, si è voluto poi mettere in risalto la correlazione quasi lineare tra il valore delle small dense-LDL e quello di apo-B e delle LDL-ossidate, confermando la validità delle sd-LDL come indice predittivo di rischio cardiovascolare, almeno al pari degli altri, e con il vantaggio di essere una misurazione ancora più precoce, che fornisce un'indicazione molto più precisa e specifica.

Infatti, il calcolo del solo colesterolo associato alle LDL (LDL-C) non tiene conto della distinzione tra la frazione di LDL ossidate e quelle invece non danneggiate, che abbiamo già sottolineato essere coinvolte in importanti meccanismi dell'immunità; è quindi un parametro insufficiente per predire il rischio.

Il calcolo delle apo-B è anch'esso incompleto, se non combinato alla valutazione delle ox-LDL, in quanto restituisce un'immagine troppo generale della situazione, indicando il numero totale di tutte le lipoproteine a bassa densità trasportanti lipidi (danneggiate e non, ricche e povere in trigliceridi o colesterolo, etc).

E anche qualora combinati i valori di apo-B e ox-LDL, il valore che si andrà a inquadrare, per quanto utile e indicativo, sarà della porzione di LDL che ha già subito danno da ossidazione, potenzialmente già contribuendo/avendo contribuito al processo aterogeno e lasciando meno margine di azione.

Il vantaggio dell'indagine delle small dense-LDL è da individuare non solo nella completezza dell'informazione fornita, ma anche nel fatto che è uno step precedente al fenomeno dell'ossidazione, individuando la componente delle LDL che potrebbe essere

suscettibile al danno e quindi coinvolta nella patogenesi, e permettendo una prevenzione ancora più precoce e tempestiva, e un intervento mirato.

Di seguito, in **figura 48, 49 e 50** si riportano i grafici costruiti correlando i valori raccolti di sd-LDL, apo-B, ox-LDL e LDL-C dal campione di 57 pazienti preso in osservazione.

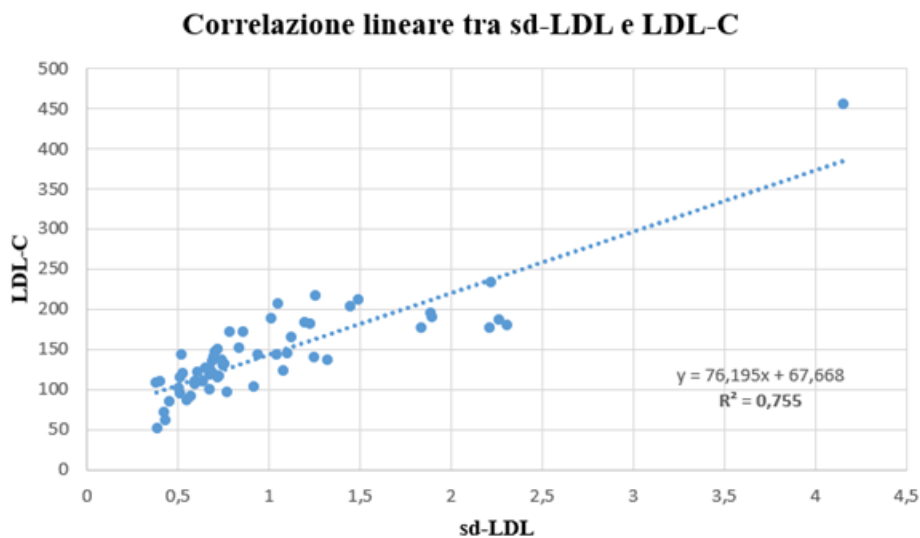


Figura 48

Correlazione tra le small dense LDL e il colesterolo associato a particelle LDL

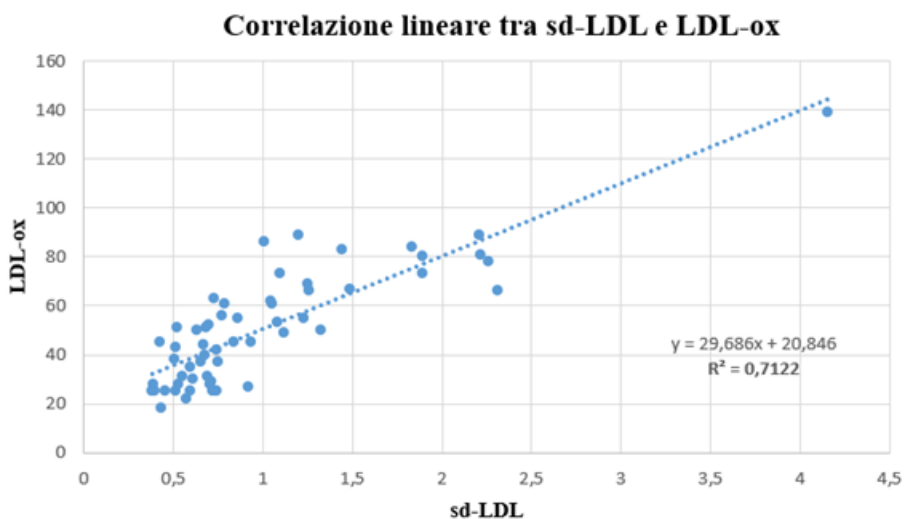


Figura 49

Correlazione tra le small dense LDL e la frazione ossidata delle LDL

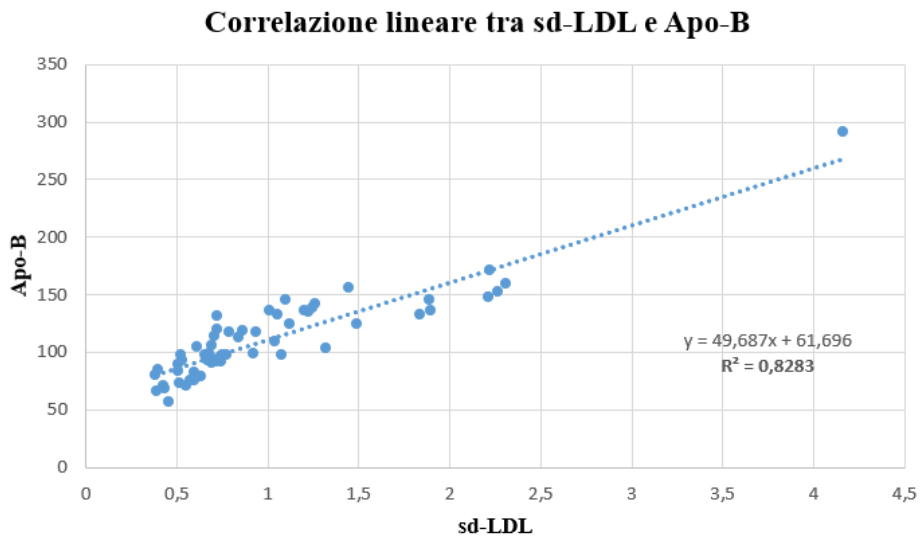


Figura 50
Correlazione tra le small dense LDL e apo-B

Si riportano di seguito anche i grafici con le distribuzioni dei valori risultanti dalle analisi chiave di ogni paziente, con relative leggende per fornire una panoramica sulle criticità dei singoli markers.

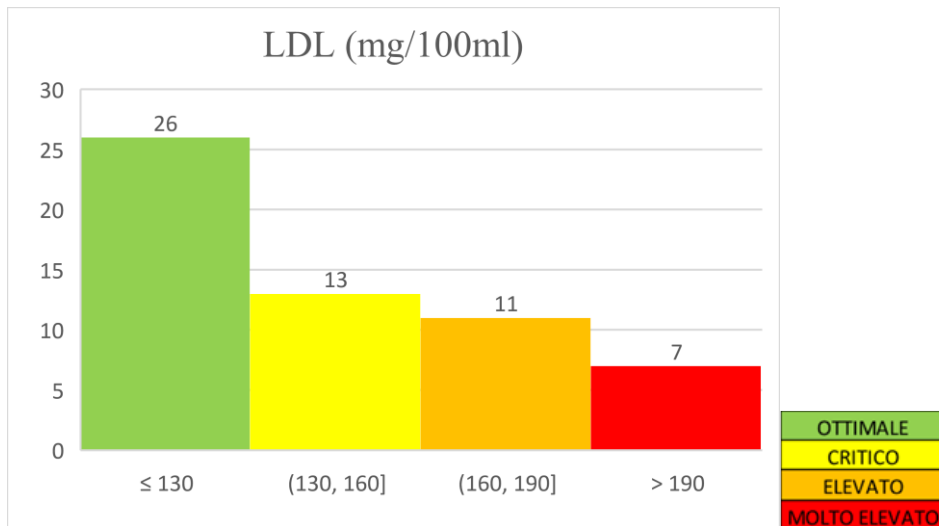


Figura 51
Distribuzione dei valori rilevati delle LDL

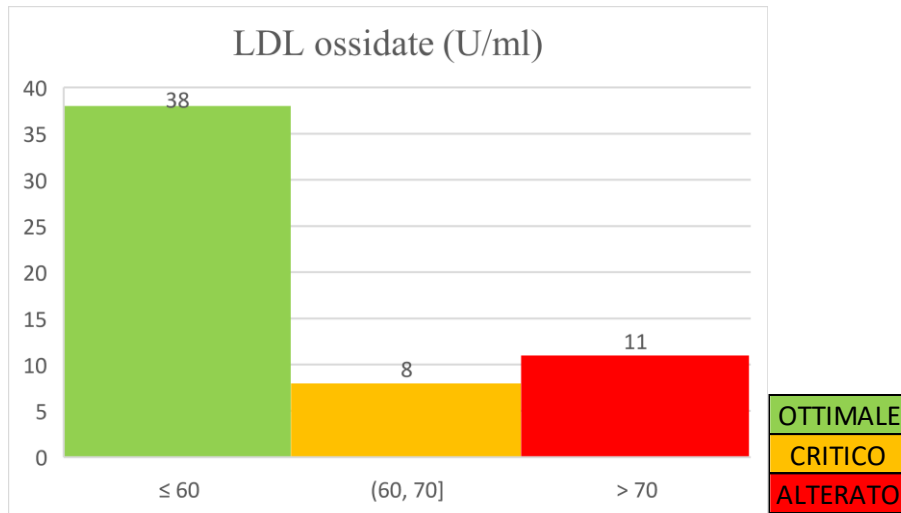


Figura 52
Distribuzione dei valori rilevati delle LDL ossidate (ox-LDL)

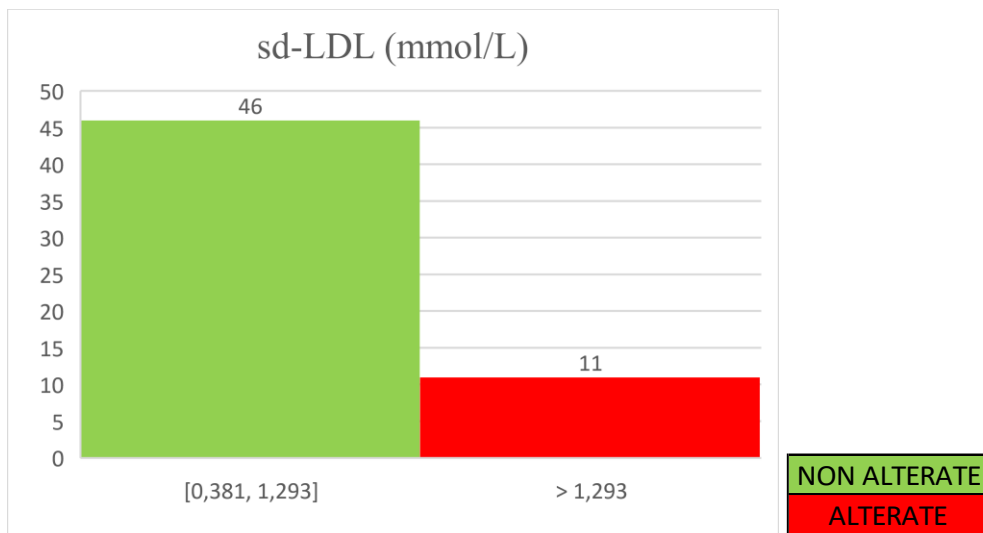


Figura 53
Distribuzione dei valori rilevati delle LDL piccole e dense (sd-LDL)

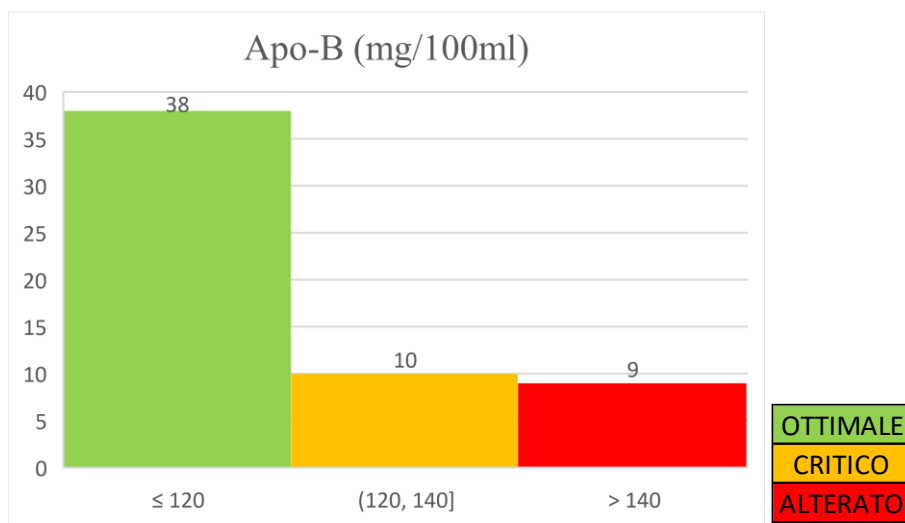


Figura 54
Distribuzione dei valori rilevati di apo-B

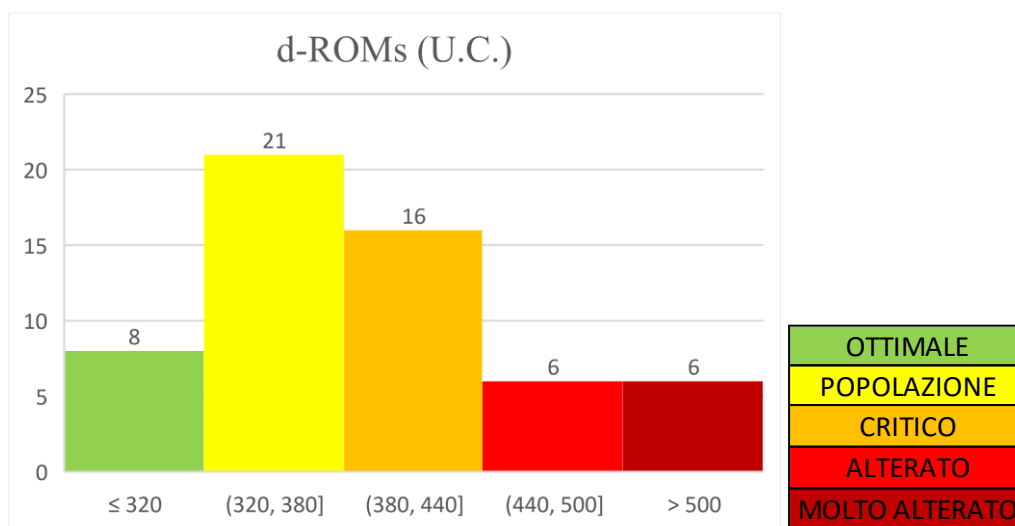


Figura 55
Distribuzione dei valori rilevati dei d-ROMs

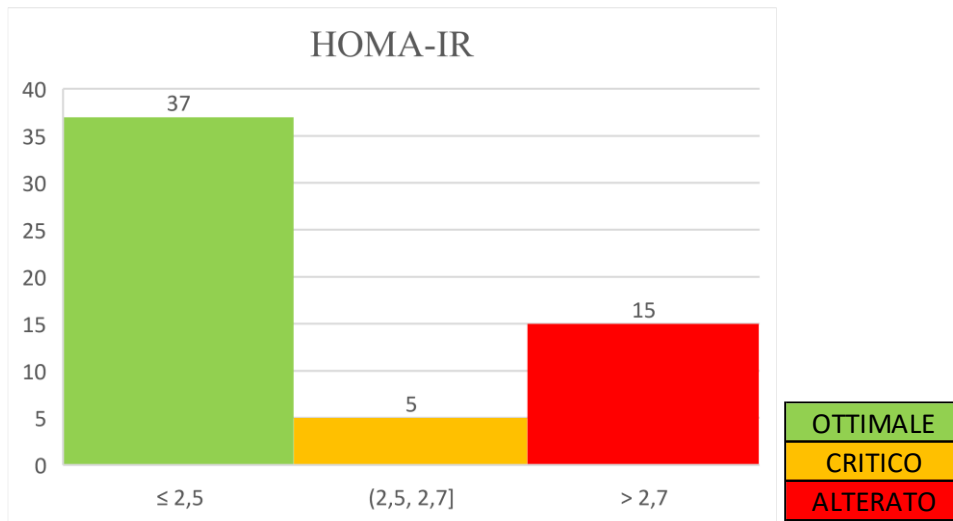


Figura 56
Distribuzione dei valori rilevati dell'Homa Index

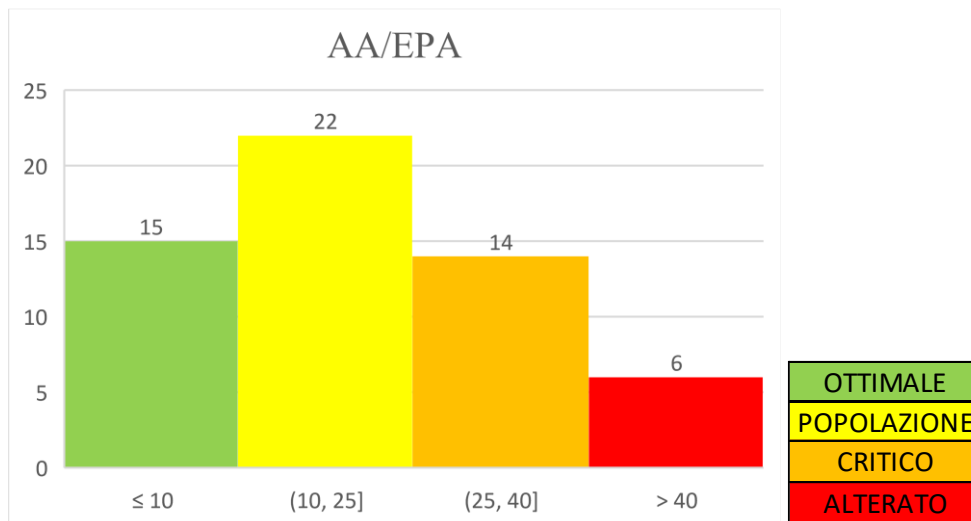


Figura 57
Distribuzione dei valori rilevati del rapporto AA/EPA

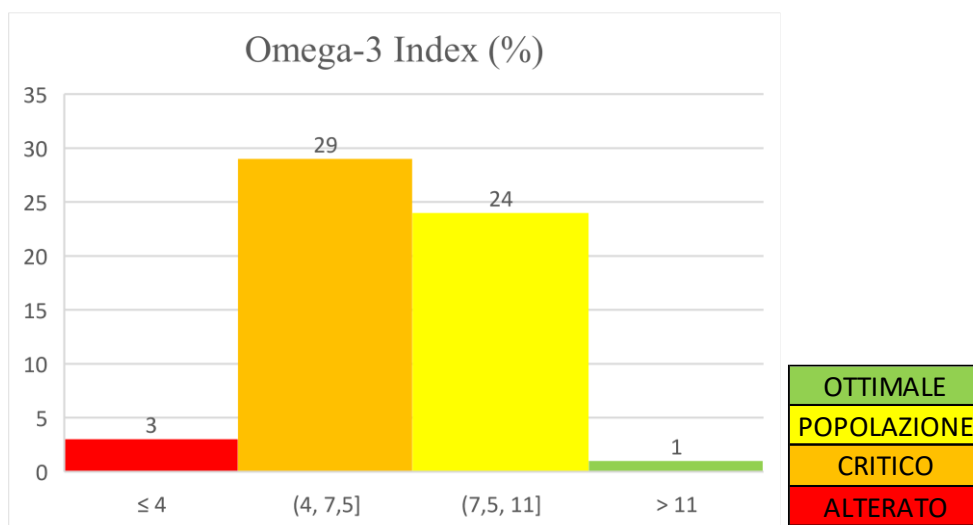


Figura 58
Distribuzione dei valori rilevati dell'Omega-3 Index

Infine, si riporta la distribuzione delle fasce di rischio individuate compilando per ogni paziente il modello di calcolo proposto. Di ognuna è indicato il numero di pazienti che vi rientrano.

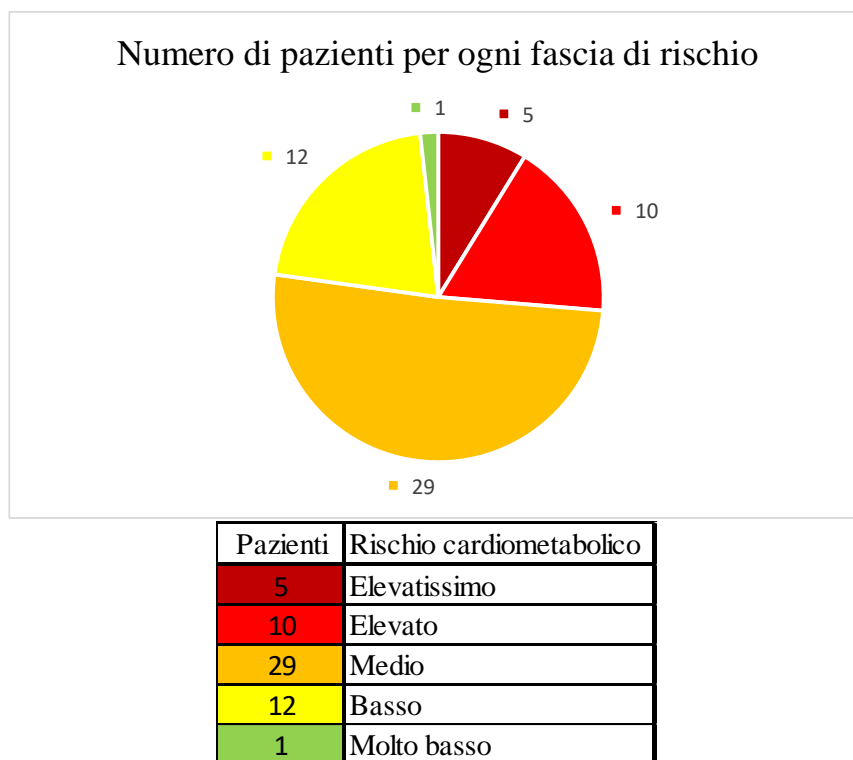


Figura 59
Fasce di rischio individuate nella popolazione in esame

5.4 Un significato clinico osservazionale alle sd-LDL

Prendendo in riferimento un numero di pazienti pari a n=57 in Tabella vengono presentati i valori di sd-LDL vs le LDL-c, considerando un cut-off di 1.293 mmol/L per le prime e i limiti di riferimento accettati dalle linee guida europee 2021 per i valori di LDL-c.

	n°pazienti	n° pazienti con sd-LDL alterate	% sd-LDL alterate
LDL CRITICHE	12	1	8,3
LDL ELEVATE	11	5	45,5
LDL MOLTO ELEVATE	7	5	71,4
LDL NON ALTERATE	27	0	0

Da questo primo dato osservazionale si può trarre degli spunti di dibattito clinico interessanti:

- i) Nessun paziente con LDL ottimali aveva sd-LDL aterogene
- ii) Con valori molto elevati di LDL più del 70% dei pazienti avevano sd-LDL alterate.

Questi dati preliminari senza valenza statistica ci danno una conferma: se il paziente si trova in zona verde o rossa, potrebbe essere poco utile andare a misurare qualcosa in più. La partita importante sulla prevenzione del rischio cardiovascolare lipemico si gioca invece con valori di LDL-c compresi tra elevati e critici: in questo range è FONDAMENTALE andare a misurare i valori di sd-LDL per inquadrare il paziente in un rischio marcato o meno marcato. Consideriamo un valore di LDL-c pari a 161 mg/dl, cioè il 70 % dei pazienti arrivati in laboratorio nel Trimestre 2023: un paziente con questo valore ha circa il 50% di probabilità di avere cut-off aterogeni di sd-LDL.

5.5 Analisi statistica dei dati presso il CNR di ROMA

L'analisi statistica è stata condotta in collaborazione con il Dr Luca Bastiani matematico del CNR di ROMA e il Dr. Attilio Cavezzi responsabile medico scientifico del Poliambulatorio Venalinfia di San Benedetto del Tronto (AP).

Sono stati analizzati 84 pazienti in forma anonima. I risultati sono stati forniti dal Dr Fusco, dirigente medico dell'Ospedale Pederzoli di Verona

Il 67.9% dei pazienti furono maschi (femmine 32.1%) con una età media di 54.35 anni in un range tra 47.5 a 61 (Vedi Tabella sotto). Il 14% dei pazienti erano fumatori (10.5% femmine, 15.8% maschi), mentre il 10.5% di entrambi i sessi erano in terapia con statine per terapie ipo-colesterolemizzanti.

Tabella 1: caratteristiche del campione e markers predittivi cardiometabolici presi in esame (dati in sottomissione per pubblicazione).

	Female		Male		P-value	Total	
	Mean sd	Median IQR	Mean	Median IQR		Mean	Median
Age	53,66 (12,0)	53 (45-62)	54,68 (11,6)	56 (49-59)	0,742	54,35 (11,68)	56 (47,5-61)
BMI (Kg/m2)	22,34 (2,47)	21,48 (21,08-23,23)	25,14 (3,45)	24,33 (22,79-26,42)	0,006	24,24 (3,42)	23,52 (21,48-24,93)
sd-LDL (mmol/L)	0,88 (0,70)	0,74 (0,55-0,789)	0,99 (0,56)	0,771 (0,57-1,08)	0,455	0,958 (0,61)	0,747 (0,55-1,01)
Colesterolo (mg/100)	237,3 (77)	225 (195-237)	216,49 (51)	220 (181-231)	0,357	223,17 (61)	221 (186,5-234)
LDL (mg/100ml)	148,7 (72)	130 (111-137)	137,45 (47)	140 (100-150)	0,551	141,07 (56)	136,5 (107-150)
LDLossidate (U/ml)	52,55 (24)	50 (37-57)	54,03 (24)	54 (31-61)	0,984	53,55 (24)	52,5 (33-58)
APO-B (mg/100ml)	109,14 (42)	97 (89-101)	109,4 (30)	106(82-124)	0,881	109,32 (34)	100,5 (84,5-120)
d-ROMs (U.C.)	443,55 (76)	439 (396-475)	374,32 (67)	360 (329-399)	0,000	396,57 (77)	390,5 (342-421)
HOMA-IR	1,85 (0,84)	1,76 (1,08-2,17)	2,46 (1,71)	2,04 (1,34-2,6)	0,112	2,265 (1,50)	1,91 (1,22-2,39)
AA/EPA	22,65 (13,5)	19,7 (10,5-22,6)	20,07 (14,2)	15,6 (8,2-22)	0,273	20,9 (13,9)	17,85 (8,95-23,3)
Omega 3 Index (%)	6,96 (1,7)	7,2 (6,1-7,7)	7,32 (2)	7,1 (6-8,1)	0,713	7,21 (1,9)	7,1 (6,05-7,8)

Le sd-LDL sono state correlate a tutti gli altri parametri coinvolti nella tabella precedente. Le sd-LDL furono altamente correlate con le LDL (Pearson 0.838; P-value <0.0001), LDLossidate (Pearson 0.797; P-value <0.0001), APO-B (Pearson 0.897; P-value <0.0001), cholesterol (Pearson 0.840; P-value <0.0001) and HOMA-IR (Pearson 0.411; P-value <0.001). Le sd-LDL appaiono debolmente correlate con BMI (Pearson 0.278; P-value 0.042), mentre non abbiamo nessuna correlazione con d-ROMs (Pearson 0.030; P-value 0.822), AA/EPA (Pearson 0.012; P-value 0.928) and Omega_ 3 Index (Pearson 0.049; P-value 0.717).

Nel modello di regressione multipla lineare (vedi Tabella sotto) viene registrata una correlazione significativa tra sd-LDL e LDL-c, LDLox , APO-b e HOMA-I. In particolare aggiustando i dati per sesso, età e BMI, incrementi di LDL (B 0,004: p-value 0,011), LDL ossidate (B 0,007: p-value 0,001), APO-B (B 0,006: p-value 0,048) and HOMA-IR (B 0,089: p-value 0,000) corrispondono ad incrementi di sd-LDL.

Table 2: modello di regressione multipla lineare aggiustata per età, sesso e BMI: relazione tra sd-LDL e biomarkers di rischio cardiovascolare.

	Unstandardized Coefficients B	95,0% Confidence Interval for B		P-value
(Constant)	-0,463	-0,951	0,024	0,062
Age	-0,004	-0,009	0,001	0,111
Gender	0,124	0,004	0,244	0,044
BMI (Kg/m2)	-0,007	-0,026	0,012	0,472
LDL (mg/100ml)	0,004	0,001	0,007	0,011
LDLossidate (U/ml)	0,007	0,003	0,010	0,001
APO-B (mg/100ml)	0,006	0,000	0,011	0,048
HOMA-IR	0,089	0,046	0,131	0,000

Dependent Variable: sd-LDL (mmol/L)

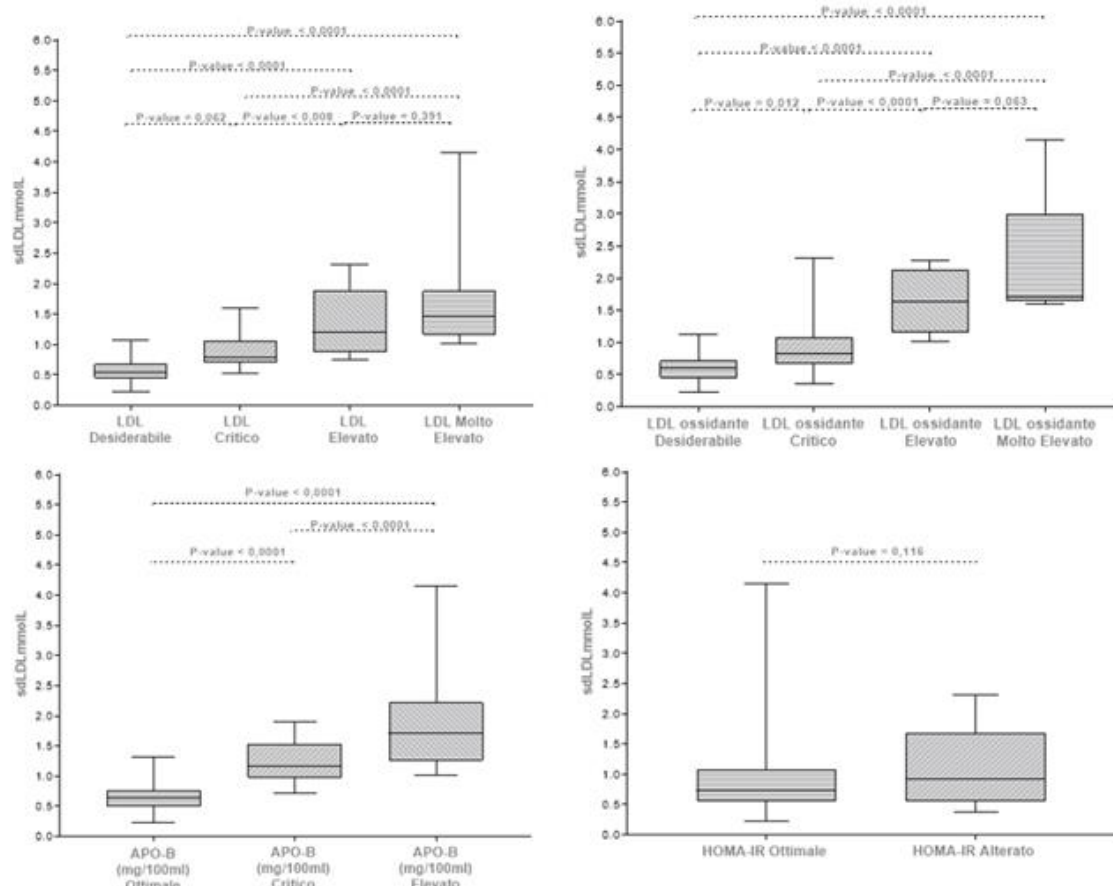
In definitiva il modello finale (sia quello senza correzione che quello con correzioni sesso età e BMI) mette in evidenza una relazione significativa tra la nostra variabile in studio e le covariate LDL (mg/100ml), APO-B (mg/100ml), LDLox (U/ml), HOMA-IR.

Inoltre si è visto come tenendo le sd-LDL come variabile Gold Standard principale la sua media aumenta o diminuisce nel passaggio da una categoria ad un'altra nei rispettivi biomarkers clinici presi in esame. Facciamo l'esempio del colesterolo LDL-c: nei valori desiderabili abbiamo un valore medio di sd-LDL di 0.550 mmol/L, nei valori critici abbiamo un valore medio di sd-LDL di 0.797 e di 1.200 e 1.469 in quelli elevati e molto elevati rispettivamente. Nella Tabella e Figura successiva vediamo il trend delle sd-LDL per le classi di riferimento delle LDLox e APO-b. Per le altre classi in studio (HOMA-I, AA/EPA, Omega_3 Index, d-ROMs) non abbiamo nessuna differenza statistica nelle mediane di sd-LDL.

sdLDLmmolL mean, sd, median and IQR in the laboratory atherosclerosis blood biomarkers classes

		Mean	Standard Deviation	Median	IQR
BMI classes	Underweight	0,754	0,015	0,746	0,745 0,771
	Normal weight	0,877	0,586	0,714	0,540 1,052
	Overweight	1,143	0,667	1,026	0,548 1,833
	Class I obese	1,159	0,673	0,942	0,677 1,714
	Class II obese	0,569	0,249	0,569	0,569 0,569
	Class III obese	-	-	-	-
LDLmg100ml classes	Desirable	0,578	0,182	0,550	0,447 0,677
	Critical	0,903	0,277	0,797	0,708 1,043
	High	1,407	0,568	1,200	0,871 1,895
	Very High	1,721	0,851	1,469	1,196 1,863
LDL Ossidante classes	Desirable	0,605	0,188	0,593	0,458 0,716
	Critical	0,918	0,384	0,832	0,685 1,080
	High	1,637	0,471	1,641	1,167 2,054
	Very High	2,196	1,100	1,714	1,670 1,833
APOBmg classes	Optimal	0,651	0,215	0,636	0,499 0,753
	Critical	1,225	0,375	1,161	1,011 1,491
	Altered	1,840	0,781	1,714	1,258 2,220
dROMs classes	Optimal	0,777	0,509	0,672	0,499 0,871
	Population	0,985	0,558	0,750	0,535 1,295
	Critical	0,970	0,473	0,803	0,614 1,286
	Altered	1,034	0,733	0,797	0,609 1,133
	Very Altered	0,898	0,611	0,652	0,508 1,200
HOMAIR classes	Optimal	0,885	0,579	0,735	0,552 1,070
	Altered	1,107	0,649	0,930	0,562 1,660
AAEPA classes	Optimal	1,042	0,755	0,748	0,575 1,249
	Population	0,881	0,464	0,725	0,548 1,086
	Critical	0,925	0,581	0,695	0,499 1,322
	Altered	0,922	0,439	1,029	0,463 1,226
Omega3 index classes	Optimum	1,081	0,793	0,797	0,584 1,370
	Population	0,820	0,450	0,718	0,520 0,930
	Critical	1,025	0,561	1,036	0,513 1,322
	Altered	1,169	0,126	1,169	1,080 1,258

Figure 2: sdLDLmmolL box plot in the laboratory atherosclerosis blood biomarkers classes



Eseguendo una ROC analisi per determinare quali valori potessero predire l'alterazione di sdLD, sono emersi i seguenti risultati rappresentati in Tabella sotto con i rispettivi cut-off.

	Area Under the Curve	Asymptotic 95% Confidence Interval		P-value	Sensibilità	Specificità	CUTOFF
Colesterolo (mg/100 ml)	0,896	0,816	0,975	0,000	0,875	0,897	253,00
LDL (mg/100ml)	0,897	0,824	0,970	0,000	0,875	0,868	170,00
LDLossidate (U/ml)	0,946	0,886	1,000	0,000	0,938	0,882	62,50
APO-B (mg/100ml)	0,934	0,876	0,992	0,000	0,938	0,794	118,50
HOMA-IR	0,711	0,557	0,866	0,009	0,813	0,574	1,8850

Quindi per valori di colesterolo > 253 mg/dl, LDL-c > 168 mg/dl, LDLox > 62.5 U/ml, APO-b > 122 mg/dl avremo una alterazione delle sd-LDL con una buona confidenza statistica. **Questi sono dati clinici estremamente importanti e non presenti in letteratura.**

Molto interessanti sono le logistiche MONO e MULTI variabile dove sono state utilizzate le stesse variabili ma categorizzate (sdLDL CAT 1 alterato e 0 non alterato con cut off di

1.293 mmol/L). Per le altre variabili sono stati utilizzati i seguenti limiti di riferimento riportati nella tabella seguente:

		< 320		< 10	> 8	OTTIMALI
<60	< 120	321-360	<2.5	11-20	6-8	POPOLAZIONE
61-70	121-140	361 - 400	2.6 - 2.7	21 - 40	4-6	CRITICO
>71	>141	401 - 500	> 2.71	>41	< 4	ALTERATO
		>501				MOLTO ALTERATO
LDLossidate (U/ml)	APO-B (mg/100ml)	d-ROMs (U.C.)	HOMA-IR	AA/EPA	Omega_3 Index (%)	

Dai risultati evidenziati nella Tabella sotto la prima coovariata testata sono le LDLox che esprimono un EXP(B) di 9.673 **il che significa che il paziente che ha un LDLox tra critico e alterato ha quasi 10 volte in più la probabilità di avere sdLDL alterate.**

Logistiche MONO

Variabile dipendente sdLDLmmolL_CAT CAT= alterato 1; non alterato 0

Variables in the Equation

	B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95% C.I.for EXP(B)	
							Lower	Upper
Step 1 ^a LDLossidanteUml_CAT	2,269	,581	15,239	1	,000	9,673	3,096	30,228
Constant	-5,780	1,378	17,580	1	,000	,003		

a. Variable(s) entered on step 1: LDLossidanteUml_CAT.

Variables in the Equation

	B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95% C.I.for EXP(B)	
							Lower	Upper
Step 1 ^a APOBmg100ml_CAT	2,406	,623	14,918	1	,000	11,090	3,271	37,600
Constant	-5,842	1,370	18,180	1	,000	,003		

a. Variable(s) entered on step 1: APOBmg100ml_CAT.

Variables in the Equation

	B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95% C.I.for EXP(B)	
							Lower	Upper
Step 1 ^a dROMsU.C_CAT	,040	,263	,023	1	,879	1,041	,621	1,743
Constant	-1,550	,855	3,286	1	,070	,212		

a. Variable(s) entered on step 1: dROMsU.C_CAT.

Variables in the Equation

	B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95% C.I.for EXP(B)	
							Lower	Upper
Step 1 ^a HOMAIR_CAT	,584	,363	2,587	1	,108	1,792	,880	3,650
Constant	-2,427	,764	10,084	1	,001	,088		

a. Variable(s) entered on step 1: HOMAIR_CAT.

Variables in the Equation

	B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95% C.I.for EXP(B)	
							Lower	Upper
Step 1 ^a AAEPA_CAT	-,167	,361	,214	1	,644	,846	,417	1,718
Constant	-1,071	,846	1,601	1	,206	,343		

a. Variable(s) entered on step 1: AAEPA_CAT.

Variables in the Equation

	B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95% C.I.for EXP(B)	
							Lower	Upper
Step 1 ^a LDLmg100ml_CAT	2,625	,803	10,680	1	,001	13,804	2,860	66,641
Constant	-6,614	1,764	14,063	1	,000	,001		

a. Variable(s) entered on step 1: LDLmg100ml_CAT.

Alle monovariate risultano significative oltre le LDLox anche APO_B (EXP(B) di 11.090) e LDL-c (EXP(B) di 13.804), mentre le coovariate arancioni non sono significative (rapporto di infiammaging AA/EPA, HOMA-I, d-ROMs).

Bibliografia

1. IL DUPLICE PARADOSSO DEL COLESTEROLO

- 1) Ravnskov U, McCully KS. **Vulnerable plaque formation from obstruction of vasa vasorum by homocysteinylated and oxidized lipoprotein aggregates complexed with microbial remnants and LDL autoantibodies.** *Ann Clin Lab Sci* 2009;39:3–16.
- 2) Ravnskov U, Diamond DM, Hama R, *et al.*: **Lack of an association or an inverse association between low-density-lipoprotein cholesterol and mortality in the elderly: a systematic review** *BMJ Open* 2016; 6:e010401. doi:10.1136/bmjopen-2015-010401.
- 3) U. Ravnskov: **High cholesterol may protect against infections and atherosclerosis** *QJM: An International Journal of Medicine*, Volume 96, Issue 12, December 2003, Pages 927–934, <https://doi.org/10.1093/qjmed/hcg150>.
- 4) D Jacobs, H Blackburn, M Higgins, D Reed, H Iso, G McMillan, J Neaton, J Nelson, J Potter, and B Rifkind: **Report of the Conference on Low Blood Cholesterol: Mortality Associations.**
- 5) Iribarren C., Jacobs D., Sidney S., Claxton A. & Feingold K. (1998): **Cohort study of serum total cholesterol and in-hospital incidence of infectious diseases.** *Epidemiology and Infection*, 121(2), 335-347. doi:10.1017/S0950268898001435.
- 6) U. Ravnskov, M. de Lorgeril, M. Kendrick, D.M. Diamond: **Inborn Coagulation Factors are More Important Cardiovascular Risk Factors Than High LDL-Cholesterol in Familial Hypercholesterolemia,** *Medical Hypotheses* (2018), doi: <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2018.09.019>.
- 7) Mary Seed, B.M., B.Ch., Fritz Hoppichler, M.D., David Reaveley, Ph.D., Susan McCarthy, S.R.N., Gilbert R. Thompson, M.D., F.R.C.P., Eric Boerwinkle, Ph.D., and Gerd Utermann, M.D.. **Relation of Serum Lipoprotein(a) Concentration and Apolipoprotein(a) Phenotype to Coronary Heart Disease in Patients with Familial Hypercholesterolemia.** May 24, 1990 *N Engl J Med* 1990; 322:1494-1499 DOI: 10.1056/NEJM199005243222104
- 8) Tatò F, Keller C, Schuster H, Spengel F, Wolfram G, Zöllner N. **Relation of lipoprotein(a) to coronary heart disease and duplexsonographic findings of the carotid arteries in heterozygous familial hypercholesterolemia.** *Atherosclerosis*. 1993 Jun;101(1):69-77. doi: 10.1016/0021-9150(93)90103-2. PMID: 8216504.
- 9) Morrisett JD, Guyton JR, Gaubatz JW, Gotto AM Jr. **Lipoprotein (a): structure, metabolism and epidemiology.** In: Gotto AM Jr, ed. *Plasma lipoproteins*. Amsterdam: Elsevier Science, 1987:129–52.
- 10) Dahlen GH, Guyton JR, Attar M, Farmer JA, Kautz JA, Gotto AM Jr. . **Association of levels of lipoprotein Lp(a), plasma lipids, and other lipoproteins with coronary artery disease documented by angiography.** *Circulation* 1986; 74:758–65.
- 11) Hoff HF, Beck GJ, Skibinski CI, et al. . **Serum Lp(a) level as a predictor of vein graft stenosis after coronary artery bypass surgery in patients.** *Circulation* 1988; 77:1238–44.

- 12) Walton KW, Hitchens J, Magnani HN, Khan M. . **A study of methods of identification and estimation of Lp(a) lipoprotein and of its significance in health, hyperlipidaemia and atherosclerosis.** *Atherosclerosis* 1974; 20:323–46.
- 13) Cushing GL, Gaubatz JW, Nava M-L, et al. . **Quantitation and localization of apolipoproteins(a) and B in coronary artery bypass vein grafts resected at reoperation.** *Arteriosclerosis* 1989; 9:593–603.
- 14) Rath M, Niendorf A, Reblin T, Dietel M, Krebber H-J, Beisiegel U. . **Detection and quantification of lipoprotein(a) in the arterial wall of 107 coronary bypass patients.** *Arteriosclerosis* 1988; 9:579–92.
- 15) Diamond DM, Alabdulgader AA, de Lorgeril M, et al: **Dietary Recommendations for Familial Hypercholesterolaemia: an Evidence-Free Zone** *BMJ Evidence-Based Medicine* Published Online First: 05 July 2020. doi: 10.1136/bmjebm-2020-111412.
- 16) Bittencourt MS, Nasir K, Santos RD, et al. **Very high LDL cholesterol: the power of zero passes another test.** *Atherosclerosis* 2020;292:207–8.doi:10.1016/j.atherosclerosis.2019.11.019 pmid:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31806204>
- 17) Alvaro Alonso et al. **Blood Lipids and the Incidence of Atrial Fibrillation: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis and the Framingham Heart Study.** *J Am Heart Assoc.* 2014
- 18) Bansal SK, Agarwal S, Daga MK.: **Advanced atherogenic index for the assessment of consolidated lipid risk in premature coronary artery disease patients in India.** *J Lab Physicians* 2016;8:77-84.
- 19) Levitan I, Volkov S, Subbaiah PV. **Oxidized LDL: diversity, patterns of recognition, and pathophysiology.** *Antioxid Redox Signal.* 2010;13(1):39-75. doi:10.1089/ars.2009.2733

1.1 Nuove linee guida europee sulla prevenzione cardiovascolare e dati di laboratorio nel trimestre 2023

- 1) Giuliano Ermini, Simona Giampaoli. **Un breve sguardo alle nuove linee guida europee sulla prevenzione cardiovascolare e alcune considerazioni sugli stili di vita.** *Rivista Società Italiana di Medicina Generale* n. 2 • vol. 29 • 2022
- 2) Visseren FLJ, Mach F, Smulders YM, et al. **2021 ESC Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice.** *Eur Heart J* 2021;42:3227-3337.

2. INFLAMMAGING E RISCHIO CARDIOVASCOLARE: STATO DELL'ARTE

- 1) G. Lippi. **Lipidi e rischio cardiovascolare.** *Istituto di Chimica e Microscopia Clinica, Dipartimento di Scienze Morfologico-Biomediche, Università degli Studi di Verona, Verona. RIMeL / IJLaM* 2005; 1

- 2) **Anticorpi anti-lipoproteine a bassa densità ossidate: studi epidemiologici e potenziali applicazioni cliniche nella malattia cardiovascolare.** *Minerva Cardioangiologica* 2007 Dicembre;55(6):821-37
- 3) Andreja Trpkovic et al. **Oxidized low-density lipoprotein as a biomarker of cardiovascular diseases.** *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2015;52(2):70-85.
- 4) Hiroyuki Itabe. **Oxidized low-density lipoprotein as a biomarker of in vivo oxidative stress: from atherosclerosis to periodontitis.** *J. Clin. Biochem. Nutr.* | July 2012 | vol. 51 | no. 1 | 1–8
- 5) Holvoet et al. **Oxidized LDL and Malondialdehyde-Modified LDL in Patients With Acute Coronary Syndromes and Stable Coronary Artery Disease.** *Circulation.* 1998; 98:1487-1494
- 6) Alexander N. Orekhov, Igor A. Sobenin. **Modified lipoproteins as biomarkers of atherosclerosis.** *Frontiers In Bioscience, Landmark,* 23, 1422-1444, March 1, 2018
- 7) Francesca Perrotti et al. **Advances in Lipidomics for Cancer Biomarkers Discovery.** *Int. J. Mol. Sci.* 2016, 17, 1992;

3. PROFILO LIPIDICO ATEROGENO

3.1 Apolipoproteina-B (apo-B)

- 1) Barter PJ, Ballantyne CM, Carmena R, et al. **Apo B versus cholesterol in estimating cardiovascular risk and in guiding therapy: report of the thirty person/ten-country panel.** *J Intern Med* 2006;259:247-58.
- 2) Brunzell JD, Davidson M, Furberg CD, et al. **Lipoprotein management in patients with cardiometabolic risk: conference report from the American Diabetes Association and the American College of Cardiology Foundation.** *J Am Coll Cardiol* 2008;51:1512-24.
- 3) Allan D. Sniderman et al. **Apolipoprotein B Particles and Cardiovascular Disease: A Narrative Review** *JAMA Cardiol.* doi:10.1001/jamacardio.2019.3780 Published online October 23, 2019.
- 4) Ference BA, Kastelein JJP, Ray KK, et al. **Association of triglyceride-lowering LPL variants and LDL-C-lowering LDLR variants with risk of coronary heart disease.** *JAMA.* 2019;321(4):364-373. doi:10.1001/jama.2018.20045
- 5) Elovson J, Chatterton JE, Bell GT, et al. **Plasma very low density lipoproteins contain a single molecule of apolipoprotein B.** *J Lipid Res.* 1988;29 (11):1461-1473.
- 6) Sniderman AD, Couture P, Martin SS, et al. **Hypertriglyceridemia and cardiovascular risk: a cautionary note about metabolic confounding.** *J Lipid Res.* 2018;59(7):1266-1275. doi:10.1194/jlr.R082271
- 7) Adiels M, Packard C, CaslakeMJ, et al. **A new combined multicompartmental model for apolipoprotein B-100 and triglyceride metabolism in VLDL subfractions.** *J Lipid Res.* 2005;46(1):58-67. doi:10.1194/jlr.M400108-JLR200

- 8) Pattnaik NM, Montes A, Hughes LB, Zilversmit DB. **Cholesteryl ester exchange protein in human plasma isolation and characterization.** *Biochim Biophys Acta.* 1978;530(3):428-438. doi:10.1016/0005-2760(78)90163-7
- 9) Helena Vaverkova (2011) **LDL-C or apoB as the best target for reducing coronary heart disease: should apoB be implemented into clinical practice?** *Clinical Lipidology*, 6:1, 35-48
- 10) Thomas G. Cole et al. **Association of Apolipoprotein B and Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy–Derived LDL Particle Number with Outcomes in 25 Clinical Studies: Assessment by the AACC Lipoprotein and Vascular Diseases Division Working Group on Best Practices** *Clinical Chemistry* 59:5 752–770 (2013)
- 11) Graziani FM. **Apolipoproteina B e rischio cardiovascolare: la posizione del Working Group on Best Practices della Divisione Lipoproteine e Malattie Vascolari dell’American Association for Clinical Chemistry (AACC)*.** *Biochimica Clinica*, 2010, vol. 34, n. 1
- 12) Borén J, Williams KJ. **The central role of arterial retention of cholesterol-rich apolipoprotein-B-containing lipoproteins in the pathogenesis of atherosclerosis: a triumph of simplicity.** *Curr Opin Lipidol.* 2016;27(5):473-483. doi:10.1097/MOL.0000000000000330
- 13) Que X, Hung M-Y, Yeang C, et al. **Oxidized phospholipids are proinflammatory and proatherogenic in hypercholesterolaemic mice.** *Nature.* 2018;558(7709):301-306. doi:10.1038/s41586-018-0198-8
- 14) Ketelhuth DF, Rios FJ, Wang Y, et al. **Identification of a danger-associated peptide from apolipoprotein B100 (ApoBDS-1) that triggers innate proatherogenic responses.** *Circulation.* 2011;124(22):2433-2443, 1-7. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.111.051599
- 15) Avraham-Davidi I, Ely Y, Pham VN, et al. **ApoB-containing lipoproteins regulate angiogenesis by modulating expression of VEGF receptor 1.** *NatMed.* 2012;18(6):967-973. doi:10.1038/nm.2759

3.1.1 Studi prospettici su APO-B in prevenzione primaria e secondaria

- 1) Walldius G, Jungner I, Holme I, et al. **High apolipoprotein B, low apolipoprotein A-1, and improvement in the prediction of fatal myocardial infarction (AMORIS study): a prospective study.** *Lancet* 2001;358:2026-33.
- 2) Lamarche B, Moorjani S, Lupien PJ, et al. **Apolipoprotein A-1 and B levels and the risk of ischemic heart disease during a 5 year follow-up of men in the Quebec Cardiovascular Study.** *Circulation* 1996;94:273-8.
- 3) Pischon T, Girman CJ, Sacks FM, et al. **Non-high density lipoprotein cholesterol and apolipoprotein B in the prediction of coronary heart disease in men.** *Circulation* 2005;112:3375-83.
- 4) Graziani FM. **Apolipoproteina B e rischio cardiovascolare: la posizione del Working Group on Best Practices della Divisione Lipoproteine e Malattie Vascolari dell’American Association for Clinical Chemistry (AACC)*.** *Biochimica Clinica*, 2010, vol. 34, n. 1

3.2 Small dense LDL (sd-LDL)

- 1) Jiahua Fan et al. **Small dense LDL cholesterol is associated with metabolic syndrome traits independently of obesity and inflammation.** *Nutrition & Metabolism* (2019) 16:7
- 2) Mi-Na Lee et al **Evaluation of the Analytical Performance of a Direct Quantitative Assay of Small Dense LDL.** *J Lab Med Qual Assur* 2014;36:84-91.
- 3) Philipp A Gerber, Dragana Nikolic, Manfredi Rizzo. **Small, dense LDL: an update.** *Curr Opin Cardiol.* 2017 Jul;32(4):454-459.
- 4) Lathan Liou, Stephen Kaptoge. **Association of small, dense LDL-cholesterol concentration and lipoprotein particle characteristics with coronary heart disease: A systematic review and meta-analysis.** *PLOS ONE* | November 9, 2020
- 5) Bansal SK, Agarwal S, Daga MK.: **Advanced atherogenic index for the assessment of consolidated lipid risk in premature coronary artery disease patients in India.** *J Lab Physicians* 2016;8:77-84.
- 6) Allan D. Sniderman et. al. **Apolipoprotein B Particles and Cardiovascular Disease A Narrative Review.** *JAMA Cardiology*, October 23, 2019.
- 7) Cole, T. et. al. **Association of Apolipoprotein B and Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy–Derived LDL Particle Number with Outcomes in 25 Clinical Studies: Assessment by the AACC Lipoprotein and Vascular Diseases Division Working Group on Best Practices.** *Clinical Chemistry* May 2013 vol. 59 no. 5 752-770
- 8) **Anticorpi anti-lipoproteine a bassa densità ossidate: studi epidemiologici e potenziali applicazioni cliniche nella malattia cardiovascolare.** *Minerva Cardioangiologica* 2007 Dicembre;55(6):821-37
- 9) Hiroyuki Itabe. **Oxidized low-density lipoprotein as a biomarker of in vivo oxidative stress: from atherosclerosis to periodontitis.** *J. Clin. Biochem. Nutr.* | July 2012 | vol. 51 | no. 1 | 1–8
- 10) Andreja Trpkovic et al. **Oxidized low-density lipoprotein as a biomarker of cardiovascular diseases.** *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2015;52(2):70-85.

3.2.1 Limiti di riferimento sd-LDL

- 1) Michael Y. Tsai et al. **New Automated Assay of Small Dense Low-Density Lipoprotein Cholesterol Identifies Risk of Coronary Heart Disease: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014 January ; 34(1): 196–201
- 2) Harold Superko and Brenda Garrett. **Small Dense LDL: Scientific Background, Clinical Relevance, and Recent Evidence Still a Risk Even with ‘Normal’ LDL-C Levels.** *Biomedicines* 2022, 10, 829.
- 3) Hoogeveen, R.C et al. **Small dense low-density lipoprotein-cholesterol concentrations predict risk for coronary heart disease: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study.** *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2014, 34, 1069–1077.

- 4) Nishikura, T.; **Elevated small dense low-density lipoprotein cholesterol as a predictor for future cardiovascular events in patients with stable coronary artery disease.** *J. Atheroscler. Thromb.* 2014, 21, 755–767.

3.3 Ruolo pro-aterogeno delle Lipoproteine Remnants

- 1) Henry N. Ginsberg et al. **Triglyceride-rich lipoproteins and their remnants: metabolic insights, role in atherosclerotic cardiovascular disease, and emerging therapeutic strategies—a consensus statement from the European Atherosclerosis Society.** *European Heart Journal* (2021) 42, 4791–4806.

3.4 LDL ossidate (ox-LDL)

- 1) Van Berkel TJ, De Rijke YB, Kruijt JK. **Different fate in vivo of oxidatively modified low density lipoprotein and acetylated low density lipoprotein in rats: recognition by various scavenger receptors on Kupffer and endothelial liver cells.** *J Biol Chem.* 1991;266 (4):2282-2289.
- 2) Avogaro P, Bon GB, Cazzolato G. **Presence of a modified low density lipoprotein in humans.** *Arteriosclerosis.* 1988;8(1):79-87.
- 3) E. Leiva, S. Wehinger, L. Guzmán and R. Orrego **Role of Oxidized LDL in Atherosclerosis** <https://dx.doi.org/10.5772/59375>
- 4) Alexander N. Orekhov, Igor A. Sobenin **Modified lipoproteins as biomarkers of atherosclerosis** [Frontiers In Bioscience, Landmark, 23, 1422-1444, March 1, 2018]
- 5) Frostegard, J.; Haegerstrand, A.; Gidlund, M.; Nilsson, J. **Biologically modified LDL increases the adhesive properties of endothelial cells.** *Atherosclerosis* 90:119-126; 1991.
- 6) Rajavashisth, Andalibi, Territo, Berliner, Navab, Fogelman, Lusis, **Induction of endothelial cell expression of granulocyte and macrophage colony-stimulating factors by modified low-density lipoproteins.** *Nature* 344:254-257; 1990.
- 7) Yla-Herttuala, S.; Lipton, B. A.; Rosenfeld, M. E.; Sarkioja, T.; Yoshimura, T.; Leonard, E. J.; Witztum, J. L.; Steinberg, D. **Expression of monocyte chemoattractant protein 1 in macrophage-rich areas of human and rabbit atherosclerotic lesions.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:5252-5256; 1991.
- 8) Catapano, A. L.; Maggi, F. M.; Tragni, E. **Low density lipoprotein oxidation, antioxidants, and atherosclerosis.** *Curr Opin Cardiol* 15:355-363; 2000.
- 9) Quinn, M. T.; Parthasarathy, S.; Fong, L. G.; Steinberg, D. **Oxidatively modified low density lipoproteins: a potential role in recruitment and retention of monocyte/ macrophages during atherogenesis.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:2995-2998; 1987.
- 10) Barbieri, S. S.; Cavalca, V.; Eligini, S.; Brambilla, M.; Caiani, A.; Tremoli, E.; Colli, S. **Apocynin prevents cyclooxygenase 2 expression in human monocytes through NADPH oxidase and glutathione redox-dependent mechanisms.** *Free Radic Biol Med* 37:156-165; 2004.

- 11) Hansson, G. K.; Robertson, A. K.; Soderberg-Naucler, C. **Inflammation and atherosclerosis.** *Annu Rev Pathol* 1:297-329; 2006.
- 12) Mietus-Snyder, M.; Frieria, A.; Glass, C. K.; Pitas, R. E. **Regulation of scavenger receptor expression in smooth muscle cells by protein kinase C: a role for oxidative stress.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17:969-978; 1997.
- 13) Park, Y. M. **CD36, a scavenger receptor implicated in atherosclerosis.** *Exp Mol Med* 46:e99; 2014
- 14) Stiko-Rahm, Hultgardh-Nilsson, Regnstrom, Hamsten, Nilsson, **Native and oxidized LDL enhances production of PDGF AA and the surface expression of PDGF receptors in cultured human smooth muscle cells.** *Arterioscler Thromb* 12:1099-1109; 1992.
- 15) Kohno, M.; Yokokawa, K.; Yasunari, K.; Minami, M.; Kano, H.; Hanehira, T.; Yoshikawa, J. **Induction by lysophosphatidylcholine, a major phospholipid component of atherogenic lipoproteins, of human coronary artery smooth muscle cell migration.** *Circulation* 98:353-359; 1998.
- 16) Shen, C. M.; Mao, S. J.; Huang, G. S.; Yang, P. C.; Chu, R. M. **Stimulation of smooth muscle cell proliferation by ox-LDL- and acetyl LDL-induced macrophage-derived foam cells.** *Life Sci* 70:443-452; 2001.
- 17) Maiolino, G.; Rossitto, G.; Caielli, P.; Bisogni, V.; Rossi, G. P.; Calo, L. A. **The role of oxidized low-density lipoproteins in atherosclerosis: the myths and the facts.** *Mediators Inflamm* 2013:714653; 2013
- 18) Podrez, E. A.; Byzova, T. V.; Febbraio, M.; Salomon, R. G.; Ma, Y.; Valiyaveetil, M.; Poliakov, E.; Sun, M.; Finton, P. J.; Curtis, B. R.; Chen, J.; Zhang, R.; Silverstein, R. L.; Hazen, S. L. **Platelet CD36 links hyperlipidemia, oxidant stress and a prothrombotic phenotype.** *Nat Med* 13:1086-1095; 2007
- 19) Siegel-Axel, D.; Daub, K.; Seizer, P.; Lindemann, S.; Gawaz, M. **Platelet lipoprotein interplay: trigger of foam cell formation and driver of atherosclerosis.** *Cardiovasc Res* 78:8-17; 2008.
- 20) Daub, K.; Seizer, P.; Stellos, K.; Kramer, B. F.; Bigalke, B.; Schaller, M.; Fateh-Moghadam, S.; Gawaz, M.; Lindemann, S. **Oxidized LDL-activated platelets induce vascular inflammation.** *Semin Thromb Hemost* 36:146-156; 2010.
- 21) Curtiss, L. K.; Black, A. S.; Takagi, Y.; Plow, E. F. **New mechanism for foam cell generation in atherosclerotic lesions.** *J Clin Invest* 80:367-373; 1987.
- 22) Isomaa B, Almgren P, Tuomi T, et al. **Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome.** *Diabetes Care.* 2001;24(4):683-689.
- 23) Trevisan M, Liu J, Bahsas FB, Menotti A; **Risk Factor and Life Expectancy Research Group. Syndrome X and mortality: a population-based study.** *Am J Epidemiol.* 1998;148(10):958-966.
- 24) Paul Holvoet, Duk-Hee Lee, Michael Steffes, Myron Gross, David R. Jacobs Jr, **Association Between Circulating Oxidized Low-Density Lipoprotein and Incidence of the Metabolic Syndrome** (Reprinted) *JAMA*, May 21, 2008—Vol 299, No. 19

- 25) Holvoet P, Harris TB, Tracy RP, et al. **Association of high coronary heart disease risk status with circulating oxidized LDL in the well-functioning elderly: findings from the Health, Aging, and Body Composition study.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23 (8):1444-1448.
- 26) National Institutes of Health. **Third Report of the National Cholesterol Education Program Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III).** Bethesda, MD: National Institutes of Health; 2002. NIH publication 01-3670.

3.5 Lipoproteina A (Lp(a))

- 1) David M Diamond et al. **Dietary Recommendations for Familial Hypercholesterolaemia: an Evidence-Free Zone.** *BMJ Evidence-Based Medicine* Month 2020 | volume 0 | number 0 |.
- 2) Kronenberg F. **Human genetics and the causal role of lipoprotein(a) for various diseases.** *Cardiovasc Drugs Ther.* 2016; 30: 87-100.
- 3) Rader DJ, Cain W, Ikewaki K, Talley G, Zech LA, Usher D, Brewer HB Jr. **The inverse association of plasma lipoprotein(a) concentrations with apolipoprotein (a) isoform size is not due to differences in Lp(a) catabolism but to differences in production rate.** *J Clin Invest* - 1994; 93: 2758-63.
- 4) Koschinsky ML, Marcovina SM. **Structure-function relationships in apolipoprotein(a): insights into lipoprotein(a) assembly and pathogenicity.** *Curr Opin Lipidol.* 2004; 15: 167-74.
- 5) Tsimikas S. **A test in context: Lipoprotein(a). Diagnosis, Prognosis, Controversies and Emerging Therapies.** *J Am coll Cardiol.* 2017; 69: 692-711.
- 6) Mary Seed, B.M., B.Ch., Fritz Hoppichler, M.D., David Reaveley, Ph.D., Susan McCarthy, S.R.N., Gilbert R. Thompson, M.D., F.R.C.P., Eric Boerwinkle, Ph.D., and Gerd Utermann, M.D.. **Relation of Serum Lipoprotein(a) Concentration and Apolipoprotein(a) Phenotype to Coronary Heart Disease in Patients with Familial Hypercholesterolemia.** May 24, 1990 *N Engl J Med* 1990; 322:1494-1499 DOI: 10.1056/NEJM199005243222104
- 7) Li S, Wu NQ, Zhu CG, et al. **Significance of lipoprotein(a) levels in familial hypercholesterolemia and coronary artery disease.** *Atherosclerosis.* 2017; 260: 67e74.
- 8) Tatò F, Keller C, Schuster H, Spengel F, Wolfram G, Zöllner N. **Relation of lipoprotein(a) to coronary heart disease and duplexsonographic findings of the carotid arteries in heterozygous familial hypercholesterolemia.** *Atherosclerosis.* 1993 Jun;101(1):69-77. doi: 10.1016/0021-9150(93)90103-2. PMID: 8216504.
- 9) Maria Grazia Zenti, Anna Altomari, Enzo Bonora **LIPOPROTEINA(a) E ATEROSCLEROSI: È TEMPO DI TRATTARE! Lipoprotein(a) and Atherosclerosis: it is high time to treat!** *Giornale Italiano dell'Arteriosclerosi* 2017; 8 (3): 50-61
- 10) Morrisett JD, Guyton JR, Gaubatz JW, Gotto AM Jr. **Lipoprotein (a): structure, metabolism and epidemiology.** In: Gotto AM Jr, ed. *Plasma lipoproteins.* Amsterdam: Elsevier Science, 1987:129–52.

- 11) Kamstrup PR, Benn M, Tybjaerg-Hansen A, Nordestgaard BG. **Extreme lipoprotein(a) levels and risk of myocardial infarction in the general population: the Copenhagen City Heart Study.** *Circulation*. 2008 Jan 15;117(2):176-84. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.107.715698. Epub 2007 Dec 17. PMID: 18086931.
- 12) Kamstrup PR, Tybjaerg-Hansen A, Steffensen R, Nordestgaard BG. **Genetically Elevated Lipoprotein(a) and Increased Risk of Myocardial Infarction.** *JAMA*. 2009;301(22):2331–2339. doi:10.1001/jama.2009.801
- 13) Vongpromek R, Bos S, Ten Kate GJ, Yahya R, Verhoeven AJ, de Feyter PJ, Kronenberg F, Roeters van Lennep JE, Sijbrands EJ, Mulder MT. **Lipoprotein(a) levels are associated with aortic valve calcification in asymptomatic patients with familial hypercholesterolaemia.** *J Intern Med*. 2015 Aug;278(2):166-73. doi: 10.1111/joim.12335. Epub 2015 Jan 5. PMID: 25487646.
- 14) CARDIoGRAMplusC4D Consortium, **Large-scale association analysis identifies new risk loci for coronary artery disease.** *Nat Genet*. 2013 Jan;45(1):25-33. doi: 10.1038/ng.2480. Epub 2012 Dec 2. PMID: 23202125; PMCID: PMC3679547.
- 15) Smolders B, Lemmens R, Thijs V. **Lipoprotein (a) and stroke: a meta-analysis of observational studies.** *Stroke*. 2007; 38: 1959-66.
- 16) Aguib Y, Al Suwaidi J. **The Copenhagen City Heart Study (Østerbrounderøgelsen).** *Glob Cardiol Sci Pract*. 2015;2015(3):33. Published 2015 Oct 9. doi:10.5339/gcsp.2015.33
- 17) Erqou S, Kaptoge S, Perry PL, Di AE, et al. **Lipoprotein(a) concentration and the risk of coronary heart disease, stroke, and nonvascular mortality.** *JAMA*. 2009; 302: 412-23.
- 18) Simona Barlera, Benedetta Diamante Chiodini, Maria Grazia Franzosi, Gianni Tognoni **II PROCARDIS: un approccio attuale allo studio della genetica dell'infarto miocardico** Settembre 2001, Vol. 2, N. 9 *G Ital Cardiol* 2001;2(9):997-1004
- 19) Jaeger BR, Richter Y, Nagel D, Heigl F, et al. **Longitudinal cohort study on the effectiveness of lipid apheresis treatment to reduce high lipoprotein(a) levels and prevent major adverse coronary events.** *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2009; 6: 229-39.
- 20) Roeseler E, Julius U, Heigl F, et al. **Lipoprotein apheresis for lipoprotein(a)-associated cardiovascular disease: prospective 5 years of follow-up and apolipoprotein(a) characterization.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2016; 36: 2019-27
- 21) Catapano AL, Graham I, De Backer G, et al. **2016 ESC/EAS Guidelines for the Management of Dyslipidaemias.** *Atherosclerosis*, 2016; 253: 281-344.

3.5.1 Modulazione della Lp(a) con alimentazione e nutraceutica

- 1) David M Diamond et al. **Dietary Recommendations for Familial Hypercholesterolaemia: an Evidence-Free Zone.** *BMJ Evidence-Based Medicine* Month 2020 | volume 0 | number 0 |.
- 2) Mackinnon LT, Hubinger L, Lepre F. **Effects of physical activity and diet on lipoprotein(a).** *Med Sci Sports Exerc* 1997;29:1429–36
- 3) Wood RJ, Volek JS, Davis SR, et al. **Effects of a carbohydrate-restricted diet on emerging plasma markers for cardiovascular disease.** *Nutr Metab* 2006;3:19.

- 4) Heitor O. et al **Lipoprotein(a): Current Evidence for a Physiologic Role and the Effects of Nutraceutical Strategies** DOI: <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2019.06.002>

4. PROFILO D'INFIAMMAZIONE CELLULARE

- 1) Ferreri C, Chatgialloglu C.; **Membrana cellulare e lipidomica**, 2014
- 2) Zamaria N. **Alteration of polyunsaturated fatty acid status and metabolism in health and disease**; *Reprod. Nutr. Dev.* 2004 May-Jun;44(3):273-82.
- 3) Jin Endo, Makoto Arita. **Cardioprotective mechanism of omega-3 polyunsaturated fatty acids**. *Journal of Cardiology* 2016; 67(1):22-7.
- 4) Angela M Rizzo, Gigliola Montorfano, Manuela Negroni, Laura Adorni, Patrizia Berselli, Paola Corsetto, Klaus Wahle, Bruno Berra. **A Rapid Method for Determining Arachidonic:eicosapentaenoic Acid Ratios in Whole Blood Lipids: Correlation With Erythrocyte Membrane Ratios and Validation in a Large Italian Population of Various Ages and Pathologies**. *Lipids Health Dis*; 2010 Jan 27;9:7.

4.1 Infiammazione e CAD

- 1) Ross R. **Atherosclerosis - an inflammatory disease**. *N Engl J Med* 1999; 340: 115-26.
- 2) Michele Correale, Natale Daniele Brunetti, Matteo Di Biase **Ruolo delle citochine pro-infiammatorie nei meccanismi patogenetici dell'aterosclerosi coronarica** (*G Ital Cardiol* 2006; 7 (9): 594-603)
- 3) Cotran RS, Kumar V, Robbins M. **Le basi patologiche delle malattie**. V edizione. Padova: Piccin, 1994.
- 4) Wayne AR, Schlant RC, Fuster V, O'Rourke RA, Roberts R, Sonnenbink EH. **Hurst Il cuore. Arterie e vene**. IX edizione. Milano: McGraw-Hill, 1999.
- 5) Li H, Cybulsky MI, Gimbrone MA Jr, Libby P. **An atherogenic diet rapidly induces VCAM-1, a cytokine regulatable mononuclear leukocyte adhesion molecole, in rabbit aortic endothelium**. *Arterioscler Thromb* 1993; 13: 197-204.
- 6) Hansson G, Libby P: **The role of the lymphocyte**. In: Fuster V, Ross R, Topol E, eds *Atherosclerosis and coronary artery disease*. New York, NY: Lippincott-Raven, 1996: 557-68.
- 7) Libby P, Geng YJ, Aikawa M, et al. **Macrophages and atherosclerotic plaque stability**. *Curr Opin Lipidol* 1996; 7: 330-5.
- 8) Libby P. **Current concepts of the pathogenesis of the acute coronary syndrome**. *Circulation* 2001; 104: 365-72.
- 9) Libby P, Simon DI. **Inflammation and trombosis: the clot thickens**. *Circulation* 2001; 103: 1718-20.
- 10) Andre P, Nannizzi-Alaimo L, Prasad KS, Philips DR. **Platelet-derived CD40L: the switch-hitting player of cardiovascular disease**. *Circulation* 2002, 106: 896-9.

- 11) Andre P, Prasad KS, Denis CV, et al. **CD40L stabilizes arterial thrombi by a beta3 integrin-dependent mechanism.** Nat Med 2002, 8: 247-52.
- 12) Aukrust P, Waehre T, Damas JK, Gullestad L, Solum NO. **Inflammatory role of platelets in acute coronary syndromes.** Heart 2001 86: 605-6.
- 13) Schonbeck U, Libby P. **CD40 signaling and plaque instability.** Circ Res 2001; 89: 1092-103.
- 14) Uyemura K, Demer LL, Castle SC, et al. **Cross-regulatory roles of interleukin (IL)-12 and IL-10 in atherosclerosis.** J Clin Invest 1996; 97: 2130-8.
- 15) Cybulsky MI, Iiyama K, Li H, et al. **A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis.** J Clin Invest 2001; 107: 1255-62
- 16) Hajjar DP, Haberland ME. **Lipoprotein trafficking in vascular cells. Molecular Trojan horses and cellular saboteurs.** J Biol Chem 1997; 272: 22975-8.
- 17) Price DT, Loscalzo J. **Cellular adhesion molecules and atherogenesis.** Am J Med 1999; 107: 85-97.

4.2 Meccanismi cardioprotettivi degli acidi grassi omega-3 e ruolo innovativo delle pro-resolvine nella gestione dell'inflammaging

- 1) Dyerberg J, Bang HO, Hjorne N. **Fatty acid composition of the plasma lipids in Greenland Eskimos.** Am J Clin Nutr. 1975; 28: 958-66.
- 2) Bang HO, Dyerberg J, Hjorne N. **The composition of food consumed by Greenland Eskimos.** Acta Med Scand. 1976; 200: 69-73.
- 3) Giovanni Battista Vigna, Alfredo De Giorgi **Omega-3 fatty acids: evidences, novelties and perspectives** Giornale Italiano dell'Arteriosclerosi 2014; 5 (3): 51-66
- 4) Mozaffarian D, Wu JH. **Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: effects on risk factors, molecular pathways, and clinical events.** J Am Coll Cardiol. 2011; 58: 2047-67.
- 5) Serhan CN. **Novel lipid mediators and resolution mechanisms in acute inflammation: to resolve or not?** Am J Pathol. 2010; 177: 1576-91. 7. Weylandt KH, Chiu C-Y, Gomolka B, et al.
- 6) **Omega-3 fatty acids and their lipid mediators: towards an understanding of resolvin and protectin formation.** Prostaglandins Other Lipid Mediat. 2012; 97: 73-82.
- 7) Marcon R, Bento AF, Dutra RC, et al. **Maresin 1, a proresolving lipid mediator derived from omega-3 polyunsaturated fatty acids, exerts protective actions in murine models of colitis.** J Immunol. 2013; 191: 4288-98.
- 8) Calder PC. **The role of marine omega-3 (n-3) fatty acids in inflammatory processes, atherosclerosis and plaque stability.** Mol Nutr Food Res. 2012; 56: 1073-80.
- 9) De Caterina R. **n-3 Fatty Acids in Cardiovascular Disease.** N Engl J Med. 2011; 364: 2439-50.
- 10) Harris WS, Mozaffarian D, Lefevre M, et al. **Towards establishing dietary reference intakes for eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids.** J Nutr. 2009; 139: 804S-19S.

4.2.1 Lipidomica eritrocitaria ed indici utili

- 1) Carla Ferreri. **Membrana cellulare e Lipidomica**. Consiglio Nazionale delle Ricerche. Bologna.
- 2) Carla Ferreri and Chryssostomos Chatgililoglu. **Role of fatty acid-based functional lipidomics in the development of molecular diagnostic tools**. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2012; 12(7), 767–780.
- 3) William S. Harris. **Omega-3 Fatty Acids and Cardiovascular Disease: A Case for Omega-3 Index as a New Risk Factor**. *Pharmacol Res.* 2007 March ; 55(3): 217–223.
- 4) Clemens von Schacky and William S. Harris. **Cardiovascular risk and the omega-3 index**. *Journal of Cardiovascular Medicine* 2007, 8 (suppl 1):S46–S49.
- 5) Sara Huerta-Yépez, Ana B. Tirado-Rodriguez, Oliver Hankinsona. **Role of diets rich in omega-3 and omega-6 in the development of cancer**. *Bol Med Hosp Infant Mex.* 2016;73(6):446---456.
- 6) Francesca Perrotti *et al.* **Advances in Lipidomics for Cancer Biomarkers Discovery**. *Int. J. Mol. Sci.* 2016, 17(12), 1992.
- 7) Barry Sears and Camillo Ricordi. **Anti-Inflammatory Nutrition as a Pharmacological Approach to Treat Obesity**. *Journal of Obesity* Volume 2011. Article ID 431985 | 14 pages.
- 8) AA. Puca *et al.* **Fatty acid profile of erythrocyte membranes as possible biomarker of longevity**. *Rejuvenation research*, 2008; Volume 11, Number 1.
- 9) Valeria Pala, Vittorio Krogh, Paola Muti, Véronique Chajès, Elio Riboli, Andrea Micheli, Mitra Saadatian, Sabina Sieri, Franco Berrino. **Erythrocyte Membrane Fatty Acids and Subsequent Breast Cancer: a Prospective Italian Study**. *Journal of the National Cancer Institute*, July 18, 2001; Vol. 93, No. 14.
- 10) Alessandro Ghezzi *et al.* **Oxidative Stress and Erythrocyte Membrane Alterations in Children with Autism: Correlation with Clinical Features**. *PLoS One*; June 2013 | Volume 8 | Issue 6 | e66418.
- 11) Giuseppe Grosso *et al.* **Omega-3 Fatty Acids and Depression: Scientific Evidence and Biological Mechanisms**. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Volume 2014, Article ID 313570, 16 pages
- 12) **Diete Vegetariane: posizione SINU**. 2016.

4.2.2 Esempi di impiego della lipidomica

- 1) William S. Harris, PhD*, Nathan L. Tintle, PhD, Mark R. Etherton, MD, PhD, Ramachandran S. Vasan, **Erythrocyte long-chain omega-3 fatty acid levels are inversely associated with mortality and with incident cardiovascular disease: The Framingham Heart Study** MD1933-2874/_ 2018 National Lipid Association. Published by Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.jacl.2018.02.010>
- 2) Michael I McBurney, Nathan L Tintle, Ramachandran S Vasan, Aleix Sala-Vila, and William S Harris **Using an erythrocyte fatty acid fingerprint to predict risk of all-cause mortality: the**

- Framingham Offspring Cohort** Am J Clin Nutr 2021;00:1–8. Printed in USA. 2021
<https://academic.oup.com/ajcn/advance-article/doi/10.1093/ajcn/nqab195/6301120>
- 3) Isabelle Demonty, Kellie Langlois, Linda S Greene-Finestone, Rana Zoka, and Loan Nguyen
Proportions of long-chain ω -3 fatty acids in erythrocyte membranes of Canadian adults: Results from the Canadian Health Measures Survey 2012–2015 Am J Clin Nutr 2021;113:993–1008. Printed in USA <https://academic.oup.com/ajcn/article/113/4/993/6155849>
 - 4) Kristina H Jackson and William S Harris: **Assessing the Omega-3 Index in a population: Canada did it right** Am J Clin Nutr 2021;113:779–780. Printed in USA.
<https://academic.oup.com/ajcn/article/113/4/779/6169153>

5. CONCLUSIONI

5.1 Modello di calcolo

- 1) Sanjiv Kumar Bansal, Sarita Agarwal, Mridul Kumar Daga. **Advanced Atherogenic Index for the Assessment of Consolidated Lipid Risk in Premature Coronary Artery Disease Patients in India.** Journal of Laboratory Physicians / Jul-Dec 2016 / Vol-8 / Issue-2
- 2) Esse R, Barroso M, Tavares de Almeida I, Castro R. **The Contribution of Homocysteine Metabolism Disruption to Endothelial Dysfunction: State-of-the-Art.** Int J Mol Sci. 2019 Feb 17;20(4):867.
- 3) Filippo Pigazzani et al. **The Prognostic Value of Derivatives-Reactive Oxygen Metabolites (d-ROMs) for Cardiovascular Disease Events and Mortality: A Review.** Antioxidants 2022, 11, 1541.
- 4) Tingting Du et al. **Clinical usefulness of lipid ratios, visceral adiposity indicators, and the triglycerides and glucose index as risk markers of insulin resistance.** Cardiovascular Diabetology 2014, 13:146
- 5) Tatjana Rundek et al. **Insulin Resistance and Risk of Ischemic Stroke Among Nondiabetic Individuals From the Northern Manhattan Study.** Arch Neurol. 2010;67(10):1195-1200

RINGRAZIAMENTI

Dulcis in fundo, concludo con i ringraziamenti, sforzandomi di essere breve.

Ringrazio anzitutto i miei genitori, per l'insuperabile supporto. Con il vostro amore ed esempio mi avete sempre insegnato l'importanza dell'impegno e l'applicarsi, e di coltivare curiosità ed entusiasmo, tutte armi preziose sia nella vita che per questo mio percorso, per affrontare entrambi con serenità anche davanti alle difficoltà.

Ringrazio mio fratello Luca, per essere così diverso da me, arricchendo il mio modo di essere e di vedere le cose con sempre nuovi punti di vista, col suo acume e la sua leggerezza.

Ringrazio poi tutto il resto della mia famiglia, di sangue e del cuore, per la dolcezza con cui hanno condiviso con me entusiasmi e difficoltà, accompagnandomi con orgoglio e dandomi forza. Non c'è stato un solo giorno di distanza in cui non vi abbia sentiti e portati in me.

Ringrazio Emiliano per ogni gesto di cura, per il continuo sostegno e per la pazienza con cui mi ha sempre imbeccata o ascoltata raccontare ogni novità mi stupisse e appassionasse. Con la delicatezza e la sensibilità che tanto amo, hai saputo starmi accanto in ogni scelta e passo, rendendomi non solo più leggeri, ma più belli, anche i più difficili.

Ringrazio Marika, che mi ha fatta sentire compresa e mai sola. Hai trovato sempre i modi e le parole per restare profondamente vicine anche in situazioni distanti tra loro. Sono felice che le nostre strade così diverse continuino ad arricchire il viaggio di entrambe.

Ringrazio poi Marco, per la leggerezza profonda con cui orbita nella mia vita. Sei svagato e scombinato in un modo che sento tanto mio, e che mi fa ridere il cuore.

Nomino poi sentitamente grata il laboratorio di analisi Fioroni, di San Benedetto del Tronto, nel quale mi è stato possibile svolgere quest'esperienza così insperabilmente piena e bella.

Ringrazio ogni volto e sorriso gentile che ho visto rivolgersi a me nelle capatine al laboratorio principale, è raro e prezioso un ambiente di lavoro così accogliente.

Con "sommo spargimento di cuore", però, nomino una per una le persone con cui ho effettivamente lavorato nel laboratorio più piccolo, con la dovuta premessa che nessuna delle parole che ho cercato rende giustizia né a loro (che a discapito di ogni formalismo chiamerò per nome) né a ciò che questa esperienza mi ha dato e lasciato nel cuore.

Ringrazio Michele – mio paziente tutor - per la fiducia e la disponibilità con cui mi ha accolta da subito, vincendo le mie timidezze con i suoi modi così aperti e solari; per i mille studi e spunti trovati ed esaminati, con fatica ma mai senza entusiasmo, e per il suo fare sempre rassicurante che mi ha fatta vincere qualsiasi ansia o timore.

Ringrazio Laura, per la dolcezza di ogni parola e l’attenzione a ogni dettaglio, e per l’invidiabile capacità che ha nel riporle sia nelle spiegazioni più tecniche, sia negli scambi più confidenziali. Conservo con affetto ogni gesto e pensiero di gentilezza e considerazione, inaspettati come tanti altri “regali” da quest’esperienza.

Ringrazio in ultimo – certo non per importanza – Umberto, per la delicatezza di ogni insegnamento e scambio, e per avermi regalato così tanti spunti della sua esperienza, di cui faccio tesoro e bagaglio.

Ho cominciato questo stage piena di aspettative esaltanti, non potevo sperare di concluderlo vedendole così superate, e in realtà sperando non finisse più. Siete entrati in punta di piedi nella mia quotidianità, lasciandomi sul cuore impronte di ricordi felici.

Ringrazio poi il mio tutor universitario, il professor Francesco Palermo, per la disponibile gentilezza che mi ha riservato sin dai primi contatti.

Sospettando di essermi dilungata fin troppo, ringrazio di cuore ogni professore e compagno che ha costellato e arricchito questo mio cammino, che ho tanto amato, e che non potrei essere più felice di aver intrapreso.

Nella moltitudine

Sono quella che sono.
Un caso inconcepibile
Come ogni caso.

In fondo avrei potuto avere
altri antenati,
e così avrei preso il volo
da un altro nido,
così da sotto un altro tronco
sarei strisciata fuori in squame.

Nel guardaroba della natura
c'è un mucchio di costumi: di
ragno, gabbiano, topo campagnolo.
Ognuno calza subito a pennello
e docilmente è indossato
finché non si consuma.

Anch'io non ho scelto,
ma non mi lamento.
Potevo essere qualcuno
molto meno a parte.
Qualcuno d'un formicaio, banco, sciame ronzante,
una scheggia di paesaggio sbattuta dal vento.

Qualcuno molto meno fortunato,
allevato per farne una pelliccia,
per il pranzo della festa,
qualcosa che nuota sotto un vetrino.

Un albero conficcato nella terra,
a cui si avvicina un incendio.

Un filo d'erba calpestato
dal corso di incomprensibili eventi.

Uno nato sotto una cattiva stella,
buona per altri.

E se nella gente destassi spavento,
o solo avversione,
o solo pietà?

Se al mondo fossi venuta
nella tribù sbagliata
e avessi tutte le strade precluse?

La sorte, finora,
mi è stata benigna.

Poteva non essermi dato
Il ricordo dei momenti lieti.

Poteva essermi tolta
L'inclinazione a confrontare.

Potevo essere me stessa – ma senza
stupore,
e ciò vorrebbe dire
qualcuno di totalmente diverso.

Wisława Szymborska