# HDL: metodi di misura, eterogeneità delle particelle, proposta di nomenclatura e relazione con gli eventi cardiovascolari aterosclerotici

**Robert S. Rosenson[1], H. Bryan Brewer Jr[2], M. John Chapman[3], Sergio Fazio[4], M. Mahmood Hussain[5], Anatol Kontush[3], Ronald M. Krauss[6,7], James D. Otvos[8], Alan T. Remaley[9], Ernst J. Schaefer[10]**

[1]Mount Sinai Heart, Mount Sinai School of Medicine, New York, NY, USA
[2]MedStar Research Institute, Washington DC, USA
[3]INSERM Unit 939, UPMC Paris 6, Hôpital de la Pitié, Paris, France
[4]Vanderbilt University, Nashville, TN, USA
[5]SUNY Downstate Medical Center, Brooklyn, NY, USA
[6]Children's Hospital Oakland Research Institute, University of California, Berkeley, CA, USA
[7]University of California, San Francisco, CA, USA
[8]Liposcience, Raleigh, NC, USA
[9]Lipoprotein Metabolism Section, Pulmonary and Vascular Medicine Branch, National Heart, Lung and Blood Institute, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA
[10]Lipid Metabolism Laboratory, Tufts University, Boston, MA, USA

**Traduzione a cura di Maria Stella Graziani e Ferruccio Ceriotti**

## ABSTRACT

A growing body of evidence from epidemiological data, animal studies, and clinical trials supports HDL as the next target to reduce residual cardiovascular risk in statin-treated, high-risk patients. For more than 3 decades, HDL cholesterol has been employed as the principal clinical measure of HDL and cardiovascular risk associated with low HDL-cholesterol concentrations. The physicochemical and functional heterogeneity of HDL present important challenges to investigators in the cardiovascular field who are seeking to identify more effective laboratory and clinical methods to develop a measurement method to quantify HDL that has predictive value in assessing cardiovascular risk. In this report, we critically evaluate the diverse physical and chemical methods that have been employed to characterize plasma HDL. To facilitate future characterization of HDL subfractions, we propose the development of a new nomenclature based on physical properties for the subfractions of HDL that includes very large HDL particles (VL-HDL), large HDL particles (L-HDL), medium HDL particles (M-HDL), small HDL particles (S-HDL), and very-small HDL particles (VS-HDL). This nomenclature also includes an entry for the pre-β-1 HDL subclass that participates in macrophage cholesterol efflux. We anticipate that adoption of a uniform nomenclature system for HDL subfractions that integrates terminology from several methods will enhance our ability not only to compare findings with different approaches for HDL fractionation, but also to assess the clinical effects of different agents that modulate HDL particle structure, metabolism, and function, and in turn, cardiovascular risk prediction within these HDL subfractions.

## INTRODUZIONE

Di norma, le strategie di prevenzione cardiovascolare sono basate essenzialmente sulla riduzione del colesterolo LDL (1, 2). Tuttavia, un'attenzione crescente è rivolta al colesterolo HDL, quale obiettivo secondario di prevenzione, per definire il rischio residuo di malattia cardiovascolare (CVD) (3, 4). Basse concentrazioni di colesterolo HDL sono molto frequenti nelle società occidentali e costituiscono un predittore di rischio CVD indipendente (5, 6), anche in presenza di basse concentrazioni di colesterolo LDL (7). Concentrazioni ridotte di colesterolo HDL sono spesso accompagnate da un aumento delle concentrazioni di particelle LDL piccole e con scarso contenuto di colesterolo e di "remnant" dei trigliceridi particolarmente ricchi in colesterolo. E' quindi difficile separare il rischio CVD associato a basse concentrazioni di colesterolo HDL da quello associato ad altre anormalità lipoproteiche concomitanti (8).

**Questo articolo è stato tradotto con il permesso dell'American Association for Clinical Chemistry (AACC). AACC non è responsabile della correttezza della traduzione. Le opinioni presentate sono esclusivamente quelle degli Autori e non necessariamente quelle dell'AACC o di Clinical Chemistry. Tradotto da Clin Chem 2011;57:392-410 su permesso dell'Editore.*
*Copyright originale © 2011 American Association for Clinical Chemistry, Inc. In caso di citazione dell'articolo, riferirsi alla pubblicazione originale in Clinical Chemistry.*

Le particelle HDL sono eterogenee per dimensione e composizione. Nonostante la congruenza di molti dati epidemiologici che suggeriscono un ruolo cardioprotettivo per il colesterolo HDL, c'è ancora molto da conoscere relativamente alle proprietà antiaterogeniche e antitrombotiche delle diverse particelle che vengono raggruppate in questa classe lipoproteica. Alcune delle caratteristiche anti-aterosclerotiche delle HDL sono legate al trasporto inverso del colesterolo, all'ossidazione e all'infiammazione (9, 10). Numerose mutazioni genetiche possono coinvolgere la struttura e la funzione delle HDL, ma non è chiaro quale impatto abbiano sul rischio CVD (11). Inoltre, lo sviluppo di strategie diagnostiche e di trattamento rivolte al metabolismo delle HDL deve considerare non solo la concentrazione assoluta del colesterolo HDL, ma anche le proprietà funzionali delle diverse particelle HDL (10, 12).

I metodi per la misura e la valutazione della composizione e della funzione delle sottofrazioni di HDL potrebbero rivelarsi superiori al colesterolo HDL nella capacità predittiva del rischio di CVD (10, 13, 14). Diventa così evidente la necessità di proporre una nuova visione complessiva, che includa e chiarisca le diversità di struttura, composizione e funzione di queste particelle.

In questo articolo discuteremo i vantaggi e gli svantaggi dei metodi analitici oggi disponibili per la misura delle HDL, con uno sguardo ai nuovi metodi in grado di caratterizzare le HDL sulla base delle loro eterogeneità fisico-chimiche e funzionali. Esiste un crescente bisogno di capire, validare e quantificare i diversi ruoli giocati dalle particelle HDL nel processo aterosclerotico al fine di migliorare diagnosi, prevenzione e trattamento della CVD (9, 10). Lo scopo di questo articolo è quello di servire come base per il miglioramento della comprensione della fisiopatologia dell'aterosclerosi e di indirizzare il futuro corso delle ricerche e il disegno di tipologie di intervento effettivamente in grado di ridurre il rischio CVD residuo in diverse tipologie di pazienti. Infine, intendiamo presentare una nomenclatura uniforme per le sottofrazioni HDL e proporre un paradigma per definire il processo dinamico del metabolismo HDL attraverso misure di laboratorio multiple. Siamo consapevoli che i diversi metodi per quantificare le HDL misurano differenti proprietà fisico-chimiche delle HDL stesse e che l'uso di misure statiche per valutare un processo dinamico ha limitazioni intrinsiche, ma è da riconoscere che l'attuale nomenclatura utilizzata per le sottoclassi HDL è inconsistente e che esiste la necessità di una visione uniforme che permetta al clinico e al ricercatore di correlare tra di loro i diversi metodi all'interno di un quadro complessivo funzionale.

## COLESTEROLO HDL E RISCHIO CARDIOVASCOLARE

Il contenuto di colesterolo delle HDL è convenzionalmente utilizzato per valutare le diverse funzioni delle particelle HDL, sia quelle anti-aterotrombotiche che quelle immuno-relate. L'utilizzo del colesterolo HDL nella pratica clinica deriva in parte dal suo utilizzo quale componente principale della formula di Friedewald per la stima del colesterolo LDL (15).

Il colesterolo HDL è stato studiato quale marcatore di rischio in 68 studi di popolazione di lunga durata, che hanno coinvolto più di 300.000 individui (16). Nei modelli multivariati, il colesterolo HDL è risultato inversamente associato con eventi CVD dopo aggiustamento sia per i fattori di rischio non lipidici che per quelli lipidici (trigliceridi e colesterolo non-HDL). Ad ogni aumento di 0,39 mmol/L (15 mg/dL) di colesterolo HDL si associava una riduzione del rischio di un evento CVD del 22% (un intervallo di confidenza 95%, 18%-26%). Basse concentrazioni di colesterolo HDL predicono la mortalità CVD nella stessa misura sia nei pazienti diabetici che in quelli non diabetici (17).

L'evidenza dell'utilità del colesterolo HDL come marcatore di rischio nei pazienti trattati con farmaci ipolipidemizzanti non è univoca e dipende dall'aggiustamento eseguito per le variabili associate. In una metanalisi che ha coinvolto 90.056 partecipanti da 14 studi clinici randomizzati per il trattamento con statine (inibitori di idrossi-metil-glutaril coenzima A reduttasi), i ricercatori della "Cholesterol Treatment Trialists' Collaboration" riportano gli effetti proporzionali di diversi fattori di rischio prognostici (incluso il colesterolo HDL), misurati basalmente, sugli eventi vascolari (18). L'incidenza a 5 anni di eventi CVD maggiori era più alta negli individui con le concentrazioni di colesterolo HDL più basse. L'uso delle statine riduceva il rischio di eventi CVD del 22% negli individui nel terzile più basso di colesterolo HDL [<0,9 mmol/L (35 mg/dL)] e del 21% negli individui nei terzili mediano [0,9-1,1 mmol/L (35-42 mg/dL)] e superiore [≥1,1 mmol/L (42 mg/dL)]. I partecipanti con le concentrazioni di colesterolo HDL più basse avevano il rischio assoluto più alto (22,7%, 18,2% e 14,2% per i terzili basso, medio e alto, rispettivamente) e presentavano quindi la maggiore riduzione assoluta del rischio.

Analogamente, le concentrazioni di colesterolo HDL misurate durante lo studio sono predittive di eventi CVD ricorrenti nella maggior parte degli studi clinici prospettici (7, 19). L'aumento del rischio associato con le basse concentrazioni di colesterolo HDL persiste anche nei pazienti trattati con statine con colesterolo LDL <1,8 mmol/L (70 mg/dL). Tuttavia, questo concetto è stato recentemente messo in discussione in una metanalisi di 95 studi che hanno coinvolto quasi 300.000 individui; questi risultati suggeriscono che le concentrazioni di colesterolo HDL misurate durante lo studio non sono correlate in modo significativo agli eventi CVD (20). Le limitazioni dello studio includevano sia il fatto di aver utilizzato i dati complessivi piuttosto che i dati dei singoli partecipanti agli studi e il fatto di non aver considerato le concentrazioni dei trigliceridi all'arruolamento. Inoltre, la maggioranza degli studi inclusi in questa metanalisi presentava una minima (<3%) differenza nelle concentrazioni di colesterolo HDL tra i gruppi di trattamento, mentre la variabilità analitica dei metodi diretti per la misura del colesterolo HDL è spesso >10% (21).

Considerato il fatto che gli individui a rischio elevato sono spesso trattati con statine, una determinazione delle HDL che vada al di là del suo contenuto in colesterolo potrebbe fornire informazioni più utili per la stratificazione del rischio negli individui potenzialmente a rischio elevato e particolarmente nei pazienti trattati con terapia ipolipidemizzante.

## LIMITI DEI METODI DI MISURA DEL COLESTEROLO HDL

I primi metodi per la misura del colesterolo HDL prevedevano una ultracentrifugazione preparativa per l'isolamento delle HDL con densità tra 1,063 e 1,21 g/mL (22). Solo dopo l'avvento, nei primi anni '70, dei metodi di precipitazione selettiva, con reagenti quali il destran-solfato, è diventato possibile misurare il colesterolo HDL nei laboratori clinici. Negli ultimi 10 anni, la maggior parte dei laboratori ha adottato metodi diretti (omogenei) che non impiegano la separazione fisica delle HDL dalle altre lipoproteine. Esistono al momento 7 diversi metodi diretti, che utilizzano approcci differenti per mascherare o per eliminare selettivamente il colesterolo delle frazioni lipoproteiche non-HDL (Tabella 1). I metodi diretti sono totalmente automatizzabili, precisi e richiedono molto meno impegno da parte del laboratorio. Per questo motivo hanno largamente soppiantato i metodi precedenti. Resta tuttavia da chiarire se i metodi diretti abbiano la stessa validità clinica dei metodi chimici di precipitazione (23-25). In uno studio recente di 175 soggetti con diversi disordini lipidici, nessuno degli attuali 7 metodi diretti è stato in grado di raggiungere l'obbiettivo di errore totale minimo <12%, come stabilito dal "National Cholesterol Education Program" (21). E' stato inoltre dimostrato che i risultati poco accurati di colesterolo HDL forniti dai metodi diretti potevano compromettere una classificazione accurata del rischio CVD basata sul colesterolo LDL calcolato.

**Tabella 1**
*Metodi commercialmente disponibili per il colesterolo HDL*

*Precipitazione*

- Eparina-$Mn^{2+}$
  - 0,46 mmoL (metodo "Lipid Research Clinics")
  - 0,92 mmoL (per plasma EDTA)
- Destran-solfato (50 kDa) $Mg^{2+}$ (metodo di confronto designato)
- Fosfotungstato-$Mg^{2+}$
- Glicole polietilenico (non precipita le HDL ricche in apo E)

*Precipitazione facilitata*

- Polymedco (sfere magnetiche coniugate con destran solfato-$Mg^{2+}$)

*Diretti (metodi omogenei)*

- Denka Seiken (eliminazione selettiva)
- Kyowa Medex (glicole polietilenico-enzimi modificati/ciclodestrine)
- Sekisui Medical (ex Daiichi) (polimeri sintetici/detergenti)
- Serotec
- Sysmex International Reagents (immunoinibizione)
- UMA
- Wako Pure Chemical Industries (immunoinibizione)

## CLASSIFICAZIONE DELLE HDL IN BASE ALLE PROPRIETÀ FISICO-CHIMICHE

### Ultracentrifugazione analitica

I primi metodi utilizzati per la quantificazione delle HDL prevedevano una ultracentrifugazione associata ad un metodo in grado di registrare le variazioni dell'indice di rifrazione (metodo "schlieren"). Verso la fine degli anni '40, Gofman et al., presso il Laboratorio Donner a Berkeley, California, identificarono le sottoclassi HDL in base alla dimensione e alla densità delle particelle ottenuta dalla velocità di flottazione ultracentrifugale ($F_{1.2}$) in una soluzione a concentrazione salina elevata (26). Questi studi permisero di stabilire che la maggior parte delle particelle HDL hanno una densità di flottazione compresa tra 1,063 e 1,21 g/mL, ponendo le basi per l'isolamento delle HDL mediante ultracentrifugazione preparativa standard (21, 26) (Figura 1). Inoltre, le HDL3 più piccole e dense ($F_{1.2}$ 0-3,5) erano ben distinguibili dalle HDL2 ($F_{1.2}$ 3,5-9), più grandi e leggere, sulla base di una distinta "spalla" nel profilo delle frazioni ottenuto con metodo "schlieren". Le HDL più grandi ($F_{1.2}$ 9-20), denominate HDL1, sono poco rappresentate nella maggior parte degli individui. Usando i principi della fisica, abbiamo convertito i profili ultracentrifugali

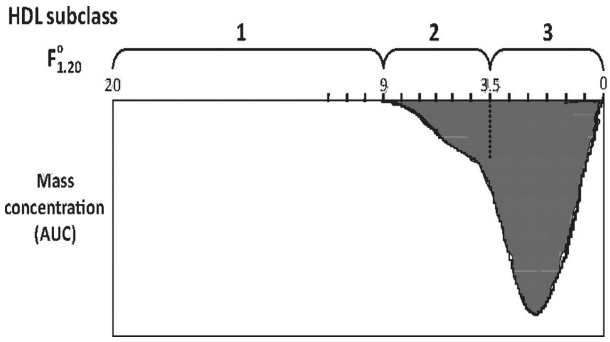



**Figura 1**
*Frazionamento delle HDL con ultracentrifugazione analitica. Le sottoclassi maggiori sono separate in base alle velocità di flottazione in una soluzione salina di densità 1,2 g/mL ($F_{1.2}$) e la massa totale, rappresentata dall'area sotto la curva (AUC) viene determinata in base alla variazione dell'indice di rifrazione (metodo "schlieren") usando i principi della fisica. Inizialmente, sono state identificate 3 sottoclassi maggiori. HDL1, che presenta la più elevata velocità di flottazione, non è generalmente presente in concentrazioni misurabili nel plasma umano. Una procedura di interpolazione della curva è stata successivamente sviluppata per identificare 2 sottoclassi di HDL2 (HDL2a e HDL2b).*

dell'indice di rifrazione in concentrazione di massa di particelle lipoproteiche. Questo metodo, che costituisce il "gold standard", è stato il primo a essere utilizzato in uno studio prospettico per dimostrare la correlazione inversa tra la concentrazione plasmatica di HDL e il rischio CVD (27). Recentemente, i risultati di un "follow-up" a lungo termine (29 anni) di 1905 uomini arruolati in questo studio hanno dimostrato che sia HDL2 che HDL3 sono indipendentemente correlate con il rischio CVD (28).

### Elettroforesi in gradiente di gel senza denaturazione

L'elettroforesi in gradiente di gel unitamente a una lettura densitometrica automatizzata è stata utilizzata nel 1981 da Nichols et al. presso il Donner Laboratory per identificare 5 sottospecie di HDL separabili sulla base del diametro della particella: HDL3c (7,2-7,8 nm), HDL3b (7,8-8,2 nm), HDL3a (8,2-8,8 nm), HDL2a (8,8-9,7 nm) e HDL2b (9,7-12,9 nm) (Figura 2) (29) . I risultati di studi successivi hanno indicato che la sottoclasse HDL2b, che è particolarmente correlata con il colesterolo HDL totale, era la classe più strettamente correlata al rischio CVD (30) e che l'aumento di HDL3b era associato a un fenotipo lipoproteico aterogenico, caratterizzato dall'aumento di trigliceridi e di LDL piccole e dense, e dalla diminuzione di HDL2b (31). Come descritto più avanti, l'uso dell'elettroforesi bidimensionale (2-D) ha dimostrato che le particelle HDL2b sono associate inversamente e in modo indipendente al rischio CVD (32).

## SEPARAZIONE DELLE LIPOPROTEINE PLASMATICHE IN GRADIENTE DI DENSITÀ

Il frazionamento preciso e riproducibile delle maggiori sottopopolazioni di particelle HDL plasmatiche (HDL2b, -2a, -3a, -3b, -3c) è basato su una centrifugazione in gradiente di densità (equilibrio isopicnico, metodo sviluppato da Chapman et al. (Figura 3) (33-36). Il gradiente è costituito dalla stratificazione consecutiva di 4 soluzioni saline di densità distinte, aggiustate accuratamente alla medesima temperatura della separazione ultracentrifugale (+15 °C) nella provetta di un rotore ad angolo variabile. Il maggiore svantaggio di questo metodo è quello riscontrato in altre separazioni ultracentrifugali: considerato che le lipoproteine sono sottoposte sia a forze ioniche elevate che alla forza centrifugale (mediamente 57 x $10^7$ g/min), le forze trasversali sono ridotte dall'adozione di un rotore ad angolo variabile.

### Profilo analitico verticale

Il profilo verticale (VAP) è un altro metodo di frazionamento delle HDL, basato sull'ultracentrifugazione (37). Diversamente dalla maggior parte degli altri metodi ultracentrifugali, VAP è eseguito in un rotore verticale, che rende il metodo relativamente veloce e più pratico per l'analisi di campioni clinici. Relativamente alle HDL, VAP misura il contenuto in colesterolo delle due classi maggiori, HDL2 e HDL3 (38). VAP è relativamente preciso, con CV intra-metodo che variano tra 4% e 10% (39).

Sono disponibili pochi studi che abbiano confrontato il metodo VAP con altre metodiche di frazionamento delle frazioni lipoproteiche, ma fino a ora i risultati di questi studi hanno dimostrato uno scarso accordo fra metodi (40). Questo non è tuttavia sorprendente considerata la mancanza di standardizzazione dei diversi metodi di frazionamento e anche il fatto che i diversi metodi di frazionamento lipoproteico sono basati su differenti proprietà fisico-chimiche delle HDL.

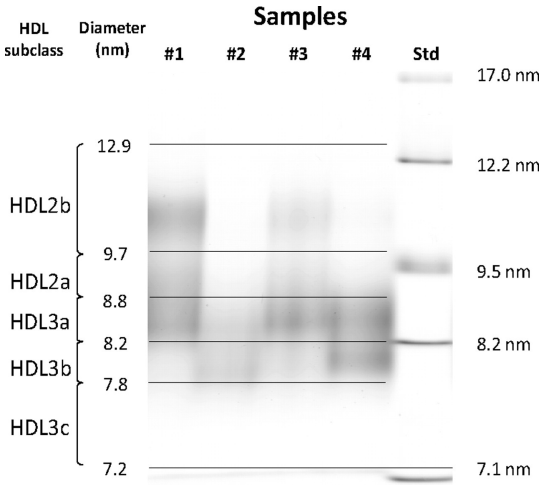



**Figura 2**

*Sottoclassi HDL in 4 campioni di plasma separate con elettroforesi in gradiente di gel senza denaturazione. Le HDL sono isolate dal plasma con ultracentrifugazione a una densità di 1,21 g/mL e sottoposte a elettroforesi in un gradiente di gel da 4% a 30%, senza denaturazione. Dopo colorazione delle proteine con Coomassie Blue e lettura densitometrica dei gel, la dimensione delle particelle viene determinata in base agli standard proteici (corsia di destra). Questa procedura è in grado di risolvere fino a 5 sottoclassi, sebbene la più piccola, HDL3c, sia generalmente presente in bassa concentrazione.*

*Std, standard.*

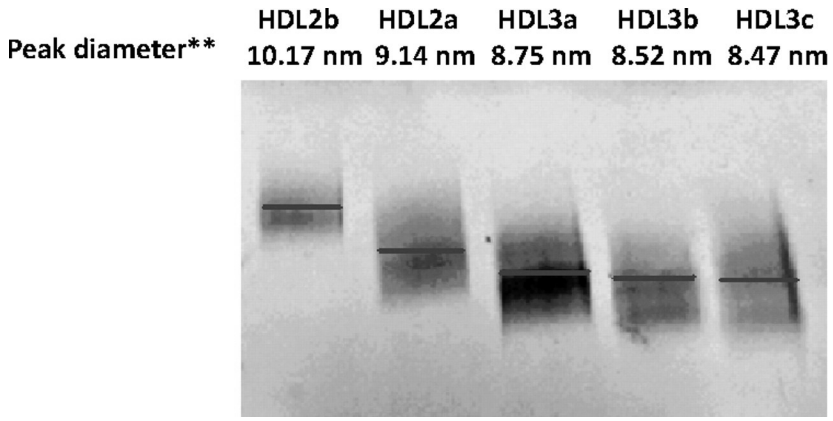



**Figura 3**
*Esempi di profili elettroforetici e dimensioni medie delle sottoclassi HDL da plasma umano normolipidemico separate mediante singola ultracentrifugazione isopicnica in gradiente di densità [l'elettroforesi era eseguita in gradiente di poliacrilammide (4%-20%) senza denaturazione]. Il campione di plasma o siero (3 mL), aggiustato a una densità di 1,21 g/mL, viene stratificato su un cuscino costituito da una soluzione di NaCl-KBr di densità 1,24 g/mL posta alla base del tubo con il gradiente; il gradiente discontinuo viene poi completato stratificando su questo ulteriori soluzioni a densità di 1,063, 1,019 e 1,006 g/mL. La procedura prevede una sola ultracentrifugazione, permette un recupero semi-quantitativo di frazioni HDL di definite densità idrata e proprietà fisico-chimiche, evita contaminazioni importanti con le proteine plasmatiche e facilita l'isolamento delle HDL in uno stato non denaturato e non ossidato. I gradienti sono disposti con una pipetta di precisione a partire dal menisco inferiore, evitando così la contaminazione con le proteine plasmatiche >1,25 g/mL presenti nel residuo alla base del tubo. I diametri dei picchi vengono determinati al massimo di intensità di assorbimento di ogni banda usando i filtri del "software" Kodak 1D e colorando poi con Coomassie Brilliant Blu.*
*** Il calcolo della dimensione con colorazione negativa mediante microscopia elettronica fornisce stime più piccole (diametro medio di HDL2b + HDL2a 9,6 nm, intervallo 10,8-7,2 nm; diametro medio di HDL3a + HDL3b + HDL3c 7,3 nm, intervallo 9,0-5,4 nm) in quanto riflette uno stato non idrato.*

## Elettroforesi bidimensionale su gel

Le HDL possono essere separate sulla base della loro dimensione e carica elettrica (Figure 4 e 5) (13, 41). Le concentrazioni di queste particelle sono espresse in mg/L di apolipoproteina A-I (apo AI) e come percentuale della concentrazione plasmatica totale di apo AI. Sono state identificate cinque particelle maggiori di HDL: (a) piccoli precursori discoidali di HDL con mobilità pre-β (HDL pre-β-1, con diametro di circa 5,6 nm), che contengono apo AI e fosfolipidi; (b) HDL discoidali molto piccole con mobilità α (HDL α-4, con diametro di circa 7,4 nm), che contengono apo AI, fosfolipidi e colesterolo libero; (c) piccole HDL sferiche con mobilità α (HDL α-3, con diametro di circa 8 nm), che contengono apo AI, apo AII, fosfolipidi, colesterolo libero, colesterolo esterificato e trigliceridi; (d) HDL sferiche di medie dimensioni con mobilità α (HDL α-2, con diametro di circa 9,2 nm), che contengono gli stessi costituenti delle HDL α-3; e (e) HDL sferiche di grandi dimensioni con mobilità α (HDL α-1), che contengono gli stessi costituenti delle HDL α-3 e α-2, eccettuata la quasi totale assenza di apo AII (Figura 4). Adiacenti alle particelle α ci sono particelle a mobilità pre-α che hanno dimensioni simili, ma sono presenti in concentrazioni minori e non contengono apo AII. In più ci sono grandi HDL a mobilità pre-β, conosciute come HDL pre-β-2 (42).

Le particelle HDL pre-β-1 sono le più efficienti nell'interazione con il trasportatore A1 legante ATP (ABCA1) al fine di promuovere l'efflusso di colesterolo dalla cellula, mentre le grandi HDL α-1 sono le più efficienti nell'interazione con i recettori "scavenger" B1 epatici per la cessione del colesterolo al fegato (43, 44). Le HDL α-3, di dimensioni intermedie, sono le più efficienti nell'interazione con il trasportatore G1 (ABCG1) al fine di promuovere l'efflusso di colesterolo dalla cellula sulle HDL sferiche contenenti sia apo AI che apo AII (44). Le HDL delipidate o l'apo $AI_{Milano}$ complessata con fosfolipidi, che hanno dimostrato essere in grado di promuovere una regressione dell'aterosclerosi se infuse, sono costituite da particelle HDL pre-β-1. Esistono altre particelle HDL contenenti apo E ma non apo AI (HDL molto grandi a migrazione pre-β) e piccole HDL contenenti apo AIV ma non apo AI (43). La funzione di queste ultime non è stata ancora del tutto chiarita.

L'elettroforesi 2-D del plasma seguita da immunoblotting per apo AI consente una diagnosi accurata dei disordini del metabolismo delle HDL. Il deficit di apo AI si caratterizza per l'assenza di particelle HDL contenenti apo AI; i pazienti con deficit di apo AI sviluppano frequentemente xantomi e precoce CVD (46). Apo AI è pressoché assente nella malattia di Tangier, che è caratterizzata da un deficit funzionale del trasportatore ABCA1 e da deposizione di esteri del colesterolo nei macrofagi in tutto il corpo. Questi pazienti possiedono solo particelle HDL pre-β-1 e presentano frequentemente prematura CVD (47). I pazienti con deficit familiare di lecitin:colesterol acil transferasi (LCAT) presentano solamente particelle HDL pre-β-1 e α-4, incapacità di esterificare il colesterolo e possono sviluppare una severa opacità corneale, aumento del colesterolo LDL e insufficienza renale (41). I pazienti con deficit di lipoprotein lipasi presentano ipertrigliceridemia marcata

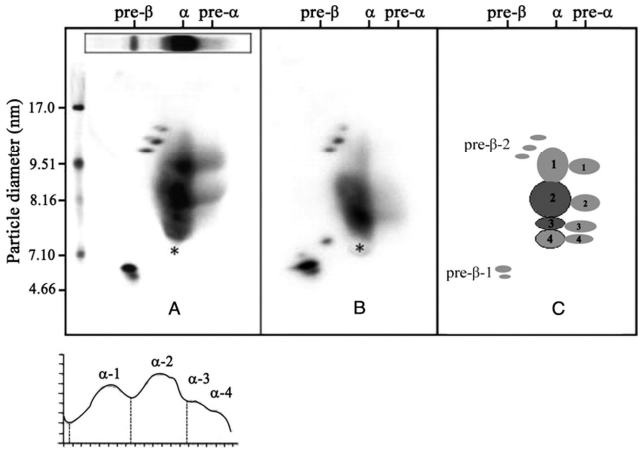



**Figura 4**

*Gel elettroforesi bidimensionale.*

*Profili delle sottoclassi HDL contenenti apolipoproteina (apo) A-I di un paziente con malattia coronarica (CHD) (A) e di un individuo sano (B); a destra viene mostrato un diagramma schematico di tutte le particelle HDL contenenti apo A-I. Sotto il riquadro A è mostrata la scansione densitometrica delle particelle HDL migranti in zona α, indicante la presenza in questa zona di 4 particelle HDL con diametro medio compreso tra quello delle HDL α-1 molto grandi (11,0 nm) a quello delle HDL pre-β-1 molto piccole (5,6 nm). Nel diagramma a destra le particelle contenenti apo A-I migranti in zona α-2 (9,2 nm di diametro) e in regione α-3 (8,1 nm di diametro) contengono sia apo A-I che apo A-II (in grigio scuro), mentre tutte le altre particelle contenenti apo A-I, incluse le piccole HDL α-4 (7,4 nm di diametro), non contengono quantità apprezzabili di apo A-II (in grigio più chiaro). L'asterisco identifica l'albumina sierica o il fronte α. Sulla base della loro composizione le HDL pre-β-1 molto piccole e le piccole HDL α-4 sono particelle discoidali che non contengono esteri del colesterolo o trigliceridi, mentre le HDL α-3, α-2 e α-1, medie, grandi e molto grandi, sono sferiche e contengono esteri del colesterolo e trigliceridi nel loro core. Generalmente, i pazienti con CHD non trattati tendono ad avere una diminuzione significativa dei livelli di apo A-I nelle HDL molto grandi e grandi migranti in zona α e un modesto aumento di apo A-I nelle HDL molto piccole migranti in zona pre-β-1 e nelle piccole HDL migranti in zona α-4. Nel pannello C, 1,2,3 e 4 sono riferiti rispettivamente a α-1, α-2, α-3 e α-4. Da Asztalos et al., Arterioscler Thromb Vasc Biol 2000;20:2670.*

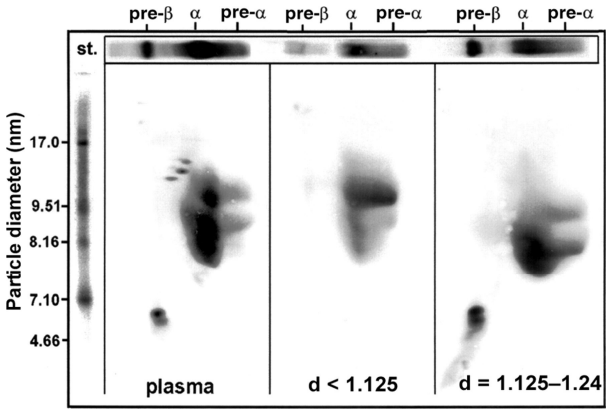



**Figura 5**

*Tracciati di elettroforesi bidimensionale dopo immunoblotting per apolipoproteina (apo) A-I.*

*I tracciati relativi al plasma intero sono mostrati nel riquadro di sinistra, quelli relativi alle lipoproteine di densità (d) <1,125 g/mL separate con ultracentrifugazione nel riquadro di centro e quelli relativi alle lipoproteine di densità 1,125-1,24 g/mL nel riquadro di destra. Questi dati indicano che le HDL contenenti apo A-I di densità <1,125 g/mL includono la maggior parte delle HDL molto grandi e grandi migranti in zona α, mentre le particelle HDL contenenti apo A-I di densità 1,125-1,24 g/mL includono la maggior parte delle HDL medie e piccole migranti in zona α e le HDL molto piccole migranti in zona pre-β.1. Da Asztalos et al., Arterioscler Thromb Vasc Biol 2000;20:2670.*

che li pone a elevato rischio di pancreatite. Questi pazienti presentano anche basse concentrazioni di colesterolo HDL che è trasportato solamente nelle particelle HDL pre-β-1 e α-4 (48). I pazienti con deficit di lipasi epatica presentano concentrazioni aumentate di lipoproteine "remnant", una diminuzione delle particelle HDL α-2 e aumentato rischio di CVD prematura (48). I pazienti con deficit della proteina di trasferimento degli esteri del colesterolo (CETP) presentano particelle HDL α molto grandi contenenti apo AI, apo AII e apo E (49). La

presenza di apo E in queste grandi HDL potrebbe essere importante al fine di facilitare l'efflusso di colesterolo attraverso il trasportatore ABCG1.

Quando, la concentrazione di apo AI nelle HDL α-1 è <140 mg/L, il soggetto è a rischio aumentato di sviluppare CVD (32). I pazienti con CVD spesso presentano piccole HDL discoidali e poche grandi particelle HDL α-1 e α-2. La concentrazione di queste particelle si è dimostrata superiore alla concentrazione di colesterolo HDL nel predire il rischio CVD (50, 51).

Le grandi particelle α-1 aumentano con la perdita di peso, l'uso di niacina, di alcune statine (atorvastatina, rosuvastatina) e degli inibitori di CETP (52-57). L'aumento delle concentrazioni di apo AI nelle particelle HDL α-1 a valori maggiori di 200 mg/L, ottenuto con una terapia combinata di simvastatina e niacina, è stato associato alla mancata progressione (e in alcuni individui alla regressione) dell'aterosclerosi coronarica (51).

## CONCENTRAZIONE DELLE PARTICELLE HDL

### Spettroscopia da risonanza magnetica nucleare (NMR)

A differenza degli altri metodi di analisi delle particelle HDL, la spettroscopia NMR non richiede una fase di separazione fisica, in quanto i protoni (i nuclei degli atomi di idrogeno) all'interno di lipoproteine di diversa dimensione presentano una peculiarità magnetica naturale che deriva dalla loro specifica struttura fisica (58). Di conseguenza, lipoproteine di diversa dimensione nel plasma o siero nativi producono segnali NMR lipidici che sono distinguibili tra di loro perchè hanno frequenze caratteristiche (Figura 6, parte sinistra) (59, 60). Le frequenze dei segnali NMR (spostamento chimico) delle sottopopolazioni HDL sono particolarmente ben differenziate se confrontate con quelle delle sottoclassi LDL e VLDL (Figura 6, parte destra).

I segnali NMR delle lipoproteine che vengono utilizzati per la loro quantificazione sono quelli ottenuti dai protoni dei gruppi metilici terminali dei lipidi, in quanto questi non reagiscono con e non sono quindi influenzati dagli acidi grassi e da altre differenze della composizione chimica lipoproteica (60). Inoltre, con buona approssimazione, il numero dei protoni metilici in una particella lipoproteica di un dato diametro è costante anche in presenza di variazioni significative di contenuto di esteri del colesterolo e trigliceridi nel core della particella. Queste proprietà rendono le ampiezze del segnale metilico delle sottoclassi direttamente proporzionali al numero di particelle presenti nelle sottoclassi stesse e consentono di fornire in unità di numero di particelle (μmol/L) la concentrazione di HDL ottenuta con NMR (60). Sebbene l'analisi NMR fornisca

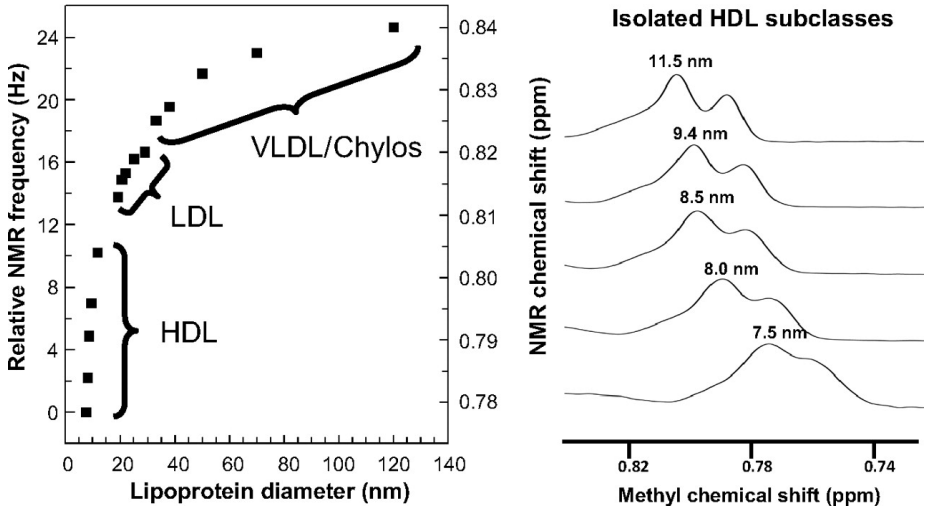



**Figura 6**

*Spettroscopia da risonanza magnetica nucleare (NMR).*

*Relazione del diametro delle sottoclassi lipoproteiche con lo spostamento chimico NMR del gruppo metilico dei lipidi e relativa frequenza (sinistra) e forma della linea di segnale e spostamento chimico di 5 sottoclassi isolate di HDL isolate di diverso diametro (destra). La differenziazione magnetica naturale delle particelle lipoproteiche di diversa dimensione rende teoricamente possibile usare qualsiasi strumento di NMR in qualsiasi laboratorio per l'analisi delle lipoproteine, ma in pratica queste analisi richiedono strumentazione dedicata. Il segnale NMR nelle diverse sottoclassi si sovrappone in maniera significativa, rendendo necessarie elaborazioni di calcolo per la "deconvoluzione" del segnale plasmatico NMR al fine di estrarre le ampiezze dei segnali delle sottoclassi che vengono usati per calcolare la concentrazione delle stesse. Una deconvoluzione accurata e riproducibile del segnale è possibile solo se le condizioni NMR (come la forza del campo magnetico e la temperatura) usate per generare la libreria dei segnali di riferimento delle sottopopolazioni sono identiche alle condizioni utilizzate successivamente per misurare (in ~1 min) ogni campione da paziente. Il metodo NMR LipoProfile-3 utilizzato da LipoScience costruisce i segnali plasmatici come somma dei segnali singoli di 26 diverse sottopopolazioni HDL, come pure di 47 sottopopolazioni di LDL, VLDL e chilomicroni (Chylos). Data la limitata precisione di misura delle concentrazioni derivate di ognuna delle molte sottopopolazioni, queste vengono usualmente raggruppate a scopo di refertazione in categorie di sottoclassi "grandi", "medie" e "piccole".*

una nuova modalità di quantificare le particelle HDL, potenzialmente vantaggiosa dal punto di vista clinico, il segnale metilico NMR non può, per sua stessa natura, fornire informazioni sulla composizione chimica delle HDL.

Gli attuali metodi NMR forniscono il segnale del plasma come somma dei segnali di 26 sottopopolazioni di HDL e di 47 sottopopolazioni di LDL, VLDL e chilomicroni. Data la limitata precisione della misura della concentrazione di ognuna delle molte sottopopolazioni di particelle lipoproteiche, queste vengono raggruppate nella refertazione in sottoclassi "grandi", "medie" e "piccole". A scopo di ricerca, non è difficile produrre raggruppamenti diversi delle 26 sottopopolazioni delle HDL per renderle più simili a quelle fornite da altri metodi analitici, quali l'ultracentrifugazione in gradiente di densità e l'elettroforesi in gradiente di gel.

Sono in corso studi volti a stabilire la relazione con il rischio CVD delle concentrazioni delle particelle HDL determinate con NMR, delle sottoclassi di HDL (grandi HDL, 9,4-14 nm; medie HDL 8,2-9,4 nm; e piccole HDL, 7,3-8,2 nm) e della dimensione delle particelle HDL. Tra gli studi pubblicati, alcuni hanno documentato un'associazione con età e sesso (61, 62), longevità (63), insulino-resistenza e diabete (64-67), CVD (62, 68-74), modificazioni derivate dall'esercizio fisico (75) e trattamenti con vari tipi di farmaci (76-84). Una considerazione importante quando si interpreta il significato clinico dell'associazione univariata di una specifica malattia con le singole sottoclassi HDL o le dimensioni delle particelle HDL riguarda l'effetto confondente che deriva dalla forte correlazione inversa tra le sottoclassi HDL piccole e grandi e dalla ancor più importante associazione inversa tra le grandi particelle HDL (e la loro dimensione) e la concentrazione totale delle LDL (specialmente delle piccole LDL) (60, 65, 74). Senza analisi statistiche che considerino questi effetti confondenti è possibile arrivare a conclusioni errate circa importanza clinica e le potenziali diversità funzionali tra le sottoclassi HDL (62, 73, 74).

### Mobilità ionica

La mobilità ionica, un metodo basato sulla mobilità elettroforetica differenziale in fase gassosa delle macromolecole, è stata sviluppata da Benner et al. presso il "Lawrence Berkeley National Laboratory" (85). In questa procedura ad alta produttività, la dimensione delle lipoproteine è determinata in base ai principi della fisica e le particelle vengono contate direttamente dopo averle rese di carica uguale e separate per mezzo del tempo di volo attraverso un gradiente di voltaggio. La contaminazione da parte dell'albumina della regione delle HDL viene in precedenza ridotta mediante incubazione con blu-destrano e una breve ultracentrifugazione in assenza di sali. Nella configurazione attuale, il metodo è ottimizzato per separare le HDL2b dalle HDL più piccole; sono in corso miglioramenti per separare e misurare le sottoclassi HDL2a e le HDL3. Nello studio prospettico "Malmo Diet and Cancer Study", questo metodo ha recentemente dimostrato che le grandi HDL2b sono marcatamente e inversamente correlate con il rischio CVD (86). L'associazione di queste grandi particelle HDL con il rischio CVD è correlata con la loro inclusione in due componenti principali indipendenti determinate dalla misura di mobilità ionica di tutte le frazioni lipopoteiche. Uno di questi corrisponde al fenotipo lipoproteico aterogenico, che comprende un aumento delle concentrazioni di trigliceridi e LDL piccole e dense, mentre il secondo include le particelle HDL più piccole. I risultati delle analisi genetiche eseguite in questo studio indicano che queste componenti hanno determinanti sottostanti differenti e questo può indicare due meccanismi indipendenti per l'effetto cardioprotettivo delle HDL.

## L'ETEROGENEITÀ DELLE PARTICELLE HDL VISTA ATTRAVERSO LA COMPOSIZIONE LIPIDICA E PROTEICA: APO AI E RISCHIO CARDIOVASCOLARE

Apo AI è la proteina più rappresentata nelle HDL ed è sintetizzata dalle cellule epatiche e intestinali (87, 88). Apo AI è stata considerata un biomarcatore più accurato rispetto al colesterolo HDL sulla base della sua funzione di mediatore della mobilizzazione del colesterolo dalle cellule periferiche, macrofagi delle arterie inclusi, mediata dal trasportatore ABCA1. Studi iniziali avevano infatti suggerito che la misura di apo AI era superiore a quella del colesterolo HDL come marcatore di rischio (89, 90). Successivamente, queste due stime di HDL, colesterolo HDL e apo AI, sono state direttamente confrontate in due ampi studi di coorte (74, 91). Nel "European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition-Norfolk Study", che ha coinvolto 2349 individui, il rischio, aggiustato per fattori non lipidici, di un evento CVD maggiore è stato 0,78 (0,70-0,87) per il colesterolo HDL e 0,79 (0,71-0,87) per apo AI, per ogni variazione pari a 1 DS (74). Una recente analisi dei dati del "Women's Health Study" ha dimostrato che l'entità del rischio di un evento CVD maggiore era più elevata per bassi livelli di colesterolo HDL che di apo AI (91).

Tra gli individui ad alto rischio trattati con statine, le misure di apo AI durante lo studio forniscono informazioni incrementali sul rischio CVD rispetto al colesterolo HDL (92), mentre nei pazienti CVD stabili arruolati nello studio "Incremental Decrease in Endpoints through Aggressive Lipid Lowering" (IDEAL), queste misure forniscono dati prognostici equivalenti (74). Nel "Air Force-Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study", le basse concentrazioni di apo AI misurate durante lo studio dopo un anno erano predittive di eventi CVD maggiori, mentre nessun valore predittivo era dimostrato per le concentrazioni di HDL colesterolo (92). In contrasto, non si è osservata differenza tra le concentrazioni di colesterolo HDL e apo AI relativamente al rischio di eventi ricorrenti nei pazienti CVD in terapia con statine arruolati nello studio IDEAL (74) o nei pazienti CVD trattati con fibrati, arruolati nel "Veterans Administration HDL Intervention Trial" (VA-HIT) (71).

## DETERMINAZIONE DI APO AI

Dato che apo AI è una proteina abbondante nel siero umano, la sua misura è relativamente semplice sia con tecniche nefelometriche che turbidimetriche, disponibili su molte piattaforme analitiche di chimica clinica (93). Usualmente vengono aggiunti detergenti non ionici al tampone di reazione al fine di disgregare le HDL ed esporre così i siti antigenici di apo AI, cosa che attenua i problemi dovuti ai campioni torbidi. Come potenziali biomarcatori di rischio CVD sono state considerate anche le forme ossidate di apo AI e questo può servire di stimolo per una riconsiderazione del valore di apo AI nella valutazione del rischio cardiovascolare (94-96).

## CLASSIFICAZIONE DELLE HDL SULLA BASE DELLA COMPOSIZIONE APOPROTEICA DELLE PARTICELLE LIPOPROTEICHE

Le lipoproteine plasmatiche possono essere separate e classificate sulla base della loro composizione apolipoproteica. Alaupovic et al. hanno utilizzato la composizione apolipoproteica quale base per la separazione delle lipoproteine plasmatiche umane in particelle diverse: lipoproteine B (LpB) (LpB, LpB:C, LpB:C:E), lipoproteine A (LpA) (LpAI, LpAII, LpAI:AII), lipoproteine C (LpC) (LpCI:CII:CIII), lipoproteine E (LpE) e lipoproteine D (LpD) (97, 98).

### Particelle apo AI e apo AI:AII

LpAI e LpAI:AII sono le maggiori lipoproteine HDL, contenendo rispettivamente circa il 35% e il 65% della apo AI plasmatica (99). LpAI viene inizialmente secreta come un complesso apo AI:fosfolipidi povero in lipidi, che interagisce con il trasportatore ABCA1 e facilita l'efflusso di colesterolo, formando così le HDL pre-ß (100). Il colesterolo nelle HDL pre-ß è esterificato dall'azione di LCAT, convertendo le particelle LpAI-pre-ß HDL in particelle LpAI-α HDL (100, 101). L'apo AII secreta dal fegato si associa con LpAI per formare LpAI:AII. Il ruolo di apo AII nel metabolismo delle HDL non è stato ancora definitivamente chiarito, sebbene sia stato riportato che apo AII rallenta il rimodellamento di HDL (102) e riduce la captazione di colesterolo da parte dei recettori "scavenger" epatici di classe B tipo I (SR-BI) (103). Le particelle LpAI e LpAI:AII che contengono α HDL guidano l'efflusso di colesterolo attraverso l'interazione con il trasportatore ABCG1 (104-106). In questo modo, un doppio meccanismo governa l'efflusso di colesterolo dalle cellule infarcite di colesterolo, coinvolgendo le particelle AI povere in lipidi che interagiscono con il trasportatore ABCA1 e le particelle più grandi LpAI/LpAI:AII che interagiscono con il trasportatore ABCG1 (107-111). Nel plasma, sia LpAI che LpAI:AII sono eterogenee e possono essere separate in sottofrazioni sulla base della composizione lipidica, della densità, della dimensione e della carica.

Il ruolo cardioprotettivo di LpAI e di LpAI:AII è controverso. Inizialmente era stato riportato che LpAI, ma non LpAI:AII, era in grado di promuovere l'efflusso di colesterolo dagli adipociti Ob1771 in cultura, suggerendo che LpAI, ma non LpAI:AII, fosse antiaterogenica (110). I risultati di studi clinici successivi, nei quali sono state valutate sia LpAI che LpAI:AII in pazienti CVD, hanno dimostrato una diminuzione del colesterolo HDL e di LpAI:AII e una diminuzione selettiva di LpAI negli individui con HDL colesterolo <40 mg/dL (1,03 mmol/L) (112). Nel "Etude Cas-Témoins sur l'Infarctus du Myocarde", LpAI era diminuita nei pazienti CVD dell'Irlanda del Nord; tuttavia, sia LpAI che LpAI:AII erano diminuite nei pazienti francesi (113). Nel "Prospective Epidemiologic Study of Myocardial Infarction", che ha esaminato 8784 individui francesi e nord irlandesi, la regressione logistica ha dimostrato che apo AI era un predittore più forte del colesterolo HDL, di LpAI e di LpAI:AII di rischio CVD (114). La quantificazione di LpAI e LpAI:AII negli studi "Framingham Offspring" e VA-HIT non era in grado di differenziare un sottogruppo di individui ad aumentato rischio di CVD dopo aggiustamento per fattori di rischio lipidici e non lipidici (32, 50). La variabilità dei risultati osservati nell'analisi di LpAI e LpAI:AII nei diversi studi clinici può sia riflettere una potenziale eterogeneità delle particelle HDL in diversi gruppi di pazienti come pure la diversità dei vari metodi usati per quantificare le sottoclassi HDL. Una conclusione generale che si può trarre da questi studi è che un aumento di colesterolo HDL che si accompagni a un aumento della sottoclasse di grandi HDL contenenti sia LpAI che LpAI:AII è associato a una diminuzione del rischio CVD, mentre la riduzione di LpAI povere in lipidi e di pre-ß HDL è associata a un aumento di rischio CVD (115).

Negli individui sani LpAI è catabolizzata più velocemente di LpAI:AII (116). I principali siti deputati al catabolismo della componente proteica di LpAI e LpAI:AII sono il fegato e il rene, e la maggior parte del colesterolo HDL è trasportato al fegato. Sono stati sviluppati modelli cinetici che tenessero in conto le diverse velocità di catabolismo di LpAI e LpAI:AII (117, 118). Queste diverse velocità di metabolismo sono state correlate alla diminuita abilità delle lipoproteine contenenti apo AI di riassociarsi alle particelle HDL dopo che gli esteri del colesterolo sono stati rilasciati al fegato attraverso i recettori SR-BI. Le particelle apo AI povere in lipidi, a differenza delle particelle HDL contenenti apo AII, sono rapidamente catabolizzate dal rene, producendo così un aumento della velocità relativa di catabolismo 119).

La mancanza genetica di LpAI plasmatiche dovuta a un difetto molecolare nell'apo AI dà luogo a un aumento di CVD (120-122), mentre il difetto genetico di apo AII, che origina un deficit di LpAI:AII, non è associato a un fenotipo clinico importante (11, 123). L'aumento del catabolismo di LpAI e LpAI:AII che porta a una diminuita concentrazione di colesterolo HDL è caratteristico della malattia di Tangier e del deficit di LCAT. Il deficit genetico del trasportatore ABCA1 (malattia di Tangier) è associato a un diminuito efflusso di colesterolo e scarsa assunzione di lipidi da parte delle particelle pre-ß HDL, dando luogo a un catabolismo accelerato di LpAI e a un aumento di CVD (124). In contrasto, nel deficit di LCAT

c'è un efficace efflusso di colesterolo dai macrofagi infarciti, seguito però da un deficit di maturazione delle pre-ß HDL a α HDL, un catabolismo accelerato, soprattutto di LpAI:AII ma anche di LpAI, e patologia renale, ma senza un aumento del rischio di CVD (125, 126). Una lipoproteina peculiare, LpAI:AII:E, con un catabolismo rallentato se confrontato con LpAI, è presente nei pazienti con deficit di CETP e marcato aumento delle concentrazioni plasmatiche di colesterolo HDL (127, 128). Un catabolismo ridotto di LpAI e LpAI:AII con concentrazioni di colesterolo HDL aumentate è presente anche nei pazienti trattati con inibitori di CETP (52). Concentrazioni plasmatiche diminuite di LpAI e LpAI:AII sono state misurate nei pazienti ipertrigliceridemici e sono dovute a un aumento del catabolismo di LpAI e LpAI:AII ricche di trigliceridi (129, 130).

Le statine sono associate a un modesto aumento delle concentrazioni di colesterolo HDL (5-7%) e questo è dovuto a complesse alterazioni del metabolismo di LpAI e LpAI:AII, che includono un'aumentata sintesi e un diminuito catabolismo di apo AI come pure una diminuzione dell'attività di CETP (131-133). Un'analisi del "database" Voyager, che include 37 studi clinici randomizzati comprendenti 32.258 pazienti, ha rivelato che le percentuali di aumento del colesterolo HDL e di apo AI correlate alla somministrazione di atorvastatina, simvastatina e rouvastatina sono simili (134). In altri studi clinici, la somministrazione di fenofibrato ha provocato un aumento della sintesi di apo AII e un minimo aumento di sintesi di apo AI; complessivamente predominano gli aumenti di LpAI:AII (131, 133, 135). Recenti studi di cinetica effettuati dopo somministrazione di niacina hanno dimostrato un aumento sia della sintesi che del catabolismo di apo AI e apo AII, con il risultato di produrre una formazione e un accumulo di grandi particelle LpAI e un aumento delle concentrazioni del colesterolo HDL (53).

## Apo E

Apo E è il ligando per il recettore LDL che presenta maggiore avidità e, come tale, guida il catabolismo e la "clearance" delle lipoproteine contenenti apo B (136, 137). Apo E è anche una proteina ben rappresentata nelle HDL, con funzioni specifiche all'interno delle stesse (138, 139). Ad esempio, i suini e i cani alimentati con una dieta ricca di grassi accumulano HDL grandi e ricche in apo E in grado di trasportare colesterolo al fegato direttamente attraverso l'interazione con il recettore per LDL (140, 141). In presenza di apo E, le HDL vanno incontro a una espansione del core della particella dovuta alla loro aumentata capacità di trasportare colesterolo (142). Inoltre, apo E interagisce con ABCA1 per estrarre colesterolo dalla cellula e guida la formazione di grandi particelle della dimensione delle HDL a partire dalle cellule schiumose macrofagiche (143, 144). Dato che la placca ateromasica è solo parzialmente permeabile ai soluti plasmatici, come apo AI, ma è ricca di proteine secrete localmente, come apo E, i macrofagi delle arterie si trovano in un ambiente del tutto peculiare nel quale l'efflusso di colesterolo è diretto più verso le particelle lipoproteiche che contengono apo E che verso le classiche lipoproteine contenenti apo AI (145, 146).

Negli esseri umani, la concentrazione di HDL contenenti apo E è più bassa di quella riscontrata negli animali che mancano di CETP e varia con il digiuno e il fenotipo apo E (147-149). È interessante osservare che sia i pazienti con deficit di CETP (149, 150) che gli individui trattati con inibitori di CETP (151) presentano aumentate concentrazioni di HDL contenenti apo E (48, 150). Le HDL arricchite in apo E degli individui con deficit di CETP si comportano come forti accettori di colesterolo trasportato da ABCG1 a partire dai macrofagi infarciti. Infine, apo E inibisce il rilascio della lipasi epatica dalla superfice endoteliale (152), riducendo così l'idrolisi dei trigliceridi delle HDL mediata dall'enzima come pure l'affinità delle HDL per il loro recettore "scavenger" SR-BI (153). Queste osservazioni suggeriscono uno scenario in cui, in condizioni di attività CETP diminuita, le HDL utilizzano apo E per espandere il loro core e per la cessione diretta al fegato di lipidi attraverso il recettore LDL (154). Tuttavia, è poco chiaro se le particelle HDL presenti nei pazienti con deficit di CETP o generate dall'uso di inibitori di CETP siano rimosse dal recettore delle LDL, dal recettore SR-BI o da entrambi.

È difficile valutare il ruolo delle HDL contenenti apo E nell'aterosclerosi a causa degli effetti dominanti di apo E sul metabolismo del colesterolo nell'organismo nel suo insieme e sulla composizione delle lipoproteine (155). Nell'aterosclerosi sperimentale, apo E è un potente agente anti-aterogenico, non solo a causa dei suoi effetti sui lipidi plasmatici. Nel topo con deficit di apo E, piccole quantità di apo E di derivazione macrofagica correggono completamente sia la dislipidemia che la suscettibilità all'aterosclerosi (156). Ancora più importante, l'introduzione di apo E nel plasma o nella parete vascolare in quantità che sono insufficienti a modificare la concentrazione plasmatica dei lipidi è in grado di fornire una significativa protezione vascolare, suggerendo così un effetto locale sull'ateroma (157). In contrasto, i pazienti con deficit di apo E non presentano aterosclerosi precoce o accelerata (158-160). A supporto del fatto che apo E è altamente espressa nell'ateroma, una recente valutazione della composizione delle HDL con analisi proteomica ha mostrato un arricchimento di apo E delle HDL3 negli individui con CVD (161). Questo risultato può stimolare lo sviluppo di metodi volti a validare le HDL contenenti apo E quali biomarcatori per predire la presenza di ateroma.

## HDL contenenti apo M

Manipolazioni genetiche nel topo indicano che apo M ha un ruolo importante nel rimodellamento delle HDL

plasmatiche, nella formazione delle pre-β HDL e nel trasporto inverso del colesterolo ed è una potente proteina anti-aterogenica (162, 163). apo M è una apolipoproteina minore che si trova in circa il 5% delle HDL totali e nel 2% delle LDL. Apo M è positivamente correlata con il colesterolo HDL e LDL sia nei pazienti CVD che nei soggetti sani (164). In due studi caso-controllo, tuttavia, non si sono osservate differenze significative nella concentrazione plasmatica di apo M tra individui sani e pazienti CVD (165).

## HDL contenenti apo B

L'analisi proteomica ha permesso di rilevare la presenza di peptidi apo B in HDL umane isolate, ma il loro ritrovamento è stato considerato accidentale, dovuto alla presenza di contaminanti quali LDL o alla lipoproteina(a) che presenta una densità idrata che si sovrappone a quella delle HDL (161, 166). Studi recenti in modelli murini hanno focalizzato l'attenzione sull'attività di MTP, una proteina epatica microsomiale di trasferimento dei trigliceridi, ed è stato osservato che l'attività di trasferimento dei fosfolipidi di MTP è di aiuto nell'assemblaggio e nella secrezione di particelle delle dimensioni delle VLDL e delle HDL che contengono apo B100 e apo B48 (167). Queste particelle sono secrete in piccole quantità e possono essere rilevate nel plasma.

## NOMENCLATURA PROPOSTA

Come discusso, l'uso di tecniche e procedure diverse ha portato a utilizzare termini differenti per definire le diverse specie di HDL. Al fine di fornire una guida per gli studi futuri e per valutare criticamente i dati già pubblicati ottenuti con metodi differenti, proponiamo qui una nuova nomenclatura per le HDL basata su densità e dimensione delle particelle (Tabella 2). Inoltre, questi termini sono confrontati con altri trovati in letteratura. In questa nomenclatura, le particelle HDL sono denominate come molto grandi, grandi, medie, piccole e molto piccole.

**Tabella 2**
*Classificazione delle HDL basata sulle loro proprietà fisiche*

| | HDL molto grandi (HDL-VL) | HDL grandi (HDL-L) | HDL medie (HDL-M) | HDL piccole (HDL-S) | HDL molto piccole (HDL-VS) |
|---|---|---|---|---|---|
| Intervallo di densità, g/mL | 1,063–1,087 | 1,088–1,110 | 1,110–1,129 | 1,129–1,154 | 1,154–1,210 |
| Intervallo di dimensione, nm | 12,9–9,7 | 9,7–8,8 | 8,8–8,2 | 8,2–7,8 | 7,8–7,2 |
| Ultracentrifugazione in gradiente di densità | HDL2b | HDL2a | HDL3a | HDL3b | HDL3c |
| Intervallo di densità, g/mL | 1,063–1,087 | 1,088–1,110 | 1,110–1,129 | 1,129–1,154 | 1,154–1,170 |
| Elettroforesi in gradiente di gel[a] | HDL2b | HDL2a | HDL3a | HDL3b | HDL3c |
| Intervallo di dimensione, nm | 12,9–9,7 | 9,7–8,8 | 8,8–8,2 | 8,2–7,8 | 7,8–7,2 |
| Gel elettroforesi bidimensionale | α-1 | α-2 | α-3 | α-4 | pre-β-1 |
| Intervallo di dimensione, nm | 11,2–10,8 | 9,4–9,0 | 8,5–7,5 | 7,5–7,0 | 6,0–5,0 |
| Risonanza magnetica nucleare | HDL-P grandi | | HDL-P medie | | HDL-P piccole |
| Intervallo di dimensione, nm | 12,9–9, | 9,7–8,8 | 8,8–8,2 | 8,2–7,8 | 7,8–7,2 |
| Mobilità ionica | HDL2b | | HDL2a e HDL3 | | |
| Intervallo di dimensione, nm | 14,5–10,5 | | 10,5–7,65 | | |

*[a] L'elettroforesi a una dimensione è stata eseguita in gradiente di poliacrilammide (4%–20%) senza denaturazione.*
*HDL-P, particelle HDL.*

## PROTEOMICA E LIPIDOMICA: UNA VISIONE INTEGRATA DELLA BIOLOGIA DELLE HDL

### Proteomica

L'avvento di un'ampia disponibilità di tecnologie di spettrometria di massa e la loro applicabilità all'analisi di misture di proteine multicomponenti ha fatto nascere un forte interesse per il proteoma delle particelle HDL umane, sia negli individui sani che nei malati.

Diversi fattori sono da tenere in debita considerazione quando si intraprendono studi sul proteoma delle HDL: la natura del materiale biologico di partenza e la sua conservazione, il metodo usato per la separazione e la purificazione delle particelle HDL e il tipo di analisi spettrometrica applicata. Non sono al momento stati intrapresi studi sistematici per valutare l'impatto di tali fattori sull'isolamento delle HDL con metodi diversi e quindi potenzialmente sul proteoma delle HDL.

Il criterio utilizzato per definire la frazione HDL che si sta studiando è un fattore chiave del proteoma delle HDL. La scelta delle procedure per l'isolamento o il frazionamento è elencata in Tabella 3; la natura precisa delle HDL isolate con ognuna di queste tecniche richiede analisi rigorose prima dell'inizio degli studi di proteomica. Ad esempio, le HDL isolate con tecniche cromatografiche ad alta prestazione sono pesantemente contaminate da proteine plasmatiche ad alto PM che co-eluiscono con le HDL (168). Fino ad ora, l'ultracentrifugazione è stata il metodo più usato per l'isolamento delle HDL da sottoporre a studi di proteomica.

Una volta purificate le HDL, le tecnologie di spettrometria di massa che sono state impiegate per definire il proteoma delle HDL includono SELDI-TOF, MALDI-TOF, tecnologie basate su ionizzazione elettrospray accoppiata a nano-cromatografia, approcci cosiddetti "shotgun" [ovvero "multidimensional protein identification technology" (MudPIT)] e, più recentemente, un approccio "shotgun" basato sull'uso di uno spettrometro ibrido a trappola ionica-FTICR ("Fourier transform ion cyclotron resonance"), con una sorgente di ionizzazione elettrospray nano. La difficoltà di quantificare le proteine (come peptidi triptici), particolarmente quelle presenti in basse concentrazioni, è la massima limitazione di tutte queste tecnologie, anche se non tutte le tecnologie presentano questo problema allo stesso grado.

**Tabella 3**
*Tecniche preparative per l'isolamento e il frazionamento delle HDL*

| |
|---|
| Ultracentrifugazione con flottazione |
| Ultracentrifugazione zonale |
| Ultracentrifugazione in gradiente di densità (isopicnico, NaCl/KBr; $D_2O$, saccarosio) |
| Precipitazione |
| Cromatografia dimensionale |
| Ultracentrifugazione/HDL con densità 1,063-1,21 |
| Cromatografia liquida veloce proteica/plasma intero |
| Cromatografia a scambio ionico |
| Cromatografia a immunoaffinità |
| Elettroforesi (gel elettroforesi bidimensionale) |

In una delle prime esaurienti analisi del proteoma delle HDL, Vaisar et al. (161) hanno identificato circa 50 componenti proteici nelle HDL3 umane isolate con ultracentrifugazione. Le attività biologiche di queste proteine suggeriscono che le HDL abbiano un ruolo non solo all'interno del metabolismo lipidico e dell'omeostasi del colesterolo, ma anche nella regolazione del complemento, nella risposta di fase acuta e nella inibizione di enzimi proteolitici. Diversi altri studi hanno confermato la presenza nelle HDL di molte apolipoproteine (AI, AII, AIV, B, (a), CI, CII, CIII, CIV, D, E, F, H, J, L1, M) oltre all'inibitore dell'α-1-antitripsina, all'albumina, alle frazioni C3 e C4 del complemento, al fibrinogeno, alla proteina correlata all'atpoglobina, alla paraoxonasi 1 e 3, alla siero amiloide A1, A2 e A4 e alla transtiretina (169).

E' interessante osservare che la concentrazione plasmatica di molte di queste proteine è insufficiente per garantire una copia per ogni particella di HDL; questo suggerisce quindi che le singole proteine possono essere legate a distinte particelle HDL distribuite lungo tutto lo spettro delle HDL. Su questa base, è possibile supporre che le multiple funzioni biologiche delle HDL siano mediate da sottofrazioni di particelle definite da specifici raggruppamenti di proteine legate e che tali raggruppamenti vengano co-frazionati durante l'isolamento delle sottopopolazioni HDL. Il primo passo verso la verifica di una tale ipotesi è consistito nel frazionamento in 5 sottofrazioni delle HDL plasmatiche di individui normolipidemici mediante ultracentrifugazione in gradiente di densità isopicnico (Figura 3); la composizione proteomica di queste frazioni è stata quindi esaminata con spettrometria di massa "tandem" (166).

Sono stati osservati cinque distinti tipi di distribuzione delle componenti proteiche nelle sottofrazioni HDL separate in base alla densità; il più interessante di questi identifica le HDL piccole e dense (HDL3c) come una sottopopolazione nella quale compaiono in maniera predominante apo J, apo L1, paraoxonasi 1/3, la proteina di trasferimento dei fosfolipidi e l'acetilidrolasi attivante le piastrine (denominata anche fosfolipasi $A_2$ associata alle lipoproteine). Il proteoma di HDL3c conteneva anche apo AI, apo AII, apo D, apo M, siero amiloide A1, A2 e A4, apo CI, apo CII e apo E.

Lo specifico proteoma di HDL3c ha implicazioni funzionali in quanto questa sottopopolazione presenta, tra tutte le sottopopolazioni HDL, il maggiore potere di protezione delle LDL contro l'ossidazione. Questa attività era altamente correlata alla presenza di apo J, apo M, siero amiloide A4, apo D, apo L1 e paraoxonasi 1/3 nelle HDL3c.

Questi dati devono essere interpretati non nel senso che tutte le proteine trovate in HDL3c sono presenti nella stessa particella lipoproteica; l'isolamento di una specifica particella contenente il fattore litico per il tripanosoma apo L1, più apo AI e la proteina correlata all'aptoglobina, nell'intervallo di densità di HDL3 suggerisce che questo non è certamente il caso (169) e che la frazione HDL3c è costituita da diverse specie di particelle HDL con proteomi distinti. Sulla base di queste scoperte, si può concludere che: (a) i raggruppamenti di proteine qui descritti sono potenzialmente indicativi della presenza di sottospecie distinte di HDL che posseggono specifiche funzioni biologiche; (b) l'analisi proteomica di specifiche sottospecie di HDL isolate mediante ultracentrifugazione in gradiente di densità isopicnico da individui normolipidemici ha identificato una sottospecie di HDL3c piccole e dense come sottoclasse specifica; e (c) gli specifici componenti lipidici e proteici di HDL3c conferiscono alle particelle una potente attività antiossidante. Per ultimo, questi dati supportano il concetto che le HDL siano una sorta di piattaforma per l'assemblaggio di alcuni componenti proteici dotati di specifiche funzioni e che queste (apolipo)proteine formino la base dell'eterogeneità funzionale delle HDL.

Sarebbe interessante capire se il proteoma delle HDL possa essere alterato nelle malattie metaboliche caratterizzate da dislipidemia e aumentato rischio CVD. Se così fosse, proteine specifiche potrebbero essere utilizzate come biomarcatori di una funzione alterata delle HDL. E' ormai noto, infatti, che molte delle più importanti attività biologiche anti-aterogeniche delle HDL risultano attenuate nel diabete di tipo 2 e nella sindrome metabolica, condizioni entrambe associate a elevato rischio CVD (12). Inoltre, in condizioni di flogosi acuta, le particelle HDL sono arricchite di siero amiloide A, presentando una diminuita attività anti-infiammatoria (12).

Vaisar et al. (161) e Greene et al. (170) hanno condotto i primi studi volti a verificare modifiche del proteoma delle HDL in pazienti con CVD, dimostrando un aumento del 150% del contenuto di apo E. Questa alterazione del proteoma veniva normalizzata dal trattamento combinato con statine e niacina. Questi studi aprono nuovi orizzonti non solo per l'identificazione di biomarcatori proteici di un metabolismo e di una funzionalità alterati delle HDL, ma anche per l'adozione di farmacoterapie orientate alla loro correzione.

Riassumendo, la precisa natura del proteoma delle HDL dipende fortemente dal metodo impiegato per il suo isolamento e purificazione, come pure dalla tecnica di spettrometria di massa utilizzata per l'analisi proteica e la quantificazione dei peptidi triptici; l'analisi strutturale e funzionale delle sottofrazioni delle particelle HDL potrebbe dimostrarsi più informativa dell'analisi tradizionale del HDL totale; per definire le caratteristiche chiave delle particelle HDL è particolarmente importante un accordo sulla standardizzazione dei metodi per l'isolamento delle HDL dal plasma umano.

## Lipidomica

Quando si esaminano le particelle HDL in relazione al loro contenuto in esteri del colesterolo e fosfatidilcolina (PC) si osserva che tra gli esteri del colesterolo predomina il linoleato di colesterolo, mentre i più comuni acidi grassi della PC sono 18:2/16:0, 18:2/18:0 e 20:4/16:0 (171). In accordo con questi dati, man mano che aumenta la densità idrata da HDL2b a HDL3c diminuisce il contenuto di esteri del colesterolo, colesterolo libero e sottoclassi di fosfolipidi che comprendono PC, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositolo, sfingomielina (SM) e lisoPC (171). Tuttavia, quando i dati di esteri del colesterolo, PC, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositolo e lisoPC vengono espressi come percentuale dei lipidi totali, queste differenze tra le sottoclassi HDL non sono evidenti, suggerendo che la composizione molecolare è in equilibrio dinamico tra le sottopopolazioni HDL. Analogamente, quando i lipidi delle HDL vengono analizzati sulla base del loro contenuto totale in acidi grassi, la distribuzione percentuale degli acidi grassi n-6 e n-3 saturi, monoinsaturi e polinsaturi è indistinguibile tra le diverse sottopopolazioni HDL (171).

Tuttavia, la proporzione di SM rispetto ai lipidi totali diminuisce progressivamente e parallelamente con la densità delle HDL, da 12,8% nelle HDL2b al 6,2% nelle HDL3c. Di conseguenza, il rapporto molare SM/PC diminuisce da 0,38 nelle HDL2b a 0,18 nelle HDL3c. Il contenuto di SM, particolarmente basso delle HDL3c, suggerisce che questa quantità non è in equilibrio con quella riscontrata nelle altre sottopopolazioni HDL; questo sarebbe dovuto alla bassa velocità di scambio di SM tra le lipoproteine e le membrane cellulari (172). E' possibile che il basso valore del rapporto SM/PC rifletta un'origine cellulare distinta per le piccole HDL, come suggerito dallo scarso contenuto di SM nelle piccole HDL nascenti secrete dai macrofagi J774, che originano dal foglietto esterno della membrana plasmatica (173).

Analogamente a quanto osservato per SM, il contenuto in colesterolo libero diminuisce di due volte da HDL2b a HDL3c (171, 174). Come risultato, il rapporto esteri del colesterolo/colesterolo libero diminuisce in maniera significativa con la densità delle HDL, supportando la teoria che le piccole HDL costituiscano un sito importante di esterificazione del colesterolo, all'interno dello spettro delle particelle HDL (175). L'aumento dell'attività di LCAT e il diminuito rapporto SM/PC nelle HDL3c sono in accordo con questa teoria, dato che SM funziona come un inibitore fisiologico di LCAT (176, 177).

Tra i componenti lipidici meno attivi biologicamente, il contenuto di sfingosina-1-fosfato (S1P) per particella di HDL è differente lungo lo spettro di HDL e mostra una concentrazione maggiore nelle HDL3 (40-50 mmol/mol di HDL) quando confrontato con le sottofrazioni HDL2 (15-20 mmol/mol) (171, 177, 178). L'arricchimento in S1P delle piccole HDL3 potrebbe essere correlato meccanicisticamente alla notevole capacità di queste particelle di acquisire lipidi polari di origine cellulare (171).

L'eterogeneità del lipidoma delle HDL può tradursi in

sottoclassi di HDL funzionalmente distinte. Le HDL3 piccole e dense posseggono una maggiore attività anti-ossidante e anti-infiammatoria rispetto alle HDL2 grandi e leggere, indipendentemente dal componente misurato scelto per tale confronto (proteine totali, massa totale o numero di particelle) (179). Inoltre, le HDL3 piccole e dense presentano una maggiore capacità di protezione del microcircolo endoteliale dall'apoptosi indotta dalle LDL ossidate rispetto alle HDL2 grandi e leggere, indipendentemente dal metodo usato per il confronto (177, 178). Per ultimo, le piccole HDL sono un accettore più avido di colesterolo cellulare trasportato da ABCA1 (173, 175).

Studi sugli aspetti meccanicistici della potente attività antiossidante di HDL3 hanno rivelato che la loro capacità di inattivare gli idroperossidi lipidici derivati dalle LDL dipendente fortemente dalla fluidità dei lipidi di superficie che è a sua volta determinata fondamentalmente dal lipidoma delle HDL, ma anche dal rapporto SM/PC (179). L'elevata fluidità del monostrato superficiale delle piccole HDL3, dipendente dalla bassa quantità di SM, può contribuire alla loro capacità di aumentare l'efflusso di colesterolo cellulare. Per ultimo, la marcata capacità delle HDL3 di proteggere le cellule endoteliali dall'apoptosi può in parte riflettere il loro arricchimento in S1P, un lipide bioattivo minore (171, 179).

I dati disponibili suggeriscono quindi che l'analisi lipidomica delle particelle HDL può essere utile per ottenere informazioni relative alla funzione antiaterogenica delle HDL. Sono disponibili dati sulla relazione tra il lipidoma HDL e il rischio CVD e tale informazione può servire per valutare nuovi agenti terapeutici volti ad aumentare le HDL.

## CONCLUSIONI

Un crescente numero di prove derivate da dati epidemiologici, studi in modelli animali e risultati di studi clinici supporta l'ipotesi che HDL possa rappresentare il prossimo obiettivo terapeutico per la riduzione del rischio residuo che si osserva nei pazienti in trattamento con statine a elevato rischio CVD. La misura del colesterolo HDL è stata usata come parametro principale per la valutazione del ruolo delle HDL quale fattore di rischio CVD. L'eterogeneità fisico-chimica e funzionale delle HDL rappresenta una importante sfida in campo cardiovascolare per lo sviluppo di metodi clinici e di laboratorio più efficaci al fine di assegnare alla quantificazione delle HDL un valore predittivo nella valutazione del rischio CVD. Inoltre, nella stima del rischio CVD, devono essere senza dubbio considerate le associazioni, metabolica e clinica, tra basse concentrazioni di colesterolo HDL, elevate concentrazioni di particelle HDL povere in colesterolo e "remnant" dei trigliceridi ricchi in colesterolo.

L'iniziale "gold standard" per la separazione delle HDL plasmatiche è stata l'ultracentrifugazione analitica, che ha permesso inizialmente una separazione in due sottofrazioni HDL2 e HDL3, con un'ulteriore risoluzione in HDL2a, HDL2b e HDL3. L'identificazione del profilo di densità delle HDL ha fornito le informazioni necessarie per lo sviluppo di metodi preparativi che permettessero di isolare, sub-frazionare e caratterizzare le HDL. Contemporaneamente, si è ottenuta la caratterizzazione delle particelle HDL sulla base della loro dimensione mediante l'elettroforesi in gradiente di gel, che separa le HDL in HDL2b, HDL2a, HDL3a, HDL3b e HDL3c.

L'ulteriore risoluzione delle particelle HDL mediante gel elettroforesi 2-D in pre-β HDL e α1-α4 HDL è risultata molto utile per la caratterizzazione delle HDL in modelli animali, studi clinici utilizzanti farmaci diversi, come pure nei difetti genetici del metabolismo lipoproteico. Una visione nuova della struttura e del metabolismo delle HDL è stata poi fornita dall'osservazione della maturazione metabolica delle pre-β HDL in HDL α1-α4, dall'identificazione del valore predittivo di rischio CVD della riduzione delle α1 e dal profilo HDL nelle dislipoproteinemie di tipo genetico.

Un importante avanzamento nella valutazione delle HDL è stato rappresentato dallo sviluppo di metodi per la quantificazione del numero di particelle HDL. Il nuovo metodo a mobilità ionica per quantificare le lipoproteine plasmatiche contenenti apo B e le HDL sta rapidamente progredendo e sarà utile nella valutazione clinica delle lipoproteine plasmatiche. La NMR appare molto promettente nella quantificazione del numero di particelle HDL nei campioni biologici, così come lo è la quantificazione delle lipoproteine contenenti apo B mediante immunodosaggio dell'apo B o NMR. La capacità di correlare il numero di particelle HDL con il colesterolo HDL, come pure la possibilità di eliminare l'influenza potenzialmente confondente delle lipoproteine contenenti apo B, nella stima dell'associazione con gli eventi clinici ci fornirà un modo nuovo di vedere il ruolo delle HDL nelle malattie CVD. Dati recenti dagli studi clinici VA-HIT e "Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis Carotid Intima-Media Thickness" (cIMT) hanno confermato la potenziale importanza di questo nuovo approccio alla quantificazione delle particelle HDL e del rischio CVD.

Lo sviluppo di nuovi metodi di spettrometria di massa ha fornito un'opportunità unica di determinare la composizione proteica delle HDL e delle sue sotto-frazioni. Oltre alle classiche apolipoproteine, le HDL contengono proteine associate all'infiammazione, alla coagulazione, alla regolazione del complemento e anche enzimi proteolitici. Di particolare interesse è stata la scoperta che esistono raggruppamenti di proteine su particelle HDL distinte, cosa che ha dato origine all'ipotesi che sottogruppi specifici di particelle HDL possano esercitare funzioni specifiche. A questo riguardo, lo specifico proteoma delle HDL3c sembra particolarmente efficace nella protezione delle LDL dall'ossidazione. Anche la componente lipidica delle HDL mostra un'eterogeneità marcata. Il rapporto tra esteri del colesterolo e colesterolo libero e il rapporto PC/SM differiscono tra le diverse sottofrazioni HDL, e il rapporto PC/SM nelle particelle HDL3c più piccole influenza in modo importante l'attivazione di LCAT, la rigidità della superficie delle particelle HDL e,

potenzialmente, la loro composizione proteica. Inoltre, i componenti lipidici bioattivi quali ad esempio S1P, sono preferenzialmente associati alla sottopopolazione di particelle HDL3c.

Le conclusioni originate dalle procedure analitiche multiple usate per caratterizzare le HDL supportano il concetto che la marcata eterogeneità fisico-chimica delle HDL sta alla base della loro eterogeneità funzionale. Ulteriori analisi strutturali e di composizione delle particelle HDL potranno fornire informazioni aggiuntive per la identificazione di particelle HDL con funzioni peculiari. Ugualmente, gli studi a livello molecolare posseggono il potenziale non solo di scoprire nuovi biomarcatori di rischio, ma anche di identificare nuovi obiettivi per la terapia farmacologica volta a ridurre l'aterosclerosi e le CVD.

Per facilitare le future caratterizzazioni delle sottofrazioni HDL è indispensabile la definizione di una nomenclatura uniforme (Tabella 3). Questo sistema di classificazione è in grado di definire 5 sottoclassi di HDL sulla base delle loro proprietà fisico-chimiche e assegna le particelle HDL molto grandi alla sottoclasse più grande e le HDL grandi, medie, piccole e molto piccole alle sottoclassi più piccole e più dense. La sottoclasse delle HDL molto piccole comprende le HDL pre-β, discoidali o nascenti. La nomenclatura proposta verrà valutata analizzando in parallelo diversi campioni con i vari metodi descritti in questo articolo. Possiamo anticipare che l'adozione di una nomenclatura uniforme per le frazioni delle HDL aumenterà la nostra capacità di confrontare i dati ottenuti con approcci metodologici differenti e di verificare l'effetto clinico di agenti in grado di modulare la struttura delle particelle HDL, il loro metabolismo, la loro funzione e in definitiva il rischio CVD. Saranno essenziali studi prospettici per stabilire l'associazione tra le sottoclassi HDL e il rischio CVD identificato dall'uso di queste varie metodologie (180).

## BIBLIOGRAFIA


1. Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Executive summary of the third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III). JAMA 2001;285:2486-97.
2. European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: Executive summary. Eur J Cardiovasc Preven Rehab 2007;14(suppl 2):E1-40.
3. Gotto AM, Brinton EA. Assessing low levels of high-density lipoprotein cholesterol as a risk factor in coronary heart disease: a working group report and update. J Am Coll Cardiol 2004;43:717-24.
4. Fruchart JC, Sacks F, Hermans MP, et al. Executive statement, the residual risk reduction initiative: a call to action to reduce residual vascular risk in dyslipidemic patients. Diab Vasc Dis Res 2008;5:319-35.
5. Assmann G, Schulte H, von Eckardstein A, et al. High-density lipoprotein cholesterol as a predictor of coronary heart disease risk. The PROCAM experience and pathophysiological implications for reverse cholesterol transport. Atherosclerosis 1996;124:S11-20.
6. Castelli WP. Cholesterol and lipids in the risk of coronary artery disease: the Framingham Heart Study. Can J Cardiol 1988;(4 Suppl A):5A-10A.
7. Barter P, Gotto AM, LaRosa JC, et al. HDL cholesterol, very low levels of LDL cholesterol, and cardiovascular events. N Engl J Med 2007;357:1301-10.
8. Otvos JD, Jeyarajah EJ, Cromwell WC. Measurement issues related to lipoprotein heterogeneity. Am J Cardiol 2002;90:22i-9i.
9. Brewer HB. HDL metabolism and the role of HDL in the treatment of high-risk patients with cardiovascular disease. Curr Cardiol Rep 2007;9:486-92.
10. Rosenson RS. Functional assessment of HDL: moving beyond static measures for risk assessment. Cardiovasc Drugs Ther 2010;24:71-5.
11. Santos RD, Asztalos BF, Martinez LR, et al. Clinical presentation, laboratory values, and coronary heart disease risk in marked high-density lipoprotein-deficiency states. J Clin Lipidol 2008;2:237-47.
12. Kontush A, Chapman MJ. Functionally defective high-density lipoprotein: a new therapeutic target at the crossroads of dyslipidemia, inflammation, and atherosclerosis. Pharmacol Rev 2006;58:342-74.
13. Asztalos BF, Sloop CH, Wong L, et al. Two-dimensional electrophoresis of plasma lipoproteins: recognition of new apo A-I-containing subpopulations. Biochim Biophys Acta 1993;1169:291-300.
14. Rothblatt GH, de lL-M, Atger V, et al. Cell cholesterol efflux: integration of old and new observations provides new insights. J Lipid Res 1999;40:781-96.
15. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. Clin Chem 1972;18:499-502.
16. Emerging Risk Factors Collaboration. Major lipids, apolipoproteins and risk of vascular disease. JAMA 2009;302:1993-2000.
17. Zhang L, Qiao Q, Tuomilehto J, et al. DECODE Study Group. The impact of dyslipidaemia on cardiovascular mortality in individuals without a prior history of diabetes in the DECODE study. Atherosclerosis 2009;206:298-302.
18. Baigent C, Keech A, Kearney PM, et al. Cholesterol Treatment Trialists' (CTT) Collaborators. Efficacy and safety of cholesterol-lowering treatment: prospective metaanalysis of data from 90,056 participants in 14 randomised trials of statins. Lancet 2005;366:1267-78.
19. Ridker PM, Genest J, Boekholdt SM, et al. HDL cholesterol and residual risk of first cardiovascular events after treatment with potent statin therapy: an analysis from the JUPITER trial. Lancet 2010;376:333-9.
20. Briel M, Ferreira-Gonzalez I, You JJ, et al. Association between change in high density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease morbidity and mortality: systematic review and meta-regression analysis. Br Med J 2009;338:b92.
21. Miller WG, Myers GL, Sakurabayashi I, et al. Seven direct methods for measuring HDL and LDL cholesterol compared with ultracentrifugation reference measurement procedures. Clin Chem 2010;56:977-86.
22. Havel RJ, Eder HA, Bragdon JH. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. J Clin Invest 1955;34:1345-53.
23. Remaley AT, Warnick GR. High density lipoprotein: what is the best way to measure its anti-atherogenic function? Exp Opin Med Diagn 2008;2:773-88.
24. Warnick GR, Nauck M, Rifai N. Evolution of methods for measurment of HDL-cholesterol: from ultracentrifugation to

homogenous assays. Clin Chem 2001;47:1579-96.
25. Langlois MR, Blaton VH. Historical milestones in measurement of HDL-cholesterol: impact on clinical and laboratory practice. Clin Chim Acta 2006;369:168-78.
26. Gofman JW, Young W, Tandy R. Ischemic heart disease, atherosclerosis, and longevity. Circulation 1966;34:679-97.
27. Anderson DW, Nichols AV, Pan SS, et al. High density lipoprotein distribution. Resolution and determination of three major components in a normal population sample. Atherosclerosis 1978;29:161-79.
28. Williams PT. Feldman DE. Prospective study of coronary heart disease vs HDL2, HDL3, and other lipoproteins in Gofman's Livermore Cohort. Atherosclerosis 2011;214:196-202.
29. Blanche PJ, Gong EL, Forte TM, et al. Characterization of human high-density lipoproteins by gradient gel electrophoresis. Biochim Biophys Acta 1981;665:408-19.
30. Johansson J, Carlson LA, Landou C, et al. High density lipoproteins and coronary atherosclerosis. A strong inverse relation with the largest particles is confined to normotriglyceridemic patients. Arterioscler Thromb 1991;11:174-82.
31. Berneis KK, Krauss RM. Metabolic origins and clinical significance of LDL heterogeneity. J Lipid Res 2002;43:1363-79.
32. Asztalos BF, Cupples LA, Demissie S, et al. High-density lipoprotein subpopulation profile and coronary heart disease prevalence in male participants in the Framingham Offspring Study. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2004;24:2181-7.
33. Chapman MJ, Goldstein S, Lagrange D, et al. A density gradient ultracentrifugal procedure for the isolation of the major lipoprotein classes from human serum. J Lipid Res 1981;22:339-58.
34. Goulinet S, Chapman MJ. Plasma LDL and HDL subspecies are heterogenous in particle content of tocopherols and oxygenated and hydrocarbon carotenoids. Relevance to oxidative resistance and atherogenesis. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1997;17:786-96.
35. Guerin M, Bruckert E, Dolphin PJ, et al. Fenofibrate reduces plasma cholesteryl ester transfer from HDL to VLDL and normalizes the atherogenic, dense LDL profile in combined hyperlipidemia. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1996;16:763-72.
36. Kontush A, Chantepie S, Chapman MJ. Small, dense HDL particles exert potent protection of atherogenic LDL against oxidative stress. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2003;23:1881-8.
37. Cone JT, Segrest JP, Chung BH, et al. Computerized rapid high resolution quantitative analysis of plasma lipoproteins based upon single vertical spin centrifugation. J Lipid Res 1982;23:923-35.
38. Kulkarni KR, Marcovina SM, Krauss RM, et al. Quantification of HDL2 and HDL3 cholesterol by the Vertical AutoProfile-II (VAP-II) methodology. J Lipid Res 1997;38:2353-64.
39. Kulkarni KR. Cholesterol profile measurement by vertical auto profile method. Clin Lab Med 2006; 26:787-802.
40. Ensign W, Hill N, Heward CB. Disparate LDL phenotypic classification among 4 different methods assessing LDL particle characteristics. Clin Chem 2006;52:1722-7.
41. Asztalos BF, Schaefer EJ, Horvath KV, et al. Role of LCAT in HDL remodeling: an investigation in LCAT deficiency states. J Lipid Res 2007;48:592-9.
42. Asztalos BF, De la Llera-Moya M, Dallal GE, et al. Differential effects of HDL subpopulations on cellular ABCA1 and SRB1-mediated cholesterol efflux. J Lipid Res 2005;46:2246-53.
43. Sankaranarayanan S, Oram JF, Asztalos BF, et al. Effect of acceptor composition and mechanisms of ABCG1-mediated cellular free cholesterol efflux. J Lipid Res 2009;50:275-84.
44. De la Llera-Moya M, Drazul-Schrader D, Asztalos BF, et al. The ability to promote efflux via ABCA1 determines the capacity of serum specimens with similar high density lipoprotein cholesterol to remove cholesterol from macrophages. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2010;30:796-801.
45. Sacks FM, Rudel LL, Conner A, et al. Selective delipidation of plasma HDL enhances reverse cholesterol transport in vivo. J Lipid Res, 2009;50:894-907.
46. Santos RD, Schaefer EJ, Asztalos BF, et al. Characterization of high density lipoprotein particles in familial apo A-I deficiency with premature coronary atherosclerosis, corneal arcus and opacification, and tubo-eruptive and planar xanthomas. J Lipid Res 2008;49:349-57.
47. Asztalos BF, Brousseau ME, McNamara JR, et al. Subpopulations of high-density lipoproteins in homozygous and heterozygous Tangier disease. Atherosclerosis 2001;156:217-25.
48. Lamon-Fava S, Asztalos BF, Howard TD, et al. Association of polymorphisms in genes involved in lipoprotein metabolism with plasma concentrations of remnant lipoproteins and HDL subpopulations before and after hormone therapy in postmenopausal women. Clin Endocrinol 2010;72:169-75.
49. Asztalos BF, Horvath KV, Kajinami K, et al. Apo composition of HDL in cholesteryl ester transfer protein deficiency. J Lipid Res 2004;45:448-55.
50. Asztalos BF, Collins D, Cupples LA, et al. Value of high density lipoprotein (HDL) subpopulations in predicting recurrent cardiovascular events in the Veterans Affairs HDL Intervention Trial. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2005;25:2185-91.
51. Asztalos BF, Batista M, Horvath KV, et al. Change in alpha 1 HDL concentration predicts progression in coronary artery stenosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2003;23:847-52.
52. Brousseau ME, Diffenderfer MR, Millar JS, et al. Effects of cholesteryl ester transfer protein inhibition on high-density lipoprotein subspecies, apolipoprotein A-I metabolism, and fecal sterol excretion. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2005;25:1057-64.
53. Lamon-Fava S, Diffenderfer MR, Barrett PHR, et al. Extended-release niacin alters the metabolism of plasma apolipoprotein (apo) A-I and apoB-containing lipoproteins. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2008;28:1672-8.
54. Asztalos BF, Swarbrick MM, Schaefer EJ, et al. Effects of weight loss, induced by gastric bypass surgery, on HDL remodeling in obese women. J Lipid Res 2010;51:2405-12.
55. Asztalos BF, LeMaulf F, Dallal GE, et al. Comparison of the effects of high doses of rosuvastatin versus atorvastatin on the subpopulations of high density lipoproteins. Am J Cardiol 2007;99:681-5.
56. Lamon-Fava S. Diffenderfer MR, Barrett PH, et al. Effects of different doses of atorvastatin on human apolipoprotein B-100, B-48, and A-I metabolism. J Lipid Res 2007;48:1746-53.
57. Asztalos BF, Horvath KV, McNamara JR, et al. Comparing the effects of five different statins on the HDL sub-population profiles of coronary heart disease patients. Atherosclerosis 2002;164:361-9.
58. Lounila J, Ala-Korpela M, Jokisaari J. Effects of orientational order and particle size on the NMR line positions of lipoproteins. Phys Rev 1994;72:4049-52.

59. Otvos JD. Measurement of lipoprotein subclass profiles by nuclear magnetic resonance spectroscopy. Clin Lab 2002;48:171-80.
60. Jeyarajah EJ, Cromwell WC, Otvos JD. Lipoprotein particle analysis by nuclear magnetic resonance spectroscopy. Clin Lab Med 2006;26:847-70.
61. Freedman DS, Otvos JD, Jeyarajah EJ, et al. Sex and age differences in lipoprotein subclasses measured by nuclear magnetic resonance spectroscopy: The Framingham Study. Clin Chem 2004;50:1189-200.
62. Mora S, Szklo M, Otvos JD, et al. LDL particle subclasses, LDL particle size, and carotid atherosclerosis in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. Atherosclerosis 2007;192:211-7.
63. Barzilai N, Atzmon G, Schechter C, et al. Unique lipoprotein phenotype and genotype associated with exceptional longevity. JAMA 2003;290:2030-40.
64. Garvey WT, Kwon S, Zheng D, et al. The effects of insulin resistance and type 2 diabetes mellitus on lipoprotein subclass particle size and concentration determined by nuclear magnetic resonance. Diabetes 2003;52:453-62.
65. Goff DC, D'Agostino RB Jr, Haffner SM, et al. Insulin resistance and adiposity influence lipoprotein size and subclass concentrations: results from the Insulin Resistance Atherosclerosis Study. Metabolism 2005;54:264-70.
66. Festa A, Williams K, Hanley AJG, et al. Nuclear magnetic resonance lipoprotein abnormalities in pre-diabetic subjects in the Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS). Circulation 2005;111:3465-72.
67. Kathiresan S, Otvos JD, Sullivan LM, et al. Increased small low-density lipoprotein particle number: a prominent feature of the metabolic syndrome in the Framingham Heart Study. Circulation 2006;113:20-9.
68. Rosenson RS, Freedman DS, Otvos JD. Relations of lipoprotein subclass levels and LDL size to progression of coronary artery disease in the PLAC I trial. Am J Cardiol 2002;90:89-94.
69. Kuller L, Arnold A, Tracy R, et al. NMR spectroscopy of lipoproteins and risk of CHD in the Cardiovascular Health Study. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2002;22:1175-80.
70. Otvos JD, Collins D, Freedman DS, et al. LDL and HDL particle subclasses predict coronary events and are changed favorably by gemfibrozil therapy in the Veterans Affairs HDL Intervention Trial (VAHIT). Circulation 2006;113:1556-63.
71. Birjmohun RS, Dallinga-Thie GM, Kuivenhoven JA, et al. Apo A-II is inversely associated with risk of future coronary artery disease. Circulation 2007;116:2029-35.
72. van der Steeg WA, Holme I, Boekholdt SM, et al. High-density lipoprotein cholesterol, high-density lipoprotein particle size, and apo A-1: Significance for cardiovascular risk. J Am Coll Cardiol 2008;51:634-42.
73. Mora S, Otvos JD, Rifai N, et al. Lipoprotein particle profiles by nuclear magnetic resonance compared with standard lipids and apos in predicting cardiovascular disease in women. Circulation 2009;119:931-9.
74. El Harchaoui K, Arsenault BJ, Franssen R, et al. High-density lipoprotein particle size and concentration and coronary risk. Ann Intern Med 2009;150:84-93.
75. Kraus WE, Houmard JA, Duscha BD, et al. Effects of the amount and intensity of exercise training on plasma lipoproteins. N Engl J Med 2002;347:1483-92.
76. Schaefer EJ, McNamara JR, Taylor T, et al. Effects of atorvastatin on fasting and postprandial lipoprotein subclasses in coronary heart disease patients versus control subjects. Am J Cardiol 2002;90:689-96.
77. Morgan JM, Capuzzi DM, Baksh RI, et al. Effects of extended-release niacin on lipoprotein subclass distribution. Am J Cardiol 2003;91:1432-6.
78. Ikewaki K, Tohyama J, Nakata Y, et al. Fenofibrate effectively reduces remnants, and small dense LDL, and increases HDL particle number in hypertriglyceridemic men: a nuclear magnetic resonance study. J Atheroscler Thromb 2004;11:278-85.
79. Szapary PO, Bloedon LT, Samaha FH, et al. Effects of pioglitazone on lipoproteins, inflammatory markers, and adipokines in nondiabetic patients with metabolic syndrome. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2006;26:182-8.
80. Kuvin JT, Dave DM, Sliney KA, et al. Effects of extended-release niacin on lipoprotein particle size, distribution, and inflammatory markers in patients with coronary artery disease. Am J Cardiol 2006;98:743-5.
81. Davidson MH, McKenney JM, Shear CL, et al. Efficacy and safety of torcetrapib, a novel cholesteryl ester transfer protein inhibitor, in individuals with below-average high-density lipoprotein cholesterol levels. J Am Coll Cardiol 2006;48:1774-81.
82. McKenney JH, Davidson MH, Shear CL, et al. Efficacy and safety of torcetrapib, a novel cholesteryl ester transfer protein inhibitor, in individuals with below-average high-density lipoprotein cholesterol levels on a background of atorvastatin. J Am Coll Cardiol 2006;48:1782-90.
83. Deeg MA, Buse JB, Goldberg RB, et al. Pioglitazone and rosiglitazone have different effects on serum lipoprotein particle concentrations and sizes in patients with type 2 diabetes and dyslipidemia. Diabetes Care 2007;30:2458-64.
84. Rosenson RS, Otvos JD, Hsia J. Effects of rosuvastatin and atorvastatin on low-density and high-density lipoprotein particle concentrations in patients with metabolic syndrome: a randomized, double-blind, controlled study. Diabetes Care 2009;32:1087-91.
85. Caulfield MP, Li S, Lee G, et al. Direct determination of lipoprotein particle sizes and concentrations by ion mobility analysis. Clin Chem 2008;54:1307-16.
86. Musunuru K, Orho-Melander M, Caulfield MP, et al. Ion mobility analysis of lipoprotein subfractions identifies three independent axes of cardiovascular risk. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2009;29:1975-80.
87. Contois J, McNamara JR, Lammi-Keefe C, et al. Reference intervals for plasma apo A-1 determined with a standardized commercial immunoturbidimetric assay: results from the Framingham Offspring Study. Clin Chem 1996;42:507-14.
88. Eggerman TL, Hoeg JM, Meng MS, et al. Differential tissue-specific expression of human apoA-I and apoA-II. J Lipid Res 1991;32:821-8.
89. Walldius G, Jungner I, Holme I, et al. High apo B, low apo A-I, and improvement in the prediction of fatal myocardial infarction (AMORIS study): a prospective study. Lancet 2001;358:2026-33.
90. Walldius G, Jungner I. Apo A-I versus HDL cholesterol in the prediction of risk for myocardial infarction and stroke. Curr Opin Cardiol 2007;22:359-67.
91. Mora S, Cui Y, Ridker PM. Association of HDL cholesterol and apolipoprotein A-1 with incident CVD across levels of LDL cholesterol in 27,748 women. Circulation. 2009;120:S507-8. AHA Abstract 1462.
92. Gotto AM, Jr., Whitney E, Stein EA, et al. Relation between baseline and on-treatment lipid parameters and first acute major coronary events in the Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study (AFCAPS/TexCAPS). Circulation 2000;101:477-84.
93. Marcovina SM, Albers JJ, Henderson LO, et al. International Federation of Clinical Chemistry standardization project for measurements of apos A-I and B. III: Comparability of apo A-I values by use of international

reference material. Clin Chem 1993;39:773-81.
94. Ferretti G, Bacchetti T, Negre-Salvayre A, et al. Structural modifications of HDL and functional consequences. Atherosclerosis 2006;184:1-7.
95. Shao B, Oda MN, Vaisar T, et al. Pathways for oxidation of high-density lipoprotein in human cardiovascular disease. Curr Opin Mol Ther 2006;8:198-205.
96. Zheng L, Nukuna B, Brennan ML, et al. Apo A-I is a selective target for myeloperoxidase-catalyzed oxidation and functional impairment in subjects with cardiovascular disease. J Clin Invest 2004;114:529-41.
97. Alaupovic P, Lee DM, McConathy WJ. Studies on the composition and structure of plasma lipoproteins: distribution of lipoprotein families in major density classes of normal human plasma lipoproteins. Biochim Biophys Acta 1972;260:689-707.
98. Alaupovic P. The concept of apolipoprotein-defined lipoprotein families and its clinical significance. Curr Atheroscler Rep 2003;5:459-67.
99. James RW, Hochstrasser D, Tissot JD, et al. Protein heterogeneity of lipoprotein particles containing apoA-I without apoA-II and apoA-I with apoA-II isolated from human plasma. J Lipid Res 1988;29:1557-71.
100. Castro GR, Fielding CJ. Early incorporation of cell-derived cholesterol into pre-β-migrating high-density lipoprotein. Biochemistry 1988;27:25-9.
101. Miida T, Kawano M, Fielding CJ, et al. Regulation of the concentration of pre-beta high-density lipoprotein in normal plasma by cell membranes and lecithin-cholesterol acyltransferase activity. Biochemistry 1992;31:11112-7.
102. Weng W, Brandenburg NA, Zhong S, et al. ApoA-II maintains HDL levels in part by inhibition of hepatic lipase: studies in apoA-II and hepatic lipase double knockout mice. J Lipid Res 1999;40:1064-70.
103. De Beer MC, Durbin DM, Cai L, et al. Apolipoprotein A-II modulates the binding and selective uptake of reconstituted HDL by scavenger receptor BI. J Biol Chem 2001;276:15832-9.
104. Wang N, Lan D, Chen W, et al. ATP-binding cassette transporters G1 and G4 mediate cellular cholesterol efflux to high-density lipoproteins. Proc Natl Acad Sci USA 2004:31:9774-9.
105. Kennedy MA, Barrera GC, Nakamura K, et al. ABCG1 has a critical role in mediating cholesterol efflux to HDL and preventing cellular lipid accumulation. Cell Metab 2005;1:121-31.
106. Matsuura F, Wang N, Chen W, et al. HDL from CETP-deficient subjects show enhanced ability to promote cholesterol efflux from macrophages in an apoE-and ABCG1-dependent pathway. Clin Invest 2006;116:1435-42.
107. Yancey PG, Bortnick AE, Kellner-Weibel G, et al. Importance of different pathways of cellular cholesterol efflux. Arterioscler Thomb Vasc Biol 2003;23:712-9.
108. Williams DL, Connelly MA, Temel RE, et al. Scavenger receptor B1 and cholesterol trafficking. Curr Opin Lipidol 1999;10:329-39.
109. Fruchart JC, Ailhaud G. Apolipoprotein A-containing lipoprotein particles: physiological role, quantification and clinical significance. Clin Chem 1992;38:793-7.
110. Puchois P, Kandoussi A, Fievet P, et al. Apolipoprotein A-I containing lipoproteins in coronary artery disease. Atherosclerosis 1987;68:35-40.
111. Genest JJ, Bard JM, Fruchart JC, et al. Plasma apolipoprotein AI, A-II, B, E and C-III containing particles in men with premature coronary artery disease. Atherosclerosis 1991;90:149-57.
112. Montali A, Vega GL, Grundy SM. Concentrations of apolipoprotein A-I-containing particles in patients with hypoalphalipoproteinemia. Arterioscler Thromb 1994;14: 511-7.
113. Parra HJ, Arveiler D, Evans AE, et al. A case-control study of lipoprotein particles in two populations at contrasting risk for coronary heart disease: the ECTIM study. Arterioscler Thromb 1992;12:701-7.
114. Luc G, Bard JM, Ferriřes J, et al. on behalf of the PRIME study group. Value of HDL cholesterol, apolipoprotein A-I, lipoprotein A-I, and lipoprotein A-I/A-II in prediction of coronary heart disease: the PRIME Study. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2002;22:1155-61.
115. Asztalos B, Zhang W, Roheim PS, et al. Role of free apolipoprotein A-I in cholesterol efflux. Formation of pre-alpha-migrating high-density lipoprotein particles. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1997;17:1630-6.
116. Rader DJ, Castro G, Zech LA, et al. In vivo metabolism of apolipoprotein A-I on high density lipoprotein particles LpA-I and LpA-I, A-II. J Lipid Res 1991;32:1849-59.
117. Zech LA, Schaefer EJ, Bronzert TJ, et al. Metabolism of human apolipoproteins A-I and A-II: compartmental models. J Lipid Res 1983;24:60-71.
118. Ji J, Watts GF, Johnson AG, et al. High-density lipoprotein (HDL) transport in the metabolic syndrome: Application of a new model for HDL particle kinetics. J Clin Endo Metab 2006;91:973-9.
119. deBeer MC, Webb NR, Whitaker NL, et al. SR-BI selective lipid uptake: subsequent metabolism of acute phase HDL. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2009;29:1298-303.
120. Ng DS, Vezina C, Wolever TS, et al. Apolipoprotein A-I deficiency. Biochemical and metabolic characteristics. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1995;15:2157-64.
121. Ikewaki K, Matsunaga A, Han H, et al. A novel two nucleotide deletion in the apolipoprotein A-I gene, apoA-I Shinbashi, associated with high density lipoprotein deficiency, corneal opacities, planar xanthomas, and premature coronary artery disease. Atherosclerosis 2004;172:39-45.
122. Dastani Z, Dangoisse C, Boucher B, et al. A novel nonsense apolipoprotein AI mutation (apoA-I(E136X)) causes low HDL cholesterol in French Canadians. Atherosclerosis 2006;185:127-36.
123. Deeb SS, Takata K, Peng RL, et al. A splice-junction mutation responsible for familial apolipoprotein A-II deficiency. Am J Hum Genet 1990;46:822-7.
124. Schaefer EJ, Blum CB, Levy RI, et al. Metabolism of high-density lipoprotein apolipoproteins in Tangier disease. N Engl J Med 1978;299:905-10.
125. Rader DJ, Ikewaki K, Duverger N, et al. Markedly accelerated catabolism of apolipoprotein A-II (apo A-II) and high density lipoproteins containing apo A-II in classic lecithin:cholesterol acyltransferase deficiency and fish-eye disease. Clin Invest 1994;93:321-30.
126. Calabresi L, Pisciotta L, Costantin A, et al. The molecular basis of lecithin:cholesterol acyltransferase deficiency syndromes: a comprehensive study of molecular and biochemical findings in 13 unrelated Italian families. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2005;9:1972-8.
127. Ikewaki K, Rader DJ, Sakamoto T, et al. Delayed catabolism of high density lipoprotein apolipoproteins A-I and A-II in human cholesteryl ester transfer protein deficiency. J Clin Invest 1993;92:1650-8.
128. Ikewaki K, Nishiwaki M, Sakamoto T, et al. Increased catabolic rate of low density lipoproteins in humans with cholesteryl ester transfer protein deficiency. J Clin Invest 1995;96:1573-81.
129. Brinton EA, Eisenberg S, Breslow JL. Increased apo A-I and apo A-II fractional catabolic rate in patients with low high density lipoproteincholesterol levels with or without hypertriglyceridemia. J Clin Invest 1991;87:536-44.

130. Horowitz BS, Goldberg IJ, Merab J, et al. Increased plasma and renal clearance of an exchangeable pool of apolipoprotein A-I in subjects with low levels of high density lipoprotein cholesterol. J Clin Invest 1993;91:1743-52.
131. Chapman MJ, Le Goff W, Guerin M, et al. Cholesteryl ester transfer protein: at the heart of the action of lipid-modulating therapy with statins, fibrates, niacin, and cholesteryl ester transfer protein inhibitors Eur Heart J 2010;31:149-64.
132. Brinton EA, Eisenberg S, Breslow JL. Human HDL cholesterol levels are determined by apoA-I fractional catabolic rate which correlates inversely with estimates of HDL particle size. Effects of gender, hepatic and lipoprotein lipases, triglyceride, insulin levels and body fat distribution. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1994;14:707-20.
133. Chan DC, Watts GF, Ooi EM, et al. Regulatory effects of fenofibrate and atorvastatin on lipoprotein A-I and lipoprotein A-I:A-II kinetics in the metabolic syndrome. Diabetes Care 2009;32:2111-3.
134. Barter PJ, Brandrup-Wognsen G, Palmer MK, et al. Effect of statins on HDL: a complex process unrelated to changes in LDL: Analysis of the VOYAGER database. J Lipid Res 2010;51:1546-53.
135. Vu-Dac N, Schoonjans K, Kosykh V, et al. Fibrates increase human apolipoprotein A-II expression through activation of the peroxisome proliferator activated receptor. J Clin Invest 1995;96:741-50.
136. Bradley WA, Gianturco SH. ApoE is necessary and sufficient for the binding of large triglyceride-rich lipoproteins to the LDL receptor; apoB is unnecessary. J Lipid Res 1986;27:40-8.
137. Ehnholm C, Mahley RW, Chappell DA, et al. Role of apolipoprotein E in the lipolytic conversion of beta-very low density lipoproteins to low density lipoproteins in type III hyperlipoproteinemia. Proc Natl Acad Sci USA 1984;81:5566-70.
138. Weisgraber KH. Apolipoprotein E distribution among human plasma lipoproteins: role of the cysteine-arginine interchange at residue 112. J Lipid Res 1990;31:1503-11.
139. Parks BW, Srivastava R, Yu S, et al. ApoE-dependent modulation of HDL and atherosclerosis by G2A in LDL receptor-deficient mice independent of bone marrow-derived cells. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2009;29:539-47.
140. Funke H, Boyles J, Weisgraber KH, et al. Uptake of apolipoprotein E-containing high density lipoproteins by hepatic parenchymal cells. Arteriosclerosis 1984;4:452-61.
141. Mahley RW, Weisgraber KH, Innerarity T, et al. Swine lipoproteins and atherosclerosis. Changes in the plasma lipoproteins and apoproteins induced by cholesterol feeding. Biochemistry 1975;14:2817-23.
142. Hatters DM, Peters-Libeu CA, Weisgraber KH. Apolipoprotein E structure: insights into function. Trends Biochem Sci 2006;31:445-54.
143. Yancey PG, Yu H, Linton MF, et al. A pathway-dependent on apoE, ApoAI, and ABCA1 determines formation of buoyant high-density lipoprotein by macrophage foam cells. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2007;27:1123-31.
144. Su YR, Blakemore JL, Zhang Y, et al. Lentiviral transduction of apoAI into hematopoietic progenitor cells and macrophages: applications to cell therapy of atherosclerosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2008;28:1439-46.
145. Ishiguro H, Yoshida H, Major AS, et al. Retrovirus-mediated expression of apolipoprotein A-I in the macrophage protects against atherosclerosis in vivo. J Biol Chem 2001;276:36742-8.
146. Major AS, Dove DE, Ishiguro H, et al. Increased cholesterol efflux in apolipoprotein AI (apoAI)-producing macrophages as a mechanism for reduced atherosclerosis in apoAI((-/-)) mice. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2001;21:1790-5.
147. Mahley RW, Innerarity TL, Bersot TP, et al. Alterations in human high-density lipoproteins, with or without increased plasma-cholesterol, induced by diets high in cholesterol. Lancet 1978;2:807-9.
148. Neale MC, de Knijff P, Havekes LM, et al. ApoE polymorphism accounts for only part of the genetic variation in quantitative ApoE levels. Genet Epidemiol 2000;18:331-40.
149. Yamashita S, Sprecher DL, Sakai N, et al. Accumulation of apolipoprotein E-rich high density lipoproteins in hyperalphalipoproteinemic human subjects with plasma cholesteryl ester transfer protein deficiency. J Clin Invest 1990;86:688-95.
150. Matsuura F, Wang N, Chen W, et al. HDL from CETP-deficient subjects shows enhanced ability to promote cholesterol efflux from macrophages in an apoE- and ABCG1-dependent pathway. J Clin Invest 2006;116:1435-42.
151. Tall AR. CETP inhibitors to increase HDL cholesterol levels. N Engl J Med 2007;356:1364-6.
152. Young EK, Chatterjee C, Sparks DL. HDL-ApoE content regulates the displacement of hepatic lipase from cell surface proteoglycans. Am J Pathol 2009;175:448-57.
153. Lambert G, Chase MB, Dugi K, et al. Hepatic lipase promotes the selective uptake of high density lipoprotein-cholesteryl esters via the scavenger receptor B1. J Lipid Res 1999;40:1294-303.
154. Blum CB, Deckelbaum RJ, Witte LD, et al. Role of apolipoprotein E-containing lipoproteins in abetalipoproteinemia. J Clin Invest 1982;70:1157-69.
155. Mahley RW, Huang Y, Weisgraber KH. Putting cholesterol in its place: apoE and reverse cholesterol transport. J Clin Invest 2006;116:1226-9.
156. Linton MF, Atkinson JB, Fazio S. Prevention of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice by bone marrow transplantation. Science 1995;267:1034-7.
157. Hasty AH, Linton MF, Brandt SJ, et al. Retroviral gene therapy in ApoE-deficient mice: ApoE expression in the artery wall reduces early foam cell lesion formation. Circulation 1999;99:2571-6.
158. Schaefer EJ, Gregg RE, Ghiselli G, et al. Familial apolipoprotein E deficiency. J Clin Invest 1986;78:1206-19.
159. Ghiselli G, Schaefer EJ, Gascon P, et al. Type III hyperlipoproteinemia associated with apolipoprotein E deficiency. Science 1981;214:1239-41.
160. Lohse P, Brewer HB 3rd, Meng MS, et al. Familial apolipoprotein E deficiency and type III hyperlipoproteinemia due to a premature stop codon in the apolipoprotein E gene. J Lipid Res 1992;33:1583-90.
161. Vaisar T, Pennathur S, Green PS, et al. Shotgun proteomics implicates protease inhibition and complement activation in the antiinflammatory properties of HDL. J Clin Invest 2007;117:746-56.
162. Wolfrum C, Poy MN, Stoffel M. Apolipoprotein M is required for prebeta-HDL formation and cholesterol efflux to HDL and protects against atherosclerosis. Nat Med 2005;11:418-22.
163. Christoffersen C, Jauhiainen M, Moser M, et al. Effect of apolipoprotein M on high density lipoprotein metabolism and atherosclerosis in low density lipoprotein receptor knock-out mice. J Biol Chem 2008;283:1839-47.
164. Axler O, Ahnstrom J, Dahlback B. An ELISA for apolipoprotein M reveals a strong correlation to total cholesterol in human plasma. J. Lipid Res 2007;48:1772-80.
165. Ahnstrom J, Axler O, Jauhiainen M, et al. Levels of apolipoprotein M are not associated with the risk of

coronary heart disease in two independent case-control studies. J Lipid Res 2008;49:1912-7.
166. Davidson WS, Silva RA, Chantepie S, et al. Proteomic analysis of defined HDL subpopulations reveals particle-specific protein clusters: relevance to antioxidative function. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2009;29:870-6.
167. Khatun I, Iqbal J, Wang M, et al. Phospholipid transfer activity of microsomal triglyceride transfer protein promotes assembly of phospholipid-rich apo-containing lipoproteins in mice. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2010;48 (abstract).
168. Collins LA, Mirza SP, Kissebah AH, Olivier M. Integrated approach for the comprehensive characterization of lipoproteins from human plasma using FPLC and nano-HPLC tandem mass spectrometry. Physiol Genomics 2010;40:208-15.
169. Hoofnagle AN, Heinecke J. Lipoproteomics: using mass spectrometry-based proteomics to explore the assembly, structure, and function of lipoproteins. J Lipid Res 2009;50:1967-75.
170. Green PS, Vaisar T, Pennathur S, et al. Combined statin and niacin therapy remodels the high-density lipoprotein proteome. Circulation 2008;118:1259-67.
171. Kontush A, Therond P, Zerrad A, et al. Preferential sphingosine-1-phosphate enrichment and sphingomyelin depletion are key features of small dense HDL3 particles: relevance to antiapoptotic and antioxidative activities. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2007;27:1843-9.
172. Nilsson A, Duan RD. Absorption and lipoprotein transport of sphingomyelin. J Lipid Res 2006;47:154-71.
173. Duong PT, Collins HL, Nickel M, et al. Characterization of nascent HDL particles and microparticles formed by ABCA1-mediated efflux of cellular lipids to apoA-I. J Lipid Res 2006;47:832-43.
174. Shiflett AM, Bishop JR, Pahwa A, et al. Human high density lipoproteins are platforms for the assembly of multi-component innate immune complexes. J Biol Chem 2005;280:32578-85.
175. Nakamura Y, Kotite L, Gan Y, et al. Molecular mechanism of reverse cholesterol transport: reaction of pre-beta-migrating high-density lipoprotein with plasma lecithin/cholesterol acyltransferase. Biochemistry 2004;43:14811-20.
176. Bolin DJ, Jonas A. Sphingomyelin inhibits the lecithin-cholesterol acyltransferase reaction with reconstituted high density lipoproteins by decreasing enzyme binding. J Biol Chem 1996; 271:19152-8.
177. de Souza JA, Vindis C, Hansel B, et al. Metabolic syndrome features small, apolipoprotein A-I-poor, triglyceride-rich HDL3 particles with defective anti-apoptotic activity. Atherosclerosis 2008;197:84-94.
178. de Souza JA, Vindis C, Negre-Salvayre A, et al. Small, dense HDL3 particles attenuates apoptosis in endothelial cells: pivotal role of apolipoprotein A-I. J Cell Mol Med 2010;14:608-20.
179. Zerrad-Saadi A, Therond P, Chantepie S, et al. HDL3-mediated inactivation of LDL-associated phospholipid hydroperoxides is determined by the redox status of apolipoprotein A-I and HDL particle surface lipid rigidity: relevance to inflammation and atherogenesis. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2009;29:2169-75.
180. Arsenault BJ, Lemieux I, Despres J-P, et al. Comparison between gradient gel electrophoresis and nuclear magnetic resonance spectroscopy in estimating coronary heart disease risk associated with LDL and HDL particle size. Clin Chem 2010;56:789-96.