

AGGIORNAMENTO

EFFETTI PLEIOTROPICI DELLE HDL

LILIANA MANNUCCI, CLAUDIO CORTESE*Dipartimento di Medicina Interna, Università di Roma "Tor Vergata"***SOMMARIO**

La ben nota relazione inversa tra livelli circolanti delle HDL e rischio di aterosclerosi è stata spesso attribuita alla capacità delle HDL di mediare il cosiddetto trasporto inverso del colesterolo. I meccanismi di tale trasporto inverso sono stati chiariti negli ultimi anni e i mediatori cellulari e biochimici sono stati identificati. Tuttavia, alcune osservazioni recenti hanno in qualche modo indebolito questa ipotesi e il conseguente ipotizzato uso terapeutico della elevazione dei livelli di HDL. In particolare, studi di genetica delle ipoalfalipoproteinemie e studi di intervento con agenti in grado di elevare i livelli delle HDL non sono stati in grado di verificare in maniera chiara il ruolo protettivo delle HDL. Inoltre, numerosi studi sembrerebbero dimostrare che non soltanto i livelli delle HDL ma anche la composizione e quindi la funzionalità delle stesse potrebbero avere un ruolo prioritario. Sono state descritte infatti altre funzioni delle HDL tra cui la prevenzione dell'ossidazione delle LDL, effetti antinfiammatori, prevenzione dell'apoptosi delle cellule vascolari endoteliali, effetti pro-fibrinolitici e antitrombotici, miglioramento della funzione endoteliale.

Moderni studi di proteomica delle HDL probabilmente saranno in grado di identificare le componenti proteiche responsabili di tali funzioni "pleiotropiche" e fornire un possibile strumento terapeutico.

Parole chiave: HDL, aterosclerosi, ateroprotezione, HDL-proteomica.

Introduzione

È ormai ben noto che il rischio di aterosclerosi è inversamente correlato con la concentrazione di HDL-colesterolo circolante (1, 2). Il famoso studio Framingham ha dimostrato che tale correlazione è indipendente dalla concentrazione di LDL-colesterolo (3) e altri studi condotti con agenti in grado di innalzare le concentrazioni di

HDL hanno dimostrato che tale aumento determina una diminuzione dell'incidenza di eventi cardiovascolari (4). Tuttavia, alcune osservazioni recenti hanno in qualche modo indebolito questa ipotesi e il conseguente ipotizzato uso terapeutico della elevazione dei livelli di HDL. In particolare, alcuni studi genetici hanno evidenziato che difetti come il deficit dell'enzima LCAT, responsabile di livelli bassissimi di HDL, non comportano un aumento del rischio. Inoltre, studi di intervento con derivati dell'acido fibrico, in grado di elevare moderatamente i livelli di HDL, non hanno mostrato un chiaro effetto benefico. Ulteriori dubbi hanno suscitato alcuni studi

Indirizzo per la corrispondenza

Claudio Cortese

Dipartimento di Medicina Interna.

Università di Roma "Tor Vergata"

Via Montpellier, 1 - 00133 Roma

claudio.cortese@uniroma2.it

di intervento con un inibitore della CETP come il torcetrapib, in grado di elevare i livelli di HDL fino al 75%, che però hanno comportato risultati negativi. È probabile che tali risultati negativi siano da attribuire ad effetti “off target” del torcetrapib sui livelli di pressione arteriosa. Sono in corso due importanti studi di intervento con anacetrapib e dalcetrapib, anch’essi in grado di elevare i livelli di HDL ma totalmente privi di effetti sui meccanismi di regolazione della pressione arteriosa e i cui risultati dovrebbero essere noti a breve. In conclusione, si potrebbe ipotizzare che

non soltanto i livelli circolanti ma anche la composizione e quindi la funzionalità delle HDL potrebbero rivestire un ruolo fondamentale.

Le lipoproteine ad alta densità sono una classe eterogenea di lipoproteine prodotte nel fegato e nell’intestino tenue, che nell’insieme rappresentano circa il 25% del colesterolo circolante (*Figura 1*). Le HDL nascono come particelle discoidali formate da due o più molecole di apolipoproteine (apo A-I, apo A-II, apo E, apo C) complessate con fosfolipidi e colesterolo non esterificato.

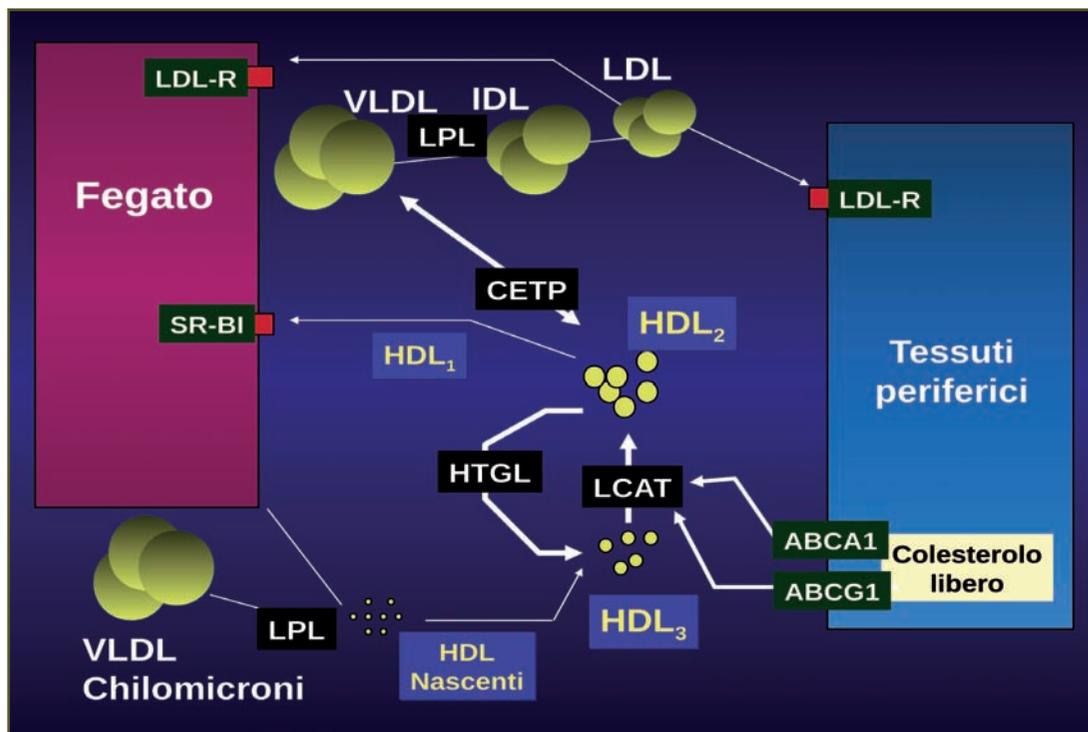


Figura 1 - Metabolismo delle HDL.

L'efflusso del colesterolo libero dai tessuti periferici avviene attraverso i trasportatori di membrana ABCA1 e ABCG1. L'esterificazione del colesterolo mediata dall'enzima LCAT interviene nella formazione di particelle sferiche di maggiori dimensioni (HDL₂) che possono essere riconvertite in particelle più piccole (HDL₃) ad opera della proteina CETP, responsabile del trasferimento degli esteri di colesterolo (CE) dalle HDL alle lipoproteine contenenti apoB (VLDL e LDL). Il fegato costituisce il principale sito di uptake delle HDL. L'ingresso delle HDL negli epatociti può avvenire secondo due vie: 1) le molecole di HDL-CE e le HDL libere vengono internalizzate direttamente e in maniera selettiva attraverso il recettore SR-BI; 2) le molecole di HDL-CE vengono trasferite alle lipoproteine contenenti apoB ad opera della proteina CETP e sono quindi internalizzate attraverso il recettore LDLR.

Tali particelle costituiscono un substrato per l'enzima LCAT, responsabile della produzione della gran parte dei colesteril-esteri plasmatici. I colesteril-esteri sono molecole altamente idrofobiche e si ripartiscono al centro delle particelle neofornate.

Ciò trasforma le HDL discoidali nelle particelle sferiche presenti nel sangue, contenenti un core lipidico formato da colesteril-esteri e trigliceridi circondato da un monostrato di fosfolipidi, colesterolo non esterificato, apolipoproteine, oltre a una serie di molecole lipidiche tra cui acidi grassi liberi ed esterificati e sfingolipidi. Le HDL sono dunque le lipoproteine plasmatiche più piccole e più dense e in base alla dimensione e al contenuto lipidico possono essere suddivise in quattro sottoclassi: HDL1, HDL2, HDL3 e HDL4.

Più in particolare, le HDL2 sono più grandi, meno dense e maggiormente ricche in lipidi rispetto alle HDL3, che costituiscono la sottoclasse maggiormente rappresentata nel plasma umano. Inoltre, in base alle apolipoproteine presenti (principalmente apoA-I e apoA-II), le HDL umane sono classificate in due popolazioni: le (A-I)HDL, contenenti esclusivamente apoA-I, e le (A-I/A-II)HDL, che contengono sia apoA-I che apoA-II.

Trasporto inverso del colesterolo

Sono molte le funzioni mediante le quali le HDL possono esercitare un ruolo protettivo nei confronti dell'aterosclerosi.

Tra queste, la funzione meglio conosciuta riguarda il ruolo fondamentale delle HDL nel processo di trasporto inverso del colesterolo, mediante il quale il colesterolo in eccesso viene trasportato dalle cellule periferiche verso il fegato e gli organi steroidogenici per poi essere eliminato attraverso l'escrezione biliare, riutilizzato

nel ciclo entero-epatico o utilizzato come precursore degli ormoni steroidei.

Più in particolare, gli effetti ateroprotettivi delle HDL sono in parte attribuiti alla capacità di mobilitare il colesterolo in eccesso dai macrofagi presenti nella parete arteriosa. L'efflusso di colesterolo dai macrofagi avviene attraverso proteine di membrana appartenenti alla famiglia dei trasportatori ABC secondo due diversi *pathway*: ABCA1 facilita il trasporto di colesterolo e fosfolipidi (anche ossidati) dalle cellule alle apoA-I povere di lipidi, mentre ABCG1 media il trasporto del colesterolo cellulare alle particelle di HDL lipidate più mature (5), processo favorito dall'azione della lecitina:colesterolo aciltransferasi (LCAT) e della apoE (6).

Ciò consente di ridurre l'accumulo di cellule schiumose cariche di colesterolo all'interno della parete arteriosa, fenomeno che costituisce una delle prime fasi della patogenesi dell'aterosclerosi. Una volta mobilitato dai macrofagi ed esterificato ad opera della LCAT, il colesterolo viene trasportato verso il fegato, dove può essere internalizzato sia tramite recettori epatici delle HDL, tra cui il recettore ad alta affinità SR-BI, sia attraverso il recettore LDL-R in seguito al trasferimento dei colesteril-esteri alle lipoproteine contenenti apoB (VLDL, LDL) mediato dalla CETP (7).

Come si accennava nella introduzione, sebbene il trasporto inverso del colesterolo costituisca la via principale attraverso cui le HDL esercitano il loro ruolo ateroprotettivo, tali molecole hanno anche altre funzioni biologiche che possono contribuire indipendentemente alla prevenzione del rischio cardiovascolare. Tra i cosiddetti effetti pleiotropici delle HDL troviamo: prevenzione dell'ossidazione delle LDL, effetti antinfiammatori, prevenzione dell'apoptosi delle cellule vascolari endo-

Tabella 1 - Effetti pleiotropici delle HDL.

- Prevenzione dell'ossidazione delle LDL
- Protezione contro i danni cellulari provocati dalle LDL ossidate
- Effetti antinfiammatori sulla componente cellulare della parete vasale
- Prevenzione dell'apoptosi delle cellule vascolari endoteliali
- Mantenimento dell'integrità del monostrato endoteliale
- Riduzione della produzione di molecole di adesione endoteliali
- Attività vasodilatatoria
- Attività antitrombotica
- Attività pro-fibrinolitica
- Attività anti-infettiva

teliali, effetti pro-fibrinolitici e antitrombotici, miglioramento della funzione endoteliale (*Tabella 1*).

Proprietà antiossidanti delle HDL

Le HDL svolgono un ruolo protettivo nei confronti dello stress ossidativo diminuendo l'ossidazione di lipidi e proteine dovuta all'accumulo di specie reattive dell'ossigeno (ROS). Le particelle di HDL trasportano enzimi ad attività anti-ossidante quali le paraoxonasi 1 e 3 e la acetilidrolasi del fattore attivante le piastrine (platelet-activating factor acetylhydrolase, PAF-AH), che contrastano l'ossidazione delle proteine, in particolare delle LDL e prevengono la formazione della lesione aterosclerotica e il danno miocardio (8-10).

La famiglia delle paraoxonasi umane comprende tre geni, PON1, PON2 e PON3, che presentano circa il 65% di omologia a livello amminoacidico. Tali geni codificano rispettivamente per gli enzimi paraoxonasi 1, paraoxonasi 2 e paraoxonasi 3.

Le paraoxonasi 1 e 3 (PON1 e PON3) sieriche sono associate alle HDL circolan-

ti, mentre la PON2 sembra non esserlo. La PON1 è una esterasi calcio-dipendente ampiamente studiata in tossicologia per la sua capacità di idrolizzare gli organofosfati alla base di numerosi agenti quali insetticidi, erbicidi e gas nervini. Oltre a essere presente nel siero, questo enzima è ampiamente localizzato in vari tessuti tra cui fegato, intestino e reni. Viene considerato il principale determinante dell'azione antiossidante delle HDL e, in particolare, della protezione conferita dalle HDL alle LDL nei confronti dell'ossidazione. Gli effetti antiossidanti sulle LDL sono probabilmente dovuti a un'azione chelante o a un'attività di tipo perossidasi.

È da notare che in condizioni di stress ossidativo non sono solo le LDL a essere suscettibili di perossidazione lipidica ma tutti i lipidi sierici, compresi quelli presenti sulle HDL, che nell'uomo sono i principali *carrier* sierici di idroperossidi lipidici (11). Inoltre, gli idroperossidi associati alle HDL vengono ridotti a idrossidi più rapidamente di quanto non lo siano quelli associati alle LDL (12). Poiché le HDL ossidate mostrano una diminuita capacità di promuovere l'efflusso di colesterolo dalle cellule, proteggendo le HDL dall'ossidazione la PON1 può svolgere un ruolo chiave nel mantenimento dell'attività antiaterogena di queste lipoproteine. Oltre a inibire l'accumulo dei fosfolipidi perossidati nelle lipoproteine ossidate, la PON1 è anche in grado di idrolizzare l'Hcy-tiolattone, un derivato tossico dell'omocisteina (13).

L'attività della PON1 sierica è diminuita nei pazienti affetti da malattia coronarica (14, 15) o da diabete, sia insulino-dipendente che insulino-indipendente, specialmente in presenza di neuropatia periferica (16).

La sua azione enzimatica è in parte determinata geneticamente e sono stati studiati numerosi polimorfismi del gene PON1.

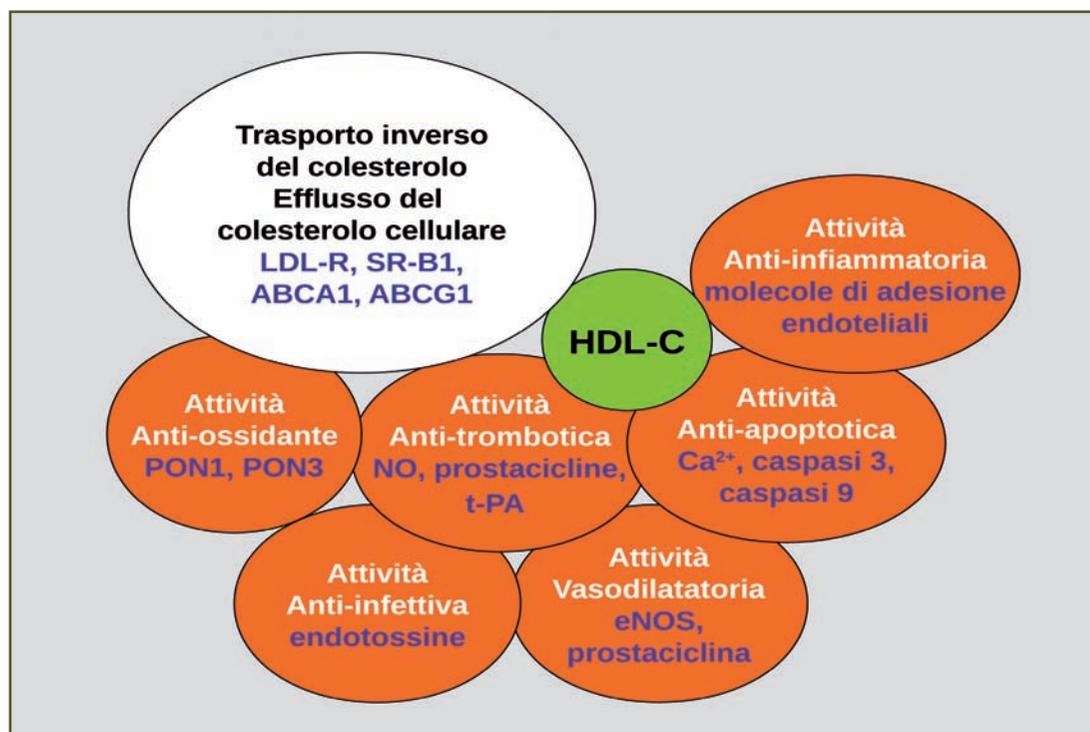


Figura 2 - Funzioni delle HDL.

La principale funzione delle HDL è quella del trasporto inverso del colesterolo.

Sono indicate nella figura le maggiori altre funzioni, cosiddette pleiotropiche, delle HDL con i principali mediatori ed effettori coinvolti.

Tra questi, il polimorfismo Gln192Arg è uno dei maggiori determinanti dell'attività della PON1 sierica ed è stato dimostrato che questa attività è inversamente correlata al rischio cardiovascolare. Alcuni studi hanno messo in evidenza una correlazione tra l'attività di PON1 e la funzione endoteliale, che riveste un ruolo primario nella patogenesi della malattia coronarica.

L'esistenza di una relazione tra le HDL e la vasodilatazione endotelio-dipendente era nota già dal 1994, quando Zeiher et al. avevano osservato che pazienti con elevate HDL mostravano maggiori risposte vasodilatatorie e attenuate risposte vasoconstrictorie (17). Studi successivi sulla vasodilatazione flusso-mediata (FMV) dell'arteria brachiale hanno poi dimostrato che il colesterolo HDL è un fattore predittivo indi-

pendente della funzione endoteliale (18, 19). Relativamente all'attività della PON1, è stata osservata una disfunzione endoteliale coronarica più marcata nei pazienti che presentano la variante omozigote Gln/Gln a bassa attività PON1 rispetto ai pazienti eterozigoti (20), come pure un'importante alterazione della FMV brachiale in pazienti affetti da arteriopatia periferica sintomatica che presentano genotipo PON1 Gln/Gln e bassa attività PON1 rispetto ai pazienti con genotipo Gln/Arg o Arg/Arg e attività PON1 più elevata (21).

Proprietà antinfettive

Le HDL rivestono un ruolo primario nel legame e nella eliminazione delle endotossine circolanti attraverso la bile. Questo

processo inibisce l'attivazione cellulare indotta da endotossine e da ciò deriva una potente attività anti-infettiva (22). L'inattivazione delle endotossine da parte delle HDL è mediata dalla diretta interazione con la apoA-I e si accompagna a una diminuzione, indotta dalle HDL, dell'espressione di CD14 sui monociti (23).

Un'altra possibile spiegazione può essere data dal ben noto fenomeno di una drastica diminuzione del contenuto di apoA-I durante episodi di fase acuta.

Infatti, è stato dimostrato che la maggior parte del contenuto in apoA-I delle HDL viene ad essere rimpiazzato dalla proteina amiloide sierica A (SAA), che è una tipica proteina della fase acuta le cui concentrazioni possono elevarsi fino a 100-1.000 volte nella iniziale risposta sistemica all'infiammazione.

Si è pensato in un primo tempo che tale fenomeno potesse rendere le HDL "disfunzionali" soprattutto per quanto riguarda la capacità di trasporto inverso del colesterolo. È stato invece recentemente dimostrato che le aumentate concentrazioni di SAA aumentano la disponibilità di colesterolo libero intracellulare che, in presenza di accettori come ABCA1 e ABCG1, contribuisce al rimodellamento delle HDL e a preservare la funzione principale delle HDL (24).

Inoltre, le HDL umane sono in grado di esercitare una specifica azione litica nei confronti del tripanosoma, che conferisce all'uomo una protezione selettiva contro *Trypanosoma brucei brucei* (25).

Funzione endoteliale

eNOS

Il monossido d'azoto, anche detto ossido nitrico (NO), è uno dei principali mediatori endoteliali. È un potente va-

sodilatatore ed esercita numerosi effetti sull'endotelio e sul tessuto muscolare liscio dei vasi sanguigni. A livello endoteliale NO è generato ad opera dell'enzima eNOS durante la conversione della L-arginina in L-citrullina.

L'attività della eNOS è modulata da agonisti di vari recettori di superficie accoppiati alle proteine G e da stimoli fisici quali lo *shear stress* (26) o il cambiamento delle condizioni di ossigenazione. Numerosi studi condotti sia sull'uomo che in modelli animali, hanno messo in evidenza come il deficit di NO induca la proliferazione delle cellule muscolari lisce, l'aggregazione e l'adesione piastrinica (26) e una rapida accelerazione dello sviluppo della disfunzione endoteliale (27). Nei primi stadi della malattia vascolare dovuta a ipercolesterolemia, è stata osservata una drammatica diminuzione della biodisponibilità di NO di origine endoteliale (28). A oggi sono disponibili numerose evidenze a sostegno di un ruolo ateroprotettivo della molecola di NO, che costituisce il principale messaggero cellulare per la regolazione del tono arterioso da parte delle HDL.

La produzione di NO può essere indotta dalle HDL attraverso vari meccanismi. Studi su cellule endoteliali in coltura hanno mostrato che le HDL regolano la distribuzione subcellulare della eNOS. In seguito a modificazioni post-traduzionali che prevedono reazioni di miristilazione e palmitoilazione, la proteina eNOS viene localizzata in particolari strutture ricche di colesterolo denominate caveole, che rappresentano dei microdomini specializzati all'interno della membrana plasmatica e contengono anche glicosfingolipidi, sfingomieline e una serie di molecole implicate nella trasduzione del segnale. Le LDL ossidate (oxLDL) possono fungere da accettori di colesterolo, il che ha come conseguenza il danneggiamento delle ca-

veole e l'alterazione della funzionalità della eNOS. Tuttavia, in presenza di oxLDL, le HDL consentono di ripristinare nelle caveole un ambiente lipidico adeguato mantenendo il livello di colesterolo totale tramite la liberazione di colesteril-esteri. Ciò assicura la protezione della funzionalità e del *signaling* mediato da eNOS. Inoltre, le HDL impediscono il disaccoppiamento della eNOS ad opera delle LDL, che favorirebbe la produzione di O₂ piuttosto che di NO.

Monostrato endoteliale

L'integrità del monostrato di cellule endoteliali è fondamentale per la regolazione locale dell'emostasi e della trombolisi e fornisce una barriera non permeabile che protegge le cellule muscolari lisce dei vasi sanguigni dai fattori di crescita circolanti. La distruzione del monostrato endoteliale espone la parete arteriosa a un maggior rischio di malattia vascolare. Le HDL promuovono il mantenimento dell'integrità del monostrato endoteliale proteggendo le cellule endoteliali dall'apoptosi e favoriscono la crescita e la migrazione.

L'attività antiapoptotica delle HDL è esercitata attraverso vari meccanismi tra cui l'inibizione dell'aumento delle concentrazioni intracellulari di calcio indotto da agenti proapoptotici quali la presenza di LDL ossidate, la soppressione dell'attività delle caspasi 3 e 9 e l'antagonismo di una serie di altri meccanismi apoptotici (29).

La stimolazione della proliferazione e della migrazione delle cellule endoteliali mediata dalle HDL sono processi Ca²⁺-dipendenti (30) attivati attraverso vie di trasduzione del segnale che iniziano tramite il legame al recettore SR-BI e prevedono l'attivazione di una serie di cascate di fosforilazioni che vedono coinvolte le proteine PI3-chinasi, p38 MAP-chinasi, p42/44 MAP-chinasi, Rho-chinasi e la GTPasi Rac.

Proprietà antitrombotiche

L'aterotrombosi arteriosa è associata a dislipidemia e i pazienti affetti presentano frequentemente ridotti livelli plasmatici di particelle HDL di grandi dimensioni (31).

Le HDL possono esercitare una serie di azioni antitrombotiche attraverso diversi meccanismi, tra i quali: aumento del flusso sanguigno tramite stimolazione della sintesi di NO e prostaciline; attenuazione della produzione di trombina mediante stimolazione dell'attività della proteina C e proteina S (32) e up-regolazione della trombosmodulina (33); diminuzione dell'attivazione endoteliale tramite inibizione dell'apoptosi delle cellule endoteliali, inibizione dell'espressione di tissue factor, P-selectina ed E-selectina, induzione della produzione di NO (34, 35); diminuzione dell'attivazione piastrinica tramite la down-regolazione del rilascio del fattore di attivazione piastrinica e della sintesi di trombosano A2 e la up-regolazione della sintesi di NO e prostaciline (36, 37).

Inoltre, le HDL promuovono la fibrinolisi mediante la down-regolazione dell'inibitore-1 dell'attivatore del plasminogeno (PAI-I) e la up-regolazione dell'attivatore tissutale del plasminogeno (t-PA) (38).

In particolare, esperimenti su cellule endoteliali umane in coltura hanno dimostrato che la stimolazione dell'espressione di PAI-I viene indotta dalla presenza di HDL3 ossidate ma non dalle HDL3 native; pertanto, gli effetti pro-fibrinolitici delle HDL si manifesterebbero proprio in presenza di un danno ossidativo subito dalle HDL stesse (36).

Proprietà antinfiammatorie

L'infiammazione gioca un ruolo chiave nello sviluppo della malattia coronarica e di altre manifestazioni dell'aterosclerosi.

Le cellule immunitarie controllano la lesione aterosclerotica (ateroma) precoce, le relative molecole effettrici accelerano la progressione della lesione e l'attivazione del processo infiammatorio può indurre la sindrome coronarica acuta. Linfociti T, macrofagi e mastociti infiltrano la lesione (39) e molte di queste cellule mostrano segni di attivazione e producono citochine infiammatorie (40). L'interazione tra leucociti ed endotelio avviene secondo un complesso processo multi-step mediato da numerosi recettori di adesione. Le HDL limitano l'adesione dei leucociti alla parete del vaso attraverso l'inibizione dell'espressione e la riduzione dell'affinità di determinate molecole di adesione endoteliali (41). Un possibile chiarimento di queste e possibilmente di altre funzioni delle HDL può provenire da un potentissimo nuovo strumento tecnologico costituito dagli studi di proteomica.

Questa si avvale dell'analisi condotta con metodiche di spettrometria di massa in grado di indagare nel dettaglio la composizione proteica di vari sistemi (cellule, tessuti, liquidi circolanti o particelle complesse come le lipoproteine). In una recente analisi del proteoma delle HDL isolate da soggetti sani sono state individuate almeno 48 diverse componenti proteiche tra cui tutte quelle già note coinvolte nel trasporto dei lipidi (42).

Inaspettatamente però, la maggior parte delle proteine identificate non erano quelle coinvolte nel metabolismo lipidico bensì nella risposta di fase acuta, motivo per cui si ipotizza un ruolo di fondamentale importanza delle HDL nella risposta antinfiammatoria che potrebbe avere implicazioni non soltanto nella protezione dal rischio di aterosclerosi ma anche nella risposta immunitaria nelle affezioni da agenti patogeni come virus, batteri e parassiti.

Conclusioni e prospettive future

Il ruolo e le funzioni delle HDL nel proteggere dal rischio di aterosclerosi, come sempre avviene nel progresso delle scienze, sono decisamente più complessi rispetto alle conoscenze di qualche anno fa.

È probabile che il trasporto inverso del colesterolo spieghi soltanto in parte tale ruolo protettivo e che altre funzioni possano entrare in gioco nei vari momenti fisiopatologici che dalla iniziale sofferenza endoteliale portano alla complicità finale costituita dalla trombosi del vaso arterioso. Nel futuro a medio termine otterremo informazioni sulla capacità degli inibitori della CETP come l'Anacetrapib, l'Evacetrapib e il Dalcetrapib, in grado di aumentare i livelli delle HDL anche del 100%, nel ridurre l'incidenza di eventi cardiovascolari. Strumenti tecnologici avanzati come l'indagine proteomica contribuiranno a identificare il ruolo delle differenti componenti proteiche delle HDL nelle varie funzioni "pleiotropiche" e a fornire un possibile utilizzo terapeutico.

Glossario

ABC	ATP-binding Cassette
CETP	Cholesteryl Ester Transfer Protein
eNOS	Endothelial Nitric Oxide Synthase
Hcy	Homocysteine
HDL	High Density Lipoprotein
LCAT	Lecithin:cholesterol Acyltransferase
LDL	Low Density Lipoprotein
PAF-AH	Platelet-activating Factor Acetylhydrolase
PAI	Plasminogen Activator Inhibitor
PON	Paraoxonase
tPA	Tissue Plasminogen Activator
ROS	Reactive Oxygen Species
SAA	Serum Amyloid Protein A
SR-BI	Scavenger Receptor B type I

Bibliografia

1. Fidge NH. High density lipoprotein receptors, binding proteins, and ligands. *J Lipid Res.* 1999; 40: 187-201.
2. Gordon DJ, Rifkind BM. High-density lipoprotein - the clinical implications of recent studies. *N Engl J Med.* 1989; 321: 1311-1316.
3. Gordon T, Castelli WP, Hjortland MC, Kannel WB, Dawber TR. High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease. The Framingham Study. *Am J Med.* 1977; 62: 707-714.
4. Boden WE. High-density lipoprotein cholesterol as an independent risk factor in cardiovascular disease: assessing the data from Framingham to the Veterans Affairs High-Density Lipoprotein Intervention Trial. *Am J Cardiol.* 2000; 86: 19L-22L.
5. Wang N, Ranalletta M, Matsuura F, Peng F, and Tall AR. LXR-induced redistribution of ABCG1 to plasma membrane in macrophages enhances cholesterol mass efflux to HDL. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2006; 26: 1310-1316.
6. Matsuura F, Wang N, Chen W, Jiang XC, and Tall AR. 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: 1435-1442.
7. Cuchel M, and Rader DJ. Macrophage reverse cholesterol transport: key to the regression of atherosclerosis? *Circulation.* 2006; 113: 2548-2555.
8. Mackness, MI and Durrington PN. HDL, its enzymes and its potential to influence lipid peroxidation. *Atherosclerosis.* 1995; 115: 243-253.
9. Reddy ST, Wadleigh DJ, Grijalva V, Ng C, Hama S, Gangopadhyay A, Shih DM, Lusis AJ, Navab M and Fogelman A. Human paraoxonase-3 is an HDL-associated enzyme with biological activity similar to paraoxonase-1 protein but is not regulated by oxidized lipids. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21: 542-547.
10. Lee C, Sigari F, Segrado T, Horkko S, Hama S, Subbiah PV, Miwa M, Navab M, Witztum JL, and Reaven PD. All ApoB containing lipoproteins induce monocyte chemotaxis and adhesion when minimally modified. Modulation of lipoprotein bioactivity by platelet-activating factor acetylhydrolase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999; 19: 1437-1446.
11. Bowry VW, Stanley KK, and Stocker R. High density lipoprotein is the major carrier of lipid hydroperoxides in human blood plasma from fasting donors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1992; 89: 10316-10320.
12. Christison JK, Rye KA, and Stocker R. Exchange of oxidized cholesteryl linoleate between LDL and HDL mediated by cholesteryl ester transfer protein. *J. Lipid Res.* 1995; 36: 2017-2026.
13. Ahmed Z, Ravandi A, Maguire GF, Emili A, Draganov D, La Du BN, Kuksis A and Connelly PW. Multiple substrates for paraoxonase-1 during oxidation of phosphatidylcholine by peroxynitrite. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002; 290(1): 391-396.
14. Navab M, Hama-Levy S, Van Lenten BJ, Hough GP, Fonarow GC, Cardinez CJ, Castellani L W, Brennan M-L, Lusis AJ, and Fogelman AM. Mildly Oxidized LDL Induces an Increased Apolipoprotein J/Paraoxonase Ratio. *J Clin Invest.* 1997; 99: 2005-2019.
15. McElveen J, Mackness MI, Colley CM, Peard T, Warner S, and Walker CH. Distribution of Paraoxon Hydrolytic Activity in the Serum of Patients after Myocardial Infarction. *Clin. Chem.* 1986; 32: 671-673.
16. Abbott CA, Mackness MI, Kumar S, Boulton AJM, and Durrington PN. Serum Paraoxonase Activity, Concentration, and Phenotype Distribution in Diabetes Mellitus and Its Relationship to Serum Lipids and Lipoproteins. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1995; 15: 1812-1818.
17. Zeiher AM, Schachlinger V, Hohnloser SH, Saubier B, Just H. Coronary atherosclerotic wall thickening and vascular reactivity in humans. Elevated high-density lipoprotein levels ameliorate abnormal vasoconstriction in early atherosclerosis. *Circulation.* 1994; 89: 2525-2532.
18. Li XP, Zhao SP, Zhang XY, Liu L, Gao M, Zhou QC. Protective effect of high density lipoprotein on endothelium-dependent vasodilatation. *Int J Cardiol.* 2000; 73: 231-236.

19. Kuvin JT, Patel AR, Sidhu M, Rand WM, Sliney KA, Pandian NG, Karas RH. Relation between high-density lipoprotein cholesterol and peripheral vasomotor function. *Am J Cardiol.* 2003; 92: 275-279.
20. Bauters, C., Amant, C., Boulrier, A., Cabrol, P, McFadden, E., Duriez, P., Bertrand, M.E., Amouyel, P. Paraoxonase Polymorphism (Gln192Arg) as a Determinant of the Response of Human Coronary Arteries to Serotonin. *Circulation.* 2000; 101: 740-743.
21. Pasqualini L, Cortese C, Marchesi S, Siepi D, Pirro M, Vaudo G, Liberatoscioli L, Gnasso A, Schillaci G, Mannarino E. Paraoxonase-1 activity modulates endothelial function in patients with peripheral arterial disease. *Atherosclerosis.* 2005; 183(2): 349-354.
22. Levels JH, Abraham PR, van den Ende A, and van Deventer SJ. Distribution and kinetics of lipoprotein-bound endotoxin. *Infect Immun.* 2001; 69: 2821-2828.
23. Pajkrt D, Doran JE, Koster F, Lerch PG, Arnet B, van der Poll T, ten Cate JW, and van Deventer SJ. Antiinflammatory effects of reconstituted high-density lipoprotein during human endotoxemia. *J Exp Med.* 1996; 184: 1601-1608.
24. Tam SP, Kisilevsky R, Ancsin JB. Acute-Phase-HDL Remodeling by Heparan Sulfate Generates a Novel Lipoprotein with Exceptional Cholesterol Efflux Activity from Macrophages. *PLoS One.* 2008; 3(12): e3867.
25. Hajduk SL, Moore DR, Vasudevacharya J, Siqueira H, Torri AF, Tytler EM, and Esko JD. Lysis of *Trypanosoma brucei* by a toxic subspecies of human high density lipoprotein. *J Biol Chem* 1989; 264: 5210-5217.
26. Shaul PW. Regulation of endothelial nitric oxide synthase: location, location, location. *Annu Rev Physiol.* 2002; 64: 749-774.
27. Naruse K, Shimizu K, Muramatsu M, Toki Y, Miyazaki Y, Okumura K, Hashimoto H, Ito T. Long-term inhibition of NO synthesis promotes atherosclerosis in the hypercholesterolemic rabbit thoracic aorta. PGH2 does not contribute to impaired endothelium-dependent relaxation. *Arterioscler Thromb.* 1994; 14: 746-752.
28. Cohen RA. The role of nitric oxide and other endothelium-derived vasoactive substances in vascular disease. *Prog Cardiovasc Dis.* 1995; 38: 105-128.
29. Nofer JR, Levkau B, Wolinska I, Junker R, Fobker M, von Eckardstein A, Seedorf U, Assmann G. Suppression of endothelial cell apoptosis by high density lipoproteins (HDL) and HDL-associated lysosphingolipids. *J Biol Chem.* 2001; 276: 34480-34485.
30. Tamagaki T, Sawada S, Imamura H, Tada Y, Yamasaki S, Toratani A, Sato T, Komatsu S, Akamatsu N, Yamagami M, Kobayashi K, Kato K, Yamamoto K, Shirai K, Yamada K, Higaki T, Nakagawa K, Tsuji H, Nakagawa M. Effects of high-density lipoproteins on intracellular pH and proliferation of human vascular endothelial cells. *Atherosclerosis.* 1996; 123: 73-82.
31. Asztalos BF, Cupples LA, Demissie S, Horvath KV, Cox CE, Batista MC, Schaefer EJ. High-density lipoprotein subpopulation profile and coronary heart disease prevalence in male participants of the Framingham Offspring Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004; 24: 2181-2187.
32. Griffin JH, Kojima K, Banka CL, Curtiss LK, Fernandez JA. Highdensity lipoprotein enhancement of anticoagulant activities of plasma protein S and activated protein C. *J Clin Invest.* 1999; 103: 219-227.
33. Nicholls SJ, Cutri B, Worthley SG, Kee P, Rye KA, Bao S, Barter PJ. Impact of short-term administration of high-density lipoproteins and atorvastatin on atherosclerosis in rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005; 25:2416-2421.
34. Barter PJ, Nicholls S, Rye KA, Anantharamaiah GM, Navab M, Fogelman AM. Anti-inflammatory properties of HDL. *Circ Res.* 2004; 95: 764-772.
35. Wadham C, Albanese N, Roberts J, Wang L, Bagley CJ, Gamble JR, Rye KA, Barter PJ, Vadas MA, Xia P. High-density lipoproteins neutralize C-reactive protein proinflammatory activity. *Circulation.* 2004; 109: 2116-2122.
36. Norata GD, Banfi C, Pirillo A, Tremoli E, Hamsten A, Catapano AL, Eriksson P. Oxidized-HDL3 induces the expression of PAI-1 in human endothelial cells. Role of p38MAPK

- activation and mRNA stabilization. *Br J Haematol.* 2004; 127: 97-104.
37. O'Connell BJ, Genest J Jr. High-density lipoproteins and endothelial function. *Circulation.* 2001; 104: 1978-1983.
38. Ridker PM, Brown NJ, Vaughan DE, Harrison DG, Mehta JL. Established and emerging plasma biomarkers in the prediction of first atherothrombotic events. *Circulation.* 2004; 109 (Suppl. IV): IV-6-IV-19.
39. Jonasson L, Holm J, Skalli O, Bondjers G, Hansson GK. Regional accumulations of T cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque. *Atherosclerosis.* 1986; 6: 131-138.
40. Frostegård J, Ulfgren AK, Nyberg P, Hedin U, Swedenborg J, Andersson U, Hansson GK. Cytokine expression in advanced human atherosclerotic plaques: dominance of proinflammatory (Th1) and macrophage-stimulating cytokines. *Atherosclerosis.* 1999; 145: 33-43.
41. Barter PJ. Inhibition of endothelial cell adhesion molecule expression by high density lipoproteins. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1997; 24: 286-287.
42. Heinecke JW. The Protein Cargo of HDL: Implications for Vascular Wall Biology and Therapeutics. *J Clin Lipidol.* 2010; 4(5): 371-375.