

**AGGIORNAMENTO****HDL E ATEROSCLEROSI: RUOLO DELLE MODIFICAZIONI DI APOA-I****HDL and atherosclerosis: role of apoA-I modifications****SABRINA PIGOZZO, ANTONIO ANTONUCCI, GIOVANNI SARTORE, ANNUNZIATA LAPOLLA, RAFFAELLA MARIN, SABINA ZAMBON, ENZO MANZATO***Dipartimento di Medicina, Azienda Ospedaliera Universitaria di Padova***SUMMARY**

High-density lipoprotein (HDL) protects against atherosclerosis through multiple mechanisms that include amelioration of endothelial dysfunction, antioxidative, anti-inflammatory and antiapoptotic effects and removal of cholesterol excess from macrophages. Under particular circumstances, HDL loses its atheroprotective properties, resulting in the formation of dysfunctional HDL particles. Dysfunctional HDL particles increase proinflammatory signaling and reduce reverse cholesterol transport (RCT). Epidemiological studies have demonstrated that plasma HDL levels independently predict the risk of developing atherosclerosis and cardiovascular disease. More recently, however, it has emerged that HDL quality also seems to be an important parameter in atheroprotection and the HDL can be functionally deficient in populations at high risk of cardiovascular disease (CHD).

Apolipoprotein AI (apoA-I), the main protein of HDL, plays a crucial part in the first RCT step by enhancing sterol efflux from macrophages. Myeloperoxidase-mediated oxidation of Tyr (tyrosine) and Met (methionine) residues in apoA-I can damage this apoprotein and drastically impairs the protein's ability to promote cholesterol efflux via the ABCA1 pathway. The post-translation modifications create dysfunctional HDL particles that are associated with an increased incidence of cardiovascular events. It's important to evaluate the quality and not just the quantity of HDL when considering the risk of cardiovascular events because HDL cholesterol levels do not predict the composition and/or function of this lipoproteins. Levels of MetO (methionine sulfoxide) residues in plasma apoA-I, measured using an accurate, specific method, should be investigated and considered in prospective future studies in order to assess their possible role as a novel risk factor.

**Key words:** HDL oxidation; Apolipoprotein A-I; MetO methionine sulfoxide; Myeloperoxidase-mediated oxidation; Tyr and Met residues; Type 2 diabetes.

*Indirizzo per la corrispondenza*

Sabrina Pigozzo  
Dipartimento di Medicina, Azienda Ospedaliera  
Universitaria di Padova  
Clinica Geriatrica  
Via Giustiniani, 2 - 35128 Padova  
E-mail: enzo.manzato@unipd.it

**Introduzione**

Le High Density Lipoprotein (HDL) plasmatiche rappresentano un gruppo eterogeneo di particelle dalla forma discoidale e sferica che differiscono per dimensioni, densità e mobilità elettroforetica dovute a differenze nel loro contenuto proteico e lipidico (1). Le HDL sono state a lungo con-

siderate un fattore protettivo contro lo sviluppo dell'aterosclerosi attraverso diversi meccanismi che comprendono fra l'altro il trasporto inverso del colesterolo (reverse cholesterol transport - RCT), inibizione dell'ossidazione dei lipidi, miglioramento della funzione endoteliale e attraverso le loro proprietà anti-ossidanti, anti-infiammatorie e anti-apoptotiche (2).

Se numerosi studi clinici hanno dimostrato una relazione inversa tra le concentrazioni plasmatiche di HDL e il rischio di patologia cardiovascolare, recentemente è emerso che un fattore importante di ateroprotezione sembra essere la loro composizione più che la loro quantità, mettendo in dubbio l'idea che alti livelli di HDL si traducano automaticamente in un rischio ridotto di aterosclerosi (3-5).

Uno dei motivi che potrebbe giustificare una riduzione delle capacità del "sistema HDL" di prevenire lo sviluppo di lesioni aterosclerotiche risiede nelle modificazioni alle quali possono andare incontro le HDL circolanti nel plasma.

Diversi meccanismi sono in grado di alterare la qualità e, quindi, la funzionalità delle HDL.

L'apoproteina A-I (apoA-I), principale componente proteico delle HDL, può subire delle modificazioni ossidative che ridurrebbero il suo ruolo anti-aterogeno (6). L'ossidazione e la nitrosilazione mieloperossidasi-mediata di specifici residui

di metionina e tirosina su apoA-I renderebbero le HDL "disfunzionali" riducendo la loro capacità di promuovere l'efflusso di colesterolo dai macrofagi della parete arteriosa per l'escrezione (RCT) e il loro potere anti-aterogeno, aumentando nel contempo il rischio di eventi cardiovascolari (7). Comprendere le caratteristiche e i meccanismi che portano alla formazione di HDL e, in particolare, di apoA-1 disfunzionali, potrebbe portare a nuovi approcci diagnostici e terapeutici per l'aterosclerosi nella pratica clinica.

### Modificazioni strutturali delle HDL

#### *Meccanismi di alterazione delle HDL*

La capacità delle HDL di rimuovere l'eccesso di colesterolo dalle membrane delle cellule periferiche, dai macrofagi e dalle cellule schiumose, mediata dai trasportatori ABCA1 (ATP-binding cassette transporter A1) e ABCG1 (ATP-binding cassette transporter G1), è considerata come la più importante funzione svolta da questa classe di lipoproteine nella riduzione della formazione della placca aterosclerotica e di protezione contro l'aterosclerosi. Oltre a questo, le HDL riescono a contrastare i meccanismi aterosclerotici con la loro attività antiinfiammatoria (8), antitrombotica (9) e profibrinolitica (10), con le loro proprietà antiossidanti e di regolazione della produzione di ossido nitri-

**Tabella I - Meccanismi antiaterogeni delle HDL normali e disfunzionali.**

HDL "normali"	HDL "disfunzionali"
Trasporto inverso del colesterolo ↑	Trasporto inverso del colesterolo ↓
Infiammazione ↓	Infiammazione ↑
Trombosi ↓ Fibrinolisi ↑	Trombosi ↑ Fibrinolisi ↓
Ossidazione ↓ Produzione di ossido nitrico ↑	Ossidazione ↑ Produzione di ossido nitrico ↓
Risposta immunitaria ↑	Risposta immunitaria ↓

co (11), oltre ad avere un ruolo importante nella risposta immunitaria (12) (HDL “funzionali” (Tabella 1).

Le HDL possono subire diverse modificazioni attraverso vari meccanismi che sono in grado di alterare le loro proprietà antiaterogene (HDL “disfunzionali”): modificazioni non enzimatiche, dovute alla presenza di ioni metallici liberi nelle placche aterosclerotiche; attività di enzimi cellulari, in grado di degradare la componente apoproteica senza cambiamenti significativi nella frazione lipidica oppure indurre il cross-linking tra apoproteine e lipidi ossidati; proteine della fase acuta, i cui livelli circolanti sono aumentati significativamente durante l’infiammazione e che, interagendo con le HDL, possono modificare la loro struttura e funzione; modificazioni metaboliche, come la glicazione che si verifica in condizioni di iperglicemia (Tabella 2).

■ *Modificazioni non enzimatiche*: le placche aterosclerotiche umane contengono ioni metallici liberi che inducono la produzione di radicali dell’ossigeno. Questo meccanismo sembra giocare un ruolo chiave nella patologia cardiovascolare, probabilmente dovuto alla capacità di ossidare le LDL. Il rame riesce a modificare le

HDL attraverso la perossidazione lipidica e l’ossidazione delle apoproteine determinando la formazione di cross-link tra le apoproteine stesse. Durante le fasi precoci dell’ossidazione, si possono osservare tre specie di apoA-I ossidate, caratterizzate da un aumento della massa dovuto alla modificazione di due residui metioninici critici (Met86 e Met112). L’apoA-II, che costituisce circa il 20% delle apoproteine presenti nelle HDL, può essere convertita anch’essa in specie a massa maggiore dovuta all’ossidazione di un singolo residuo metioninico (Met26). L’ossidazione di metionina legata alla proteina, e la conseguente modificazione post-traduzionale, altera la funzione della proteina stessa portando alla sua inattivazione (13). Tali modificazioni riducono l’abilità delle HDL di stimolare l’efflusso di colesterolo dai macrofagi, aumentando così il contenuto cellulare di colesterolo libero. Le HDL ossidate dal rame, inoltre, sono citotossiche per i macrofagi in maniera dose-dipendente legandosi alle cellule endoteliali e promuovendo l’attivazione di una serie di chinasi intracellulari (ERK1/2 e p38 MAPK). L’incubazione di cellule endoteliali con HDL ossidate provoca un marcato aumento della via di NFκB (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cell), fattore di trascrizione chiave nella risposta infiammatoria e un aumento dose-dipendente della produzione di specie reattive dell’ossigeno (14).

■ *Glicazione*: nel diabete di tipo 2 diversi fattori contribuiscono ad un elevato rischio di malattia cardiovascolare e ad una accelerata aterosclerosi. Tra questi la dislipidemia diabetica riveste un ruolo di particolare importanza. Il profilo lipidico tipico non solo nel diabete ma anche in altre patologie (dislipidemia familiare combinata, sindrome metabolica e sindrome dell’ova-

**Tabella 2 - Meccanismi di alterazione delle HDL.**

<b>MODIFICAZIONI NON ENZIMATICHE:</b>
• Ioni metallici liberi
<b>ATTIVITÀ DI ENZIMI CELLULARI:</b>
• Metallo proteasi di matrice
• Enzimi associati ai polimorfonucleati
<b>PROTEINE DELLA FASE ACUTA</b>
• Lipasi endoteliale
• Proteina amiloide sierica A
• Fosfolipasi A2 (secretory phospholipase A2 - sPLA2)
<b>MODIFICAZIONI METABOLICHE</b>
• Glicazione

io policistico, sindrome coronarica acuta), definito come Triade Lipidica Aterogena, è caratterizzato da livelli moderatamente aumentati di trigliceridi, bassi livelli di colesterolo plasmatici e colesterolo HDL, e da anomalie della composizione delle lipoproteine delle LDL e delle HDL (15). Circa il 40-50% dei soggetti con diabete di tipo 2 hanno una preponderanza di particelle LDL piccole e dense rispetto alle grandi e meno dense ed il singolo fattore più importante che determinerebbe la variabilità del diametro, sarebbe rappresentato dalle concentrazioni di trigliceridi plasmatici, che spiegherebbero il 50% di questa variabilità (16-19).

Se nel diabete di tipo 2 i bassi livelli di HDL contribuiscono ad aumentare il rischio cardiovascolare, i soggetti con diabete di tipo 1 sviluppano una grave aterosclerosi nonostante livelli normali o aumentati di HDL.

Una possibile spiegazione è che l'ipertrigliceridemia stimoli delle alterazioni funzionali delle HDL in grado di contribuire all'aterosclerosi accelerata dato che le apoproteine delle HDL in questi pazienti sono altamente glicate rispetto a quelle isolate da soggetti sani. In vitro, la glicazione delle HDL provoca un aumento della perossidazione lipidica, accelera il loro catabolismo, riduce il loro legame ai fibroblasti cutanei umani e riduce la capacità delle HDL di promuovere il trasporto inverso del colesterolo.

La glicazione aumenta la suscettibilità all'ossidazione proteica e, in vitro, le HDL glicate sono più sensibili all'effetto proossidante dell'alluminio.

Una combinazione di stress ossidativi e glicativi possono quindi alterare le funzioni biologiche delle HDL visto che, in vitro, la glicossidazione riduce l'abilità delle HDL nel rimuovere i perossidi lipidici dalle membrane ossidate (14).

### *Rimodellamento del "proteoma HDL" in stati patologici*

Dopo aver stabilito la grande varietà del proteoma delle HDL, le ricerche si sono focalizzate nel monitorare eventuali cambiamenti del contenuto proteico in diversi stati patologici.

Dal confronto dei profili proteici delle principali sottofrazioni delle HDL, è emerso che le diverse proteine implicate nei processi di infiammazione vascolare (apoC-IV, paraoxonasi-1, componente C3 del complemento e l'apoA-IV) sono presenti in quantità aumentate nelle lipoproteine di soggetti con coronaropatia rispetto ai normolipidemicici. Analisi condotte con metodiche di spettroscopia di massa, hanno evidenziato la presenza di pattern spettroscopici differenti tra i gruppi studiati con un aumento di apoA-I, apoC-III e apoC-I nei soggetti coronaropatici (20).

La paraoxonasi-1 (PON1) possiede capacità antiossidanti e antinfiammatorie e la sua ridotta attività nei soggetti con coronaropatia e con diabete mellito di tipo 2 è stata correlata ad un aumento del rischio cardiovascolare.

La ridotta attività di PON1, inoltre, è associata ad un aumento dell'attività di PKC $\beta$ II endoteliale (proteina chinasi C, appartenente alla famiglia delle proteine serina/treonina chinasi che giocano un ruolo importante nel differenziamento e nella proliferazione cellulare), che porterebbe all'inibizione dell'attivazione di eNOS (nitric oxide synthase), ad una diminuita produzione di ossido nitrico dalle cellule endoteliali ed alla perdita delle proprietà antiinfiammatorie e di riparazione endoteliale delle HDL (21, 22).

Nei pazienti con diabete di tipo 2 i livelli plasmatici di HDL e il loro contenuto apoproteico sono significativamente alterati. Le concentrazioni di HDL e di apoA-I possono essere ridotte a causa di una diminui-

ta sintesi di apoA-I, catabolismo accelerato delle HDL e sostituzione dell'apoA-I con proteine sieriche amiloidi A (SAA). Le SAA vengono trasportate principalmente dalle HDL3 e riescono a sostituire l'apoA-I e altre apoproteine dalla superficie delle HDL in condizioni di infiammazione. Elevati livelli plasmatici di SAA, come quelli osservabili in pazienti con diabete di tipo 2, rappresentano un fattore di rischio cardiovascolare.

Oltre alla potenziale sostituzione da parte delle SAA, l'apoA-I e altre proteine trasportate dalle HDL possono andare incontro a modificazioni covalenti nella parete arteriosa. Residui amminoacidici dell'apoA-I, come la metionina, la tirosina, la cisteina e la lisina, possono essere selettivamente ossidate in condizioni di stress ossidativo e possono subire una glicosilazione non enzimatica in presenza di elevati livelli di glucosio. Lo stress ossidativo rappresenta una caratteristica importante del diabete di tipo 2, derivando in parte da una produzione elevata di specie reattive di ossigeno, azoto e cloro nella parete arteriosa. I residui amminoacidici ossidati, comprendenti nitrotirosina, clorotirosina, lisina ossidata e metionina ossidata, sono presenti nell'apoA-I isolata dal plasma e da lesioni aterosclerotiche umane (23). Nei pazienti con diabete di tipo 2 sono anche presenti elevati livelli di apoA-I nitrata.

L'iperglicemia porta quindi ad un accumulo di apoA-I e apoA-II gliccate e alla glicosilazione non enzimatica in vivo di altre proteine presenti nelle HDL. Frazioni gliccate di HDL contenenti solo apoA-I (LpA-1) possono essere isolate dal plasma di soggetti con un diabete di tipo 1 scarsamente controllato e la loro conformazione appare così modificata da non essere accessibili ad anticorpi monoclonali anti-apoA-I. È stato visto che i livelli plasmatici

dell'apoA-I nitrata non correlano con quelli dell'emoglobina glicata o di altri parametri di iperglicemia, suggerendo che lo stress ossidativo e l'iperglicemia modificano le HDL attraverso meccanismi separati.

### **L'ossidazione delle HDL e dell'apoproteina A-I**

L'ossidazione delle LDL è generalmente considerata come uno step critico nel processo aterosclerotico. Le LDL ossidate (oxLDL) sono presenti nelle lesioni aterosclerotiche dell'uomo e il loro ritrovamento in circolo attraverso metodi immunologici è usato come marker surrogato di patologia aterosclerotica. La misurazione dei livelli di oxLDL come marcatore diagnostico è però limitato per diverse ragioni. Innanzitutto, il termine "oxLDL" si riferisce ad una miscela di lipoproteine modificate che resta chimicamente non caratterizzata, poi vi sono delle incertezze riguardo l'accuratezza di tali misurazioni ed, infine, il "rilascio" di oxLDL dalla parete arteriosa è ostacolato dalle grosse dimensioni di tali lipoproteine e dal loro intrappolamento nella matrice extracellulare.

Per contro, sappiamo che i livelli di HDL e di apoA-I correlano inversamente con il rischio di sviluppare patologia coronarica per la loro attività antiaterosclerotica. Le HDL possono essere ossidate al pari delle LDL ed i lipidi presenti nelle HDL vengono ossidati prima di quelli delle LDL quando il plasma è esposto a radicali perossidici. Inoltre, i lipidi delle HDL e quelli presenti nelle LDL isolati da lesioni aterosclerotiche umane sono ossidati in grado comparabile che aumenta con il progredire della gravità della patologia.

Diverse considerazioni supportano l'uso potenziale delle HDL ossidate o dei loro componenti come marker di patolo-

**Tabella 3 - Considerazioni sul potenziale utilizzo delle LDL e HDL ossidate (oxLDL, oxHDL) come marker di patologia aterosclerotica.**

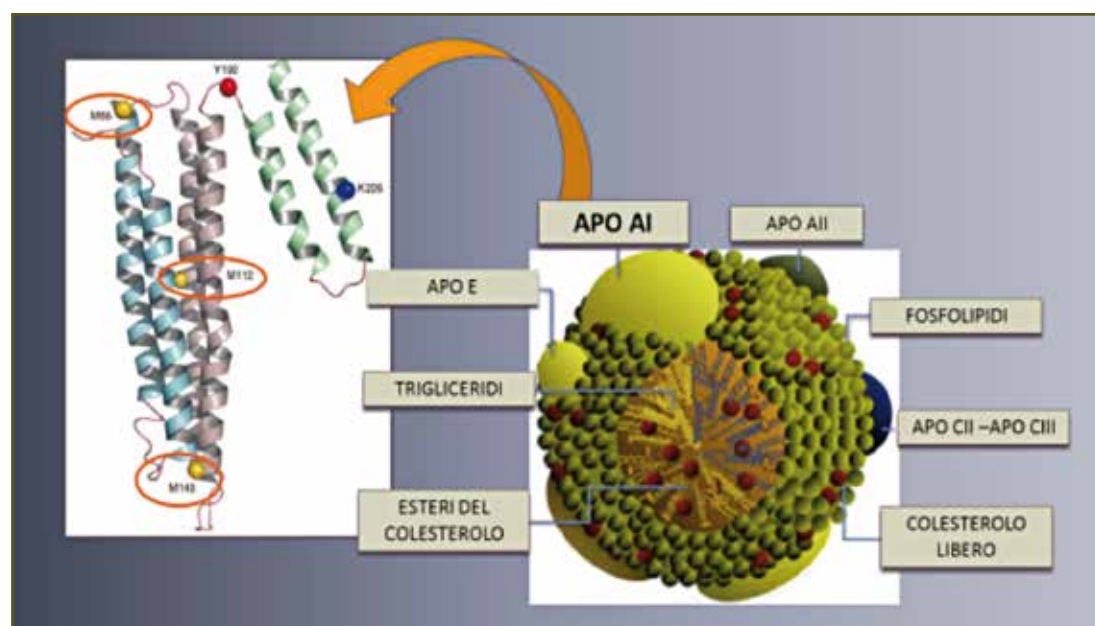
oxLDL	oxHDL
<ul style="list-style-type: none"> <li>Miscela di lipoproteine non caratterizzate chimicamente</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Lipoproteine più facilmente caratterizzabili chimicamente</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>Incertezza sull'accuratezza dei metodi per la loro misurazione</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Per proprietà fisiche e dimensioni più piccole più facilmente analizzabili</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>Rilascio in circolo ostacolato dalle loro dimensioni</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Rilascio in circolo più rapido delle oxLDL per le loro minori dimensioni</li> </ul>

gia aterosclerotica. Essendo sostanzialmente più piccole e interagendo meno fortemente con i proteoglicani extracellulari, ci si aspetta che le HDL presenti nella parete vascolare rientrino in circolo più rapidamente rispetto alle LDL. Rispetto all'apoB-100, le apoproteine delle HDL si dissociano rapidamente dalle lipoparticelle aumentando la probabilità di ritrovarle nel circolo ematico. Infine, viste le loro proprietà fisiche e le dimensioni molecolari più piccole, le forme ossidate di apoA-I sono più facilmente analizzabili rispetto a

quelle di apoB-100, così da poterle caratterizzare chimicamente (*Tabella 3*) (24).

#### *Caratterizzazione delle forme ossidate dell'apoproteina A-I*

L'apoA-I costituisce circa il 70% delle proteine totali delle HDL, mentre il restante 20-25% è dato da apoA-II e altre proteine. L'apoA-I umana è un polipeptide formato da 243 aminoacidi, 3 dei quali sono residui metioninici, presenti in posizione 86, 112 e 148. La sua sequenza è organizzata in 8 segmenti ad  $\alpha$ -elica di



**Figura 1 - Composizione delle HDL.** Nella figura viene riportata la composizione delle HDL e dei residui metioninici dell'apoA-I presenti in posizione 86,112 e 114 che possono subire modificazioni ossidative.

22 aminoacidi e due tratti ripetitivi di 11 aminoacidi frequentemente separati da residui di prolina.

Tale struttura, in parte idrofobica e in parte polare, permette di interagire con i lipidi e con la soluzione acquosa (*Figura 1*) (25).

Durante l'aterogenesi diverse sostanze ossidanti, utilizzate anche in diversi studi in vitro, contribuiscono alla modificazione delle lipoproteine e apoproteine in modo diverso ed è stato dimostrato che l'ossidazione dei residui di metionina dell'apoA-I provoca preferenzialmente l'ossidazione dei lipidi piuttosto che quella delle proteine (24).

Con l'utilizzo della cromatografia liquida e della metodica MALDI - TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - MALDI/time of flight - TOF) si è potuto constatare come l'apoA-I eluisca dalle HDL native non ossidate come una singola specie. L'esposizione delle HDL a radicali perossidici provocava un'ossidazione dell'apoproteina in maniera tempo-dipendente, caratterizzata dalla diminuzione dell'apoA-I e dall'accumulo di nuove specie ossidate. Tale tecnica ha permesso inoltre la separazione di tre specie ossidate di apoA-I, due con un incremento di massa pari a 16 Da (chiamate apoA-I+16) e una terza con un aumento di massa pari a 32 Da (chiamata apoA-I+32) dovuto all'ossidazione di uno o di entrambi i residui di metionina in posizione 86 e 112. L'apoA-I+16, contenente un residuo MetO112, è apparsa come la forma prevalente tra le due specie di apoA-I+16, probabilmente per una esposizione prolungata di questo residuo ai perossidi lipidici presenti nelle HDL ossidate. Le due specie di apoA-I+16 si accumulavano prima di apoA-I+32 che conteneva entrambi i residui di metionina 86 e 112 ossidati. In questo modo, il 10-20% dell'apoA-I totale veniva convertito in apoA-I+16 prima che

i livelli di apoA-I+32 raggiungessero livelli misurabili.

Un altro studio effettuato con la spettrometria di massa ha analizzato i frammenti proteolitici provenienti dall'apoA-I ossidata con perossido di idrogeno ed ha dimostrato che le due quote proteiche possedevano metionina ossidata in posizione 112 e 148 (26).

Similmente, l'esposizione delle HDL a concentrazioni relativamente alte di acido ipocloroso (HOCL) provocava l'ossidazione della metionina in posizione 148, suggerendo che i diversi residui di metionina possono ossidarsi grazie a reagenti differenti (27).

L'ossidazione dei residui di metionina dell'apoA-I rappresenta un processo graduale, dove un singolo residuo di metionina viene ossidato per primo (Met86 o Met112), seguito da un secondo residuo (24).

#### *Meccanismi di ossidazione delle HDL e apoA-I: conseguenze strutturali e funzionali*

L'aumento dello stress ossidativo, dovuto a modificazioni mieloperossidasi-mediate, è una caratteristica dell'aterosclerosi coronarica (28) che può portare a modificazioni ossidative dannose (2) generando "HDL disfunzionali".

La mieloperossidasi (MPO), enzima con un gruppo eme, è espressa ad alte concentrazioni dai neutrofili, monociti e macrofagi delle cellule schiumose delle lesioni aterosclerotiche (29). È in grado di utilizzare il perossido di idrogeno e di generare una vasta gamma di intermedi ossidanti reattivi che, successivamente, possono modificare lipidi, proteine, acidi nucleici e lipoproteine (30).

Il principale prodotto dell'attività di MPO è rappresentato dall'HOCL, il quale può modificare diverse biomolecole at-

traverso la clorazione e/o l'ossidazione. La modificazione delle HDL mediata da HOCL porta alla formazione di aggregati di apoA-I ad alto peso molecolare. Gli aminoacidi di apoA-I bersaglio di HOCL sono soprattutto i residui di metionina. L'ossidazione e le conseguenti alterazioni dei residui metioninici portano a modificazioni conformazionali dall'apoA-I priva o associata ai lipidi che riducono le sue proprietà anti-aterogene (31). L'ossidazione della tirosina (Tyr) e dei residui di metionina (Met) di apoA-I mieloperossidasi-mediati ostacolano drasticamente la capacità della proteina di promuovere l'efflusso di colesterolo dai macrofagi (7). Sono stati proposti diversi meccanismi per spiegare la ridotta capacità dell'efflusso di steroli delle HDL associate ad apoA-I mieloperossidasi-mediato.

È stato dimostrato come i residui Met86 e Met112 siano importanti per l'efflusso di colesterolo mediato dal trasportatore ABCA1 e il residuo Met148 sia coinvolto nell'attivazione di LCAT (24).

Un altro studio ha considerato l'ossidazione della Met e la clorazione sito-specifica di Tyr192 di apoA-I. I livelli di Tyr192 clorinato e di Met148 ossidato risultano essere più alti nei pazienti con malattia coronarica stabile o sindrome coronarica acuta (ACS) rispetto ai controlli e associati ad un ridotto efflusso di colesterolo dai macrofagi mediato da ABCA1 e allo stato della malattia coronarica (32, 33).

La metionina-solfossido (MetO) è il principale prodotto di ossidazione della metionina di apoA-I a seguito dell'azione di agenti ossidanti (34). Pertanto, la valutazione del livello di MetO potrebbe rappresentare da un lato lo stato di stress ossidativo e dall'altro la ridotta capacità di apoA-I modificato di rimuovere il colesterolo e i lipidi perossidati dalle LDL ossidate.

Lo studio dei siti di formazione e della quantità di MetO nell'apoA-I di HDL isolate dal plasma di controlli sani e soggetti con diabete mellito di tipo 1, ha dimostrato che la formazione di MetO era significativamente più importante nei soggetti diabetici rispetto al gruppo di controllo in ognuno dei tre siti considerati e cioè Met86, Met112 e Met148 (35).

Il danno ossidativo nella parete arteriosa HDL-associato di apoA-I o di apoA-I povera di lipidi modificate, potrebbe così promuovere lo sviluppo dell'aterosclerosi sia a livello sperimentale che nell'uomo (32, 36).

Numerosi lavori hanno dimostrato che le HDL isolate da ateromi e dal plasma di pazienti con patologie cardiovascolari sono prive di proprietà anti-aterogene (37), ma possono essere disfunzionali anche nelle popolazioni ad alto rischio di CHD, come nel diabete mellito tipo 2, a causa della glicazione e dei cambiamenti ossidativi delle HDL, apolipoproteine, e/o enzimi (38).

La distribuzione e la funzione biologica di apoA-I all'interno della parete dell'arteria è però distinta da quella delle HDL (36). La maggior parte di apoA-I nell'ateroma non è associato alle HDL (31,39) e modificazioni post-traduzionali di apoA-I povera di lipidi sono comuni nei siti di infiammazione e nelle placche aterosclerotiche.

### **Valutazione dell'ossidazione di apoA-I nella pratica clinica**

Considerando il ruolo rilevante dell'ossidazione delle HDL nell'insorgenza dei processi aterosclerotici, i livelli di colesterolo HDL non possono indicare la composizione e/o la loro funzione, né tantomeno predire la loro disfunzionalità e la loro attività pro-infiammatoria in condizioni patologiche. È quindi importante valutare la qualità e non solo la quantità del coleste-



rolo HDL quando si considera il rischio di eventi cardiovascolari.

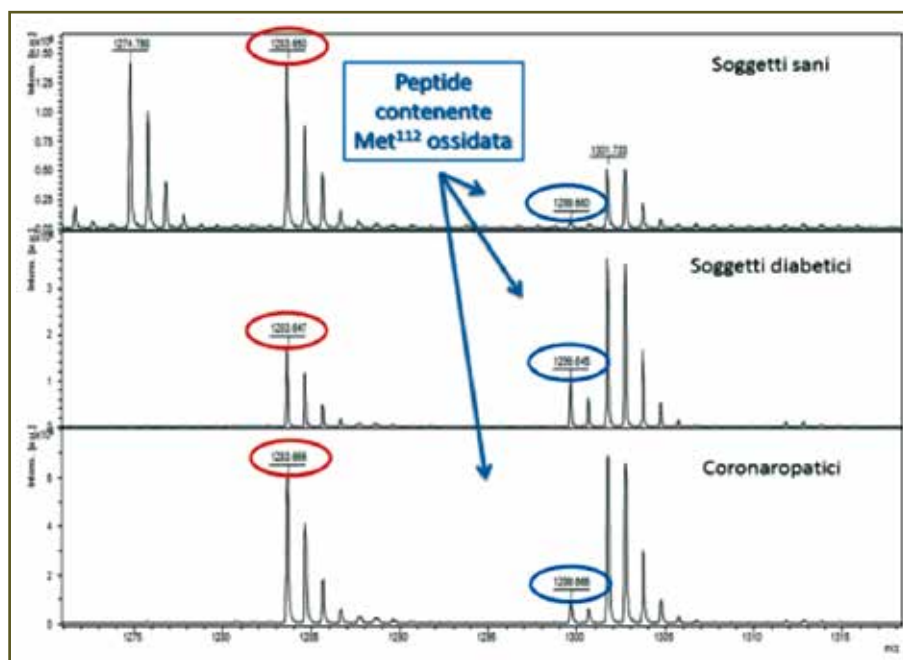
Nella pratica clinica, non esistono attualmente test disponibili per determinare la composizione, la funzionalità e per valutare le proprietà antinfiammatorie delle HDL. Piccoli peptidi che imitano alcune delle proprietà di apoA-I sono stati esaminati in modelli pre-clinici per migliorarne la funzionalità e ridurre l'aterosclerosi senza alterare i livelli di colesterolo HDL. Sono attualmente in corso studi clinici che utilizzano HDL e HDL mimetiche come agenti terapeutici (40).

Lo studio di modelli teorici di apoA-I libera da lipidi e sulla struttura delle HDL con tecniche come SANS (small angle neutron scattering con variazione di contrasto), HDX (hydrogen-deuterium exchange), XL-MS (cross linking mass spectrometry) o con la microscopia elettronica, sembrano difficilmente applicabili alla pratica clinica, sia per la complessità delle metodiche, sia per la loro difficile interpretazione (41).

Presso il nostro centro è stato condotto uno studio pilota su pazienti diabetici tipo 2 e soggetti giovani con patologia cardiovascolare. Utilizzando una cromatografia liquida associata alla spettrometria di massa (LC/ESI-MS) sono stati rilevati livelli più elevati di MetO112 nei diabetici rispetto ai controlli sani e i peptidi correlati all'ossidazione dell'apoA-I sono risultati 2,3-2,5 volte più elevati nei soggetti diabetici e in quelli con patologia cardiovascolare (42).

In uno studio successivo la determinazione del contenuto di MetO di apoA-I nei pazienti diabetici tipo 2 è stata effettuata con la spettrometria di massa ad alta risoluzione (MALDI/TOF) (43). I risultati ottenuti si sovrapponevano perfettamente a quelli dello studio precedente con LC/MS, confermando e rafforzando i dati ottenuti con un risparmio di tempo necessario all'analisi e dimostrando che i possibili fenomeni di ossidazione, talvolta osservati in condizioni MALDI, erano in questo caso assenti (44).

Lo scopo di un ultimo nostro studio è



**Figura 2** - Visione particolare dello spettro MALDI dei frammenti di digestione con tripsina ottenuti dalle HDL plasmatiche dei soggetti studiati. Appaiono evidenti alcune differenze tra i controlli sani, i soggetti diabetici e i coronaropatici, con la presenza di due picchi a  $m/z$  1299 e 2661 più evidenti, dovuti alla presenza di Met112 e una parte di Met112 ossidata, che differisce dalla specie non ossidata di 16 Da.

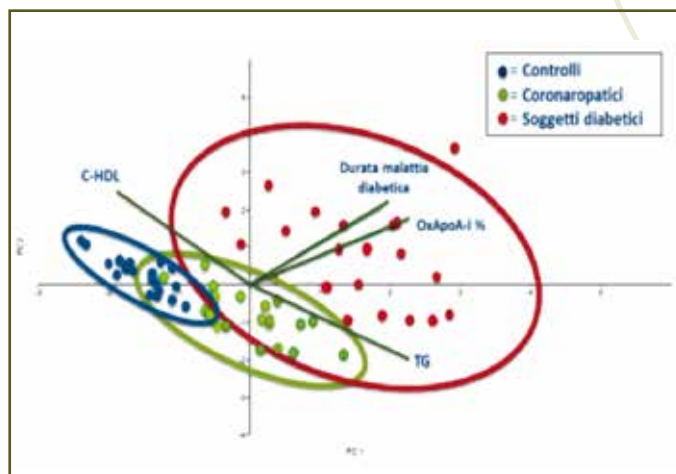
stato quello di cercare eventuali differenze significative di MetO contenute nell'apoA-I delle HDL di giovani pazienti con CHD, diabetici di tipo 2 e soggetti sani. A questo scopo sono stati esaminati, con la tecnica MALDI/TOF/TOF, i prodotti di digestione con tripsina dell'apoA-I delle HDL isolate mediante ultracentrifugazione preparativa sequenziale in tutti i soggetti.

È stata valutata la presenza di correlazioni tra i lipidi e le lipoproteine dei soggetti studiati e l'ossidazione dell'apoA-I, e, come obiettivo secondario, la presenza di correlazioni tra il controllo metabolico e la durata della malattia diabetica con l'ossidazione delle HDL.

Il tipico spettro MALDI ha mostrato un aumento di peptidi contenente MetO112 nei pazienti diabetici e con CHD (Figura 2), ma non è emersa alcuna correlazione tra i livelli di apoA-I ossidato (OxapoA-I) e la percentuale di emoglobina glicata, ad indicare che l'ossidazione dell'apoA-I è indipendente dal controllo glicemico della malattia diabetica, mentre una forte correlazione è emersa tra la durata della malattia diabetica e i livelli di OxapoA-I in pazienti diabetici di tipo 2 (Figura 3).

I risultati ottenuti avvalorano l'ipotesi di come la funzionalità delle HDL e la loro qualità siano importanti nella genesi e nella progressione della malattia cardiovascolare, al di là della concentrazione di colesterolo HDL (45).

Il risultato più importante è stato l'osservazione dell'ossidazione di metionina nell'apoA-I in soggetti particolarmente suscettibili alla patologia coronarica. Il dosaggio dei livelli di MetO plasmatici con metodi semplici e veloci, ma accurati e specifici, dovrebbe essere considerato in futuri studi prospettici per valutare il ruolo delle HDL come valido marcatore di patologia coronarica e per eventuali nuove prospettive terapeutiche.



**Figura 3** - Relazioni tra le variabili considerate con tecnica non parametrica nei 3 gruppi di soggetti studiati. Come mostra il grafico biplot, l'analisi dei tre gruppi conferma il loro diverso comportamento: l'assenza di qualsiasi correlazione tra i livelli di apoA-I ossidata ed il colesterolo delle HDL o i livelli di trigliceridi (i rispettivi angoli tra i vettori sono prossimi a 90°); la presenza di una correlazione inversa tra il colesterolo delle HDL e i livelli di trigliceridi (con un angolo di 180° tra i vettori); una forte correlazione diretta tra la durata della malattia diabetica e i livelli di apoA-I ossidata.

### Glossario

**ABCA1** ATP-binding cassette transporter A1

**ABCG1** ATP-binding cassette transporter G1

**PON1** Paraoxonasi 1

**SAA** Proteine sieriche amiloidi A

**MPO** Mieloperossidasi

**MetO** Metionina sulfossido

**HOCL** Acido ipocloroso

**Tyr** Tirosina

**Met** Metionina

**MALDI - TOF** Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - MALDI/time of flight - TOF

**SANS** Small angle neutron scattering con variazione di contrasto

**HDX** Hydrogen-deuterium exchange

**XL-MS** Cross linking mass spectrometry

**LC/ESI-MS** Cromatografia liquida associata alla spettrometria di massa

**RIASSUNTO**

Le lipoproteine ad alta densità (HDL) proteggono dall'aterosclerosi attraverso molteplici meccanismi che includono il miglioramento della disfunzione endoteliale, effetti antiossidanti, anti-infiammatori e antiapoptotici e rimozione del colesterolo in eccesso dai macrofagi. In casi particolari, le HDL perdono le loro proprietà ateroprotettive con la formazione di HDL disfunzionali. Le HDL disfunzionali aumentano i segnali proinfiammatori e riducono il trasporto inverso del colesterolo (RCT). Studi epidemiologici hanno dimostrato che i livelli circolanti di HDL plasmatiche predicono in modo indipendente il rischio di sviluppo di aterosclerosi e malattie cardiovascolari. Più recentemente, tuttavia, è emerso che la qualità delle HDL sembra essere un importante parametro di ateroprotezione e le HDL possono essere funzionalmente carenti nelle popolazioni ad alto rischio di malattie cardiovascolari (CHD).

L'apolipoproteina AI (apoA-I), principale proteina delle HDL, svolge un ruolo cruciale nella prima fase dell'RCT migliorando l'efflusso di steroli dai macrofagi. L'ossidazione mieloperossidasi-mediata del residuo di Tyr (tirosina) e Met (metionina) di apoA-I può danneggiare questa apoproteina e compromettere drasticamente la capacità di promuovere l'efflusso di colesterolo attraverso la via ABCA1. Le modificazioni post-trasduzionali creano delle HDL disfunzionali associate ad una aumentata incidenza di eventi cardiovascolari.

È importante valutare la qualità e non solo la quantità delle HDL nel considerare il rischio di eventi cardiovascolari in quanto i livelli di colesterolo HDL non predicono la composizione e/o la funzione di queste lipoproteine. I livelli plasmatici dei residui di MetO (metionina solfossido) nell'apoA-I, misurati con un metodo accurato e specifico, dovrebbero essere studiati e presi in considerazione in studi futuri prospettici al fine di valutare il loro possibile ruolo come nuovo fattore di rischio.

**Parole chiave:** *Ossidazione HDL; Apolipoproteina A-I; MetO metionina solfossido; Ossidazione mieloperossidasi-mediata; residui Tyr e Met; Diabete di tipo 2.*

**Bibliografia**

- Rosenson RS, Brewer HB Jr, Chapman MJ, et al. HDL measures, particle heterogeneity, proposed nomenclature, and relation to atherosclerotic cardiovascular events. *Clin Chem.* 2011; 57: 392-410.
- Rosenson RS, Brewer HB Jr, Ansell BJ, et al. Dysfunctional HDL and atherosclerotic cardiovascular disease. *Nat Rev Cardiol.* 2016; 13: 48-60.
- Voight BF, Peloso GM, Orho-Melander M, et al. Plasma HDL cholesterol and risk of myocardial infarction: a mendelian randomisation study. *Lancet* 2012; 380: 572-580.
- Haase CL, Tybjaerg-Hansen A, Qayyum AA, et al. LCAT, HDL cholesterol and ischemic cardiovascular disease: a Mendelian randomization study of HDL cholesterol in 54.500 individuals. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012; 97: E248-256.
- Calabresi L, Gomaschi M, Simonelli S, et al. HDL e aterosclerosi: la lezione dei deficit genetici di HDL. *Giornale Italiano dell'Aterosclerosi.* 2016; 7: 9-22.
- Lapolla A, Sartore G. The role of lipoprotein abnormalities as risk factors for macroangiopathy in type 2 diabetes. In: *Handbook of lipoprotein research*, editor: Jackson E. Rathbond, [chapter 14], 227-231, Nova Science Publishers Inc.
- Shao B, Oda MN, Bergt C, et al. Myeloperoxidase impairs ABCA1-dependent cholesterol efflux through methionine oxidation and site-specific tyrosine chlorination of apolipoprotein A-I. *J Biol Chem.* 2006; 281: 9001-9004.
- Soro-Paavonen A, Westerbacka J, Ehnholm C, et al. Metabolic syndrome aggravates the increased endothelial activation and low-grade inflammation in subjects with familial low HDL. *Ann Med.* 2006; 38: 229-238.
- Tselepis AD, Tsoamani ME, Kalantzi KI, et al. Influence of high-density lipoprotein and paraoxonase-1 on platelet reactivity in patients with acute coronary syndromes receiving clopidogrel therapy. *J Thromb Haemost.* 2011; 9: 2371-2378.
- Otocka-Kmiecik A, Mikhailidis DP, Nicholls SJ, et al. Dysfunctional HDL: a novel important diagnostic and therapeutic target in cardiovascular disease? *Prog Lipid Res.* 2012; 51: 314-324.
- Podrez EA. Anti-oxidant properties of high-density lipoprotein and atherosclerosis. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2010; 37: 719-725.
- Johnston LD, Brown G, Gauthier D, et al. Apolipoprotein A-I from striped bass (*Morone saxatilis*) demonstrates antibacterial activity in

- vitro. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 2008; 151: 167-175.
13. Drazic A, Winter J. The physiological role of reversible methionine oxidation. *Biochim Biophys Acta.* 2014; 1844: 1367-1382.
  14. Norata GD, Pirillo A, Catapano AL. Modified HDL: biological and physiopathological consequences. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2006;16:371-386.
  15. Manzato E, Romanato G, Zambon S, et al. Metabolic syndrome and cardiovascular disease in the elderly: the Progetto Veneto Anziani (Pro.V.A.) Study. *Aging Clin Exp Res.* 2008; 20: 47-52.
  16. Zambon S, Manzato E, Solini A, et al. Lipoprotein abnormalities in non-insulin-dependent diabetic patients with impaired extrahepatic insulin sensitivity, hypertension, and microalbuminuria. *Arterioscler Thromb Vas.* 1994; 14: 911-916.
  17. Nosadini R, Manzato E, Solini A, et al. Peripheral, rather than hepatic, insulin resistance and atherogenic lipoprotein phenotype predict cardiovascular complications in NIDDM. *Eur J Clin Invest.* 1994; 24: 258-266.
  18. Manzato E, Zambon A, Lapolla A, et al. Lipoprotein abnormalities in well treated type II diabetic patients. *Diabetes Care.* 1993; 16: 469-475.
  19. Manzato E, Zambon S, Zambon A, et al. Levels and physico-chemical properties of lipoprotein subclasses in moderate hypertriglyceridemia. *Clin Chim Acta.* 1993; 219: 57-65.
  20. Vaisar T, Mayer P, Nilsson E, et al. HDL in humans with cardiovascular disease exhibits a proteomic signature. *Clin Chim Acta.* 2010; 411: 972-979.
  21. Birner-Gruenberger R, Schittmayer M, Holzer M, et al. Understanding high-density lipoprotein function in disease: Recent advances in proteomics unravel the complexity of its composition and biology. *Prog Lipid Res.* 2014; 56: 36-46.
  22. Besler C, Heinrich K, Rohrer L, et al. Mechanisms underlying adverse effects of HDL on eNOS-activating pathways in patients with coronary artery disease. *J Clin Invest.* 2011; 121: 2693-2708.
  23. Shao B, Oda MN, Oram JF, et al. Myeloperoxidase: an inflammatory enzyme for generating dysfunctional high density lipoprotein. *Curr Opin Cardiol.* 2006; 21: 322-328.
  24. Panzenböck U, Stocker R. Formation of methionine sulfoxide-containing specific forms of oxidized high-density lipoproteins. *Biochim Biophys Acta.* 2005; 1703: 171-181.
  25. Anantharamaiah GM, Hughes TA, Iqbal M, et al. Effect of oxidation on the properties of apolipoproteins A-I and A-II. *J Lipid Res.* 1988; 29: 309-318.
  26. von Eckardstein A, Walter M, Holz H, et al. Site-specific methionine sulfoxide formation is the structural basis of chromatographic heterogeneity of apolipoproteins A-I, C-II, and C-III. *J Lipid Res.* 1991; 32: 1465-1476.
  27. Bergt C, Oettl K, Keller W, et al. Reagent or myeloperoxidase-generated hypochlorite affects discrete regions in lipid-free and lipid-associated human apolipoprotein A-I. *Biochem J.* 2000; 346: 345-354.
  28. Pennathur S, Bergt C, Shao B, et al. Human atherosclerotic intima and blood of patients with established coronary artery disease contain high density lipoprotein damaged by reactive nitrogen species. *J. Biol. Chem.* 2004; 279: 42977-42983.
  29. Shao B, Oda MN, Oram JF, et al. Myeloperoxidase: an oxidative pathway for generating dysfunctional high-density lipoprotein. *Chem Res Toxicol.* 2010; 23: 447-454.
  30. Jensen MK, Rimm EB, Furtado JD, et al. Apolipoprotein C-III as a potential modulator of the association between HDL-cholesterol and incident coronary heart disease. *J Am Heart Assoc.* 2012; 1-10.
  31. Hewing B, Parathath S, Barrett T, et al. Effects of native and myeloperoxidase-modified apolipoprotein A-I on reverse cholesterol transport and atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014; 34: 779-789.
  32. Shao B, Tang C, Sinha A, et al. Humans with atherosclerosis have impaired ABCA1 cholesterol efflux and enhanced high-density lipoprotein oxidation by myeloperoxidase. *Circ Res.* 2014; 114: 1733-1742.
  33. Fisher EA, Feig JE, Hewing B, et al. High-density lipoprotein function, dysfunction, and reverse cholesterol transport. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012; 2: 2813-2820.
  34. Daugherty AJ, Dunn JL, Rateri DL, et al. Myeloperoxidase, a catalyst for lipoprotein oxidation, is expressed in human atherosclerotic lesions. *J Clin Invest.* 1994 ;94: 437-444.
  35. Brock JW, Jenkins AJ, Lyons TJ, et al. Increased methionine sulfoxide content of apoA-I in type 1 diabetes. *J Lipid Res.* 2008; 49: 847-855.
  36. Huang Y, DiDonato JA, Levison BS, et al. An abundant dysfunctional apolipoprotein A1 in human atheroma. *Nat Med.* 2014; 20: 193-203.
  37. Dodani S, Grice DG, Joshi S. Is HDL function as important as HDL quantity in the coronary artery disease risk assessment? *J Clin Lipidol.* 2009; 3: 70-77.
  38. Kontush A, Chapman MJ. Why is HDL func-

- tionally deficient in type 2 diabetes? *Curr Diab Rep.* 2008; 8: 51-59.
39. DiDonato JA, Aulak K, Huang Y, et al. Site-specific nitration of apolipoprotein A-I at tyrosine 166 is both abundant within human atherosclerotic plaque and dysfunctional. *J Biol Chem.* 2014; 289: 10276-10292.
  40. Namiri-Kalantari R, Gao F, Chattopadhyay A, et al. The dual nature of HDL: Anti-Inflammatory and pro-Inflammatory. *Biofactors.* 2015; 41: 153-159.
  41. Valentin Gogonea V. Structural Insights into High Density Lipoprotein: Old Models and New Facts. *Front Pharmacol.* 2016; 6: 318.
  42. Lapolla A, Manzato E, Sartore G, et al. Evaluation of methionine sulphoxide content of ApoA-I in type 2 diabetic patients and young coronaropathic subjects: a preliminary study. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2011; 25: 391-394.
  43. Seraglia R, Sartore G, Marin R, et al. An effective and rapid determination by MALDI/TOF/TOF of methionine sulphoxide content of ApoA-I in type 2 diabetic patients. *J Mass Spectrom.* 2013; 48: 105-110.
  44. Dreisewerd K. The desorption process in MALDI. *Chem Rev.* 2003; 103: 395-425.
  45. Sartore G, Seraglia R, Burlina S, et al. High-density lipoprotein oxidation in type 2 diabetic patients and young patients with premature myocardial infarction. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2015; 25: 418-425.