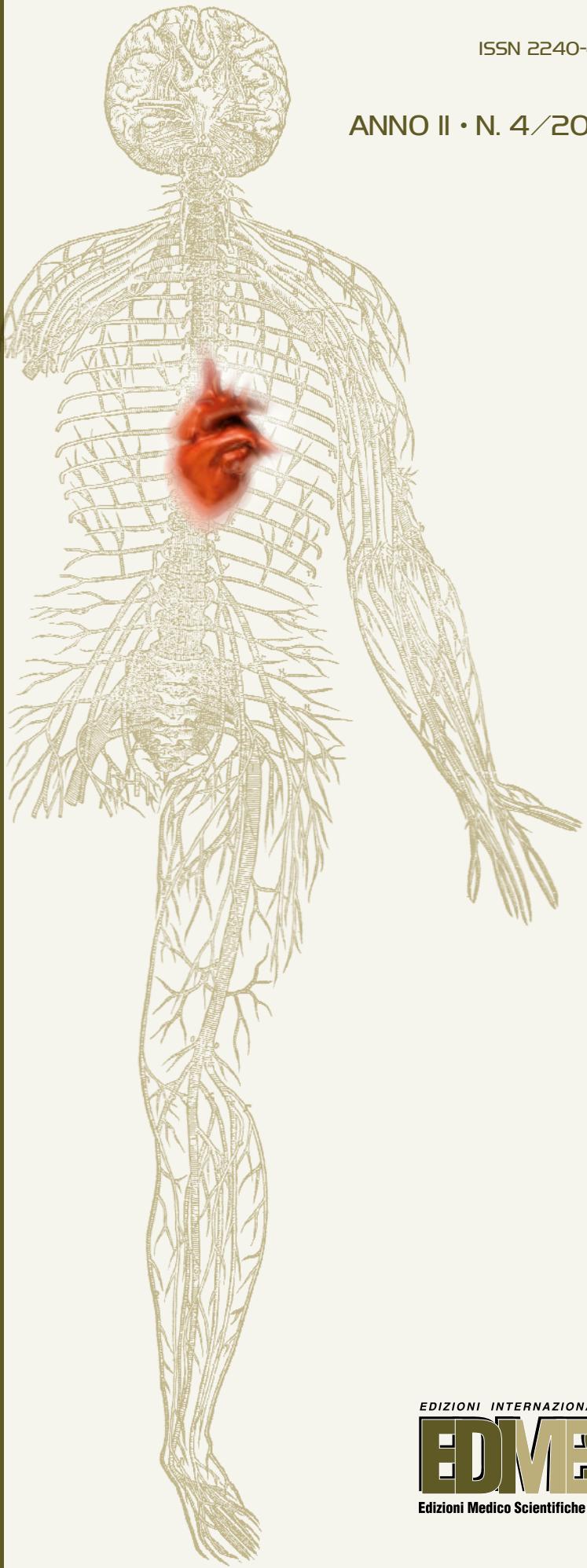


GIORNALE ITALIANO dell'ARTERIOSCLEROSI

ISSN 2240-4821

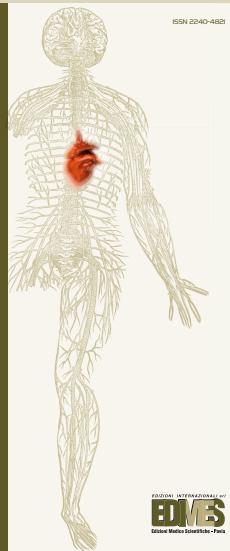
ANNO II • N. 4/2020



EDIZIONI INTERNAZIONALI srl

EDMES

Edizioni Medico Scientifiche - Pavia



Rivista ufficiale della Società Italiana
per lo Studio dell'Aterosclerosi (SISA)

Direttori emeriti

M. Averna
G. Crepaldi
R. Fellin
E. Mannarino
E. Manzato
A. Mezzetti
G.F. Salviovi
A. Ventura

Direttore scientifico

M. Arca (Roma)

Editore
L. Cattin (Trieste)

Vice Editore
F. Angelico (Roma)

Responsabili di area

Review e Linee Guida – D. Sommariva (Milano)
Ricerca e Farmacologia – G.D. Norata (Milano)
Studi Clinici – M. Pirro (Perugia)
Epidemiologia – S. Panico (Napoli)

Comitato di Redazione

A. Baragetti (Milano)
C.M. Barbaggio (Palermo)
A. Belfiore (Bari)
F. Bonacina (Milano)
M. Casula (Milano)
M. Del Ben (Roma)
O. Guardamagna (Torino)
M.R. Mannarino (Perugia)
T. Montalcini (Catanzaro)
L. Pisciotta (Genova)
A. Poli (Milano)
T. Sampietro (Pisa)
R. Sarzani (Ancona)
G.B. Vigna (Ferrara)
A. Zambon (Padova)

Segreteria editoriale

V. Flores d'Arcais
E. Loggia
R. Zecca
Via Balzaretti, 7 - 20133 Milano
E-mail: giornalearteriosclerosis@sisa.it

In copertina: De Humani Corporis Fabrica
di Andreas Vesalius (Basilea, 1543)

Anno 11 • N. 4 • 2020

SOMMARIO

LAVORO ORIGINALE

- Effetto dei polifenoli sul rischio cardiovascolare
e le performance neurocognitive** 5
**Effect of polyphenols on cardiovascular risk and neurocognitive
performance**
*Francesco Potì, Marcella Palumbo, Daniele Santi, Giorgia Spaggiari,
Ilaria Zanotti, Francesca Zimetti*

MECCANISMI DI MALATTIA

- Interazioni tra PCSK9 ed emostasi** 27
Interactions between PCSK9 and hemostasis
Francesco Paciullo, Stefania Momi, Paolo Gresele

FATTORI DI PROTEZIONE

- Iperalipoproteinemia e oltre: le HDL sono protettive?** 36
Hyperalphalipoproteinemia and beyond: are HDLs protective?
*Antonina Giammanco, Angelo Baldassare Cefalù,
Davide Noto, Maurizio Averna*

FATTORI DI RISCHIO

- Il valore clinico della misurazione della circonferenza vita
come marker di rischio di malattia cardiovascolare** 54
**The clinical value of waist circumference measurement
as a cardiovascular disease risk marker**
Paolo Magni

MÉDICINA, SCIENZA E SOCIETÀ

- COVID e cuore: le molte facce del problema** 67
COVID and heart: the many sides of the problem
Gianfranco Sinagra, Vincenzo Nuzzi, Matteo Dal Ferro, Marco Merlo

NOTIZIE DA CONGRESSI INTERNAZIONALI

- European Atherosclerosis Society 2020** 72
Manuela Casula

**Riassunto delle comunicazioni presentate
al 34° Congresso Nazionale S.I.S.A.** 77

Indice degli Autori 126

EDIZIONI INTERNAZIONALI srl

EDIMES
Edizioni Medico Scientifiche - Pavia

Edizioni Internazionali srl

Divisione EDIMES
EDIZIONI MEDICO SCIENTIFICHE - PAVIA
Via Riviera 39 - 27100 Pavia
Tel. 0382526253 r.a. - Fax 0382423120
E-mail: edint.edimes@tin.it

GIORNALE ITALIANO dell'ARTERIOSCLEROSI



BIMES

Consiglio Direttivo SISA

Marcello Arca - Presidente
Carlo M. Barbagallo
Anna Belfiore
Marco Bucci
Giulia Chiesa
Giuliana Fortunato
Luigi Gentile
Patrizia Tarugi
Maria Grazia Zenti
Enzo Manzato - Past President
Matteo Pirro - Segretario

Presidenti Sezioni Regionali SISA

Francesco Cipollone (Adriatica)
Piero Portincasa (Appulo-Lucana)
Arcangelo Iannuzzi (Campania)
Angelina Passaro (Emilia-Romagna)
Maria Del Ben (Lazio)
Alberico L. Catapano (Lombardia)
Luigi Gentile (Piemonte-Liguria-
Valle d'Aosta)
Antonio Baule (Sardegna)
Tiziana Montalcini (Sicilio-Calabria)
Tiziana Sampietro (Toscana)
Nadia Citroni (Triveneto)
Giacomo Pucci (Umbria)

Società Italiana per lo Studio dell'Aterosclerosi

Viale Maresciallo Pilsudski, 118
00197 Roma

Autorizzazione Trib. di Milano n. 242
del 21/09/2016

Direttore Responsabile: P. E. Zoncada

Norme editoriali

Pubblicità/Abbonamenti

Redazione GIA
Via Balzaretti, 7
20133 Milano
Tel. 0249636373
Fax 0249633384
E-mail: giornalearteriosclerosi@sisa.it

Condizioni di abbonamento

Canone per l'Italia € 65,00, per l'estero € 75,00.

Periodicità

Trimestrale

Scopi

Il "Giornale Italiano dell'Arteriosclerosis" (GIA), è un periodico di aggiornamento che nasce come servizio per i medici, operatori sanitari e studenti di medicina e delle professioni sanitarie, con l'intenzione di rendere più facilmente disponibili informazioni e revisioni critiche nel campo dell'arteriosclerosi e delle malattie ad essa correlate. Lo scopo della rivista è quello di assistere il lettore fornendogli:

- a) revisioni critiche di argomenti di grande rilevanza nel campo dell'arteriosclerosi sia per quanto riguarda gli aspetti di base che gli aspetti clinico-applicativi;
- b) quesiti relativi agli argomenti trattati per una verifica di auto apprendimento;
- c) opinioni di esperti qualificati sui nuovi sviluppi delle conoscenze sull'arteriosclerosi;
- d) lavori originali relativi ad aspetti di ricerca sanitaria nell'ambito dell'arteriosclerosi e delle malattie ad essa correlate.

TIPOLOGIA E STRUTTURA DEGLI ARTICOLI

GIA accetta le seguenti categorie di contributi: lavori originali, rassegne, casi clinici e forum dei lettori. Titolo e, se previsti, parole chiave e sommario dovranno essere sia in italiano che in inglese.

Le tabelle dovranno pervenire in formato editabile (word, excel, txt, ecc...).

Le figure dovreanno essere inviate oltre al formato originario anche in formato grafico (pdf, jpg, png, ecc...).

Lavori originali

I lavori originali saranno sottoposti a processo di "peer review". La lunghezza del testo non deve superare le 4.000 parole (esclusa la bibliogra-

fia) ma incluso l'abstract, con un massimo di 4 figure o tabelle.

Il frontespizio dovrà contenere:

- 1) Titolo
- 2) Autori e loro affilazione
- 3) Nome e affilazione dell'autore corrispondente.

- **Sommario:** dovrà essere strutturato (premesse, obiettivi, metodi, risultati, conclusioni) e non dovrà superare le 250 parole.

- **Parole chiave:** Si raccomanda di indicare 4-6 parole chiave.

- **Testo:** Il corpo del testo dovrà comprendere: a) Introduzione b) Materiali e metodi c) Risultati d) Discussione e) Tavole f) Figure g) Bibliografia.

Bibliografia

Citazione di articoli su riviste: Es. 1: Austin MA, Hutter CM, Zimmern RL, Humphries SE. Familial hypercholesterolemia and coronary heart disease. Am J Epidemiol 160: 421-429, 2004. Es. 2: Humphries SE, Whittall RA, Hubbard CS et al. Genetic causes of familial hypercholesterolemia in patients in the UK: a relation to plasma lipid levels and coronary heart disease risk. J Med Genet 43: 943-949, 2006
Citazioni di capitoli di libri Assmann G, von Eckardstein A, Brewer H. Familial analphalipoproteinemia: Tangier disease. In "The metabolic and molecular bases of inherited disease", Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds, 8th ed. New York, McGraw-Hill, 2001; 2937-60.

Rassegne

Il frontespizio dovrà contenere:

- 1) Titolo;
- 2) Autori e loro affilazione;
- 3) Nome e affilazione dell'autore corrispondente.

La lunghezza del testo non deve superare di norma le 5.000 parole, incluso, sommario, glossario, e l'elenco puntato degli argomenti affrontati (bullet points). Il numero massimo di figure e tabelle è 5. Il numero massimo di voci bibliografiche è 50. Le rassegne devono includere in appendice un questionario di autoapprendimento relativo all'argomento affrontato nella rassegna.

- **Sommario:** non dovrà superare le 250 parole.

- **Parole chiave:** Si raccomanda di indicare 4-6 parole chiave.

- **Testo:** L'autore è invitato a suddividere la rassegna in capitoli e sotto-capitoli.

Al termine del testo è opportuno inserire un capitolo dedicato alle prospettive future con particolare riferimento agli aspetti clinico-applicativi.

Glossario: È uno strumento di comunicazione fortemente raccomandato.

Esso dovrebbe contenere una concisa ma esauriente spiegazione dei termini "nuovi o meno comuni" utilizzati nella rassegna. Qualora l'autore lo ritenga utile, al glossario può essere allegata una o più "finestre esplicative" dedicate ad argomenti a cui si fa riferimento nella rassegna e che non sono discussi in sufficiente dettaglio nel corpo del testo.

Elenco degli argomenti trattati: A conclusione della rassegna l'autore è invitato a fornire un conciso elenco puntato degli aspetti più rilevanti affrontati.

Bibliografia: Le citazioni bibliografiche dovranno essere numerate secondo l'ordine di comparsa nel testo. Le pubblicazioni citate dovranno contenere il nome di tutti gli autori (fino a un massimo di 4). Nel caso gli autori fossero più di quattro, si mette dopo il terzo autore la scritta et al.

Questionario di auto-apprendimento: Per ogni rassegna il questionario dovrà contenere 5-10 domande con risposta a scelta multipla.

Casi clinici

Si riferisce alla presentazione di un caso clinico, preparato su richiesta da medici esperti, che ha lo scopo di rafforzare standard di comportamento clinico, diagnostico e/o terapeutico, basati sulle evidenze.

Forum su Medicina, Scienza e Società

Si tratta di articoli brevi o lettere all'editore (1.500 parole) sollecitati ad esperti, riguardanti commenti e/o opinioni su temi di particolare attualità. Il testo non dovrà superare le 1.500 parole. Non è richiesto un sommario. Le voci bibliografiche non devono superare il numero di 10 e devono essere riportate come indicate per le rassegne.

NOTE PER GLI AUTORI

Il testo dell'articolo deve essere predisposto utilizzando il programma Microsoft Word per Windows o Macintosh. I dischetti devono riportare sull'apposita etichetta il nome del primo autore, il titolo abbreviato dell'articolo, il programma di scrittura e la versione, ed il nome del contenuto/file.

L'autore è tenuto ad ottenere l'autorizzazione di "Copyright" qualora riproduca nel testo tabelle, figure, microfotografie od altro materiale iconografico, già pubblicato altrove. Tale materiale illustrativo dovrà essere riprodotto con la dicitura "per concessione di..." seguito dalla citazione della fonte di provenienza.

PRESENTAZIONE DEL NUMERO

■ Lavoro Originale

Effetto dei Polifenoli sul rischio cardiovascolare e performance neurocognitive.

Meta-analisi sugli effetti cardio e neuro protettivi dei polifenoli, includendo studi clinici rando-mizzati controllati su soggetti che hanno assunto integratori a base di polifenoli.

■ Meccanismi di malattia

Interazioni tra PCSK9 ed emostasi.

Vengono esaminate le interazioni tra PCSK9 e sistema emostatico e i potenziali effetti anti-trombotici della sua inibizione.

■ Fattori di protezione

Iperalfalipoproteinemia e oltre: le HDL sono protettive?

La rassegna descrive le forme primitive e secondarie di iperalfalipoproteinemia e valuta il ruolo del colesterolo-HDL nelle malattie cardiovascolari e le possibili prospettive di terapia.

■ Fattori di rischio

Circonferenza vita come marker di rischio cardiovascolare.

La misurazione della circonferenza vita dovrebbe essere inserita nella regolare pratica clinica perché fornisce, rispetto al BMI, una migliore stima dell'adiposità viscerale, delle alterazioni metaboliche, ormonali e infiammatorie ad essa correlata e del rischio cardiovascolare.

■ Medicina, Scienza e Società

COVID e Cuore: le molte facce del problema.

L'attenzione rivolta alla compromissione respiratoria porta sovente a trascurare i legami tra SARS-Co V-2 e apparato cardiovascolare.

■ Notizie da Congressi Internazionali

Notizie dal congresso dell'European Atherosclerosis Society 2020.

■ RIASSUNTO DELLE COMUNICAZIONI PRESENTATE AL 34° CONGRESSO NAZIONALE S.I.S.A.

LAVORO ORIGINALE

EFFETTO DEI POLIFENOLI SUL RISCHIO CARDIOVASCOLARE E LE PERFORMANCE NEUROCOGNITIVE

Effect of polyphenols on cardiovascular risk and neurocognitive performance

FRANCESCO POTÌ¹, MARCELLA PALUMBO², DANIELE SANTI^{3,4}, GIORGIA SPAGGIARI⁴, ILARIA ZANOTTI², FRANCESCA ZIMETTI²

¹Dipartimento di Medicina e Chirurgia, Unità di Neuroscienze, Università di Parma;

²Dipartimento di Scienze degli Alimenti e del Farmaco, Università di Parma;

³Dipartimento di Scienze Biomediche, Metaboliche e Neuroscienze, Unità di Endocrinologia, Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia, Modena;

⁴Dipartimento di Medicine Specialistiche, Unità di Endocrinologia, Azienda Ospedaliero-Universitaria di Modena, Ospedale Civile di Baggiovara, Modena

SUMMARY

Several studies have shown how a diet rich in polyphenols can have beneficial effects on the development of degenerative diseases, such as atherosclerosis and diseases affecting the central nervous system. This beneficial activity of polyphenols has been associated not only with their antioxidant and anti-inflammatory properties, but also with additional mechanisms such as the ability to modulate lipid metabolism and the functionality of the intestinal microbiota. However, long-term human studies have produced controversial results, making the prediction of the impact of polyphenols on health uncertain. The purpose of this review is to provide an overview and critical analysis of the literature relating to the effects of the main dietary polyphenols on cardiovascular and neurodegenerative diseases. The meta-analysis we conducted, including randomized controlled clinical trials on subjects who had taken polyphenol supplements, revealed that although some polyphenols may have a positive impact on certain specific markers of cardiovascular risk and cognitive status, in the literature there is a lot of inconsistent data. Therefore, precise indications regarding the use of these substances for the prevention of cardiovascular diseases and cognitive decline are not currently available. Once some fundamental aspects such as the bioavailability of polyphenols and the characterization of the pharmacokinetics and safety of the formulations containing them have been clarified, it will be possible to have a clearer picture of the real potential of polyphenols for disease prevention.

Key words: Polyphenols; prevention; cardiovascular disease; neurodegenerative disease; meta-analysis.

Indirizzo per la corrispondenza

Ilaria Zanotti
Università di Parma
E-mail: ilaria.zanotti@unipr.it

I. Introduzione

Negli ultimi anni è aumentato esponenzialmente l'interesse per gli effetti che i polifenoli hanno sulla salute umana. Sin dagli anni '80, sono stati pubblicati su PubMed più di 80.000 studi che riportano molteplici effetti dei polifenoli su un'ampia gamma di patologie (1). Tuttavia la maggior parte dei dati deriva da studi *in vitro* o *in vivo* (2), mentre gli studi clinici che valutano i benefici a lungo termine dei polifenoli sono scarsi. Inoltre, finora non sono stati ancora condotti studi con *endpoint* ben definiti (3). Una delle principali limitazioni degli studi attualmente pubblicati è rappresentata dall'inaccuratezza della scelta delle concentrazioni dei polifenoli testati. Infatti, spesso sono analizzate quantità molto più elevate di questi composti rispetto a quelle che si possono trovare negli alimenti. In più, la mancanza di informazioni sulla farmacocinetica, riguardanti in particolare l'assorbimento ed il metabolismo, può portare alla valutazione dell'attività di composti diversi da quelli effettivamente biodisponibili. I polifenoli si caratterizzano infatti per una biodisponibilità molto bassa, legata al fatto che sono presenti negli alimenti come composti glicosidati, con uno scarso assorbimento a livello intestinale. Una volta nel colon, l'idrolisi enzimatica dei glicosidi promossa dal microbiota intestinale libera l'aglicone, che a sua volta subisce l'assorbimento o va incontro ad ulteriore metabolismo (4). Tuttavia, la maggior parte degli studi che indagano il meccanismo d'azione dei polifenoli è condotta *in vitro* utilizzando i composti presenti negli alimenti e non i metaboliti che effettivamente raggiungono la cellula *target*. Di conseguenza, i numerosi dati risultanti da questo genere di studi hanno una scarsa rilevanza fisiologica.

Da numerosi lavori emerge l'azione benefica che i polifenoli rivestono nella prevenzione di svariati disturbi tra cui il cancro, la sindrome metabolica, il diabete e la steatosi epatica non alcolica. In questo lavoro di revisione e meta-analisi è stata analizzata in modo critico la letteratura riguardante lo studio nell'uomo dell'attività dei polifenoli sulle patologie cardiovascolari e neurodegenerative, la cui elevata incidenza a livello mondiale rappresenta una causa crescente di mortalità, morbilità e disabilità. In particolare, abbiamo selezionato studi effettuati su soggetti che assumevano a scopo preventivo integratori alimentari contenenti polifenoli, escludendo invece gli studi in cui tali composti venivano assunti soltanto attraverso la dieta. Questa strategia metodologica ci ha permesso di valutare più accuratamente le attività biologiche dei polifenoli, evitando le attività biologiche di altri composti alimentari bioattivi e delle matrici alimentari. I lettori interessati ad una ampia ed esauriente trattazione dell'impatto dei polifenoli dietetici sulla salute cardiovascolare sono invitati alla consultazione delle review di Visioli e Tomé-Carneiro (2, 3).

2. Effetto dei polifenoli sul rischio cardiovascolare

2.1 Studi sull'uomo

Com'è noto, le malattie cardiovascolari rappresentano la principale causa di morbilità e mortalità a livello mondiale, essendo responsabili del 32% della mortalità totale e del 44% di quella imputabile a malattie non trasmissibili. L'85% degli eventi fatali legati a malattie cardiovascolari è dovuto a ictus e ad infarto (5). Negli ultimi 20 anni, grazie all'implementazione di diverse misure preventive volte alla riduzione dei fattori di rischio come dieta sbilanciata, consumo eccessivo di alcol, inattività

fisica, fumo di sigaretta, il rischio di morte dovuta a malattie cardiovascolari o ad altre malattie non trasmissibili ha mostrato un lieve ma costante decremento (6). La terapia farmacologica ha inoltre fornito un importante contributo al miglioramento dell'aspettativa e della qualità della vita sia in prevenzione primaria, che secondaria, seppure la comparsa di effetti collaterali e la limitata aderenza ai trattamenti abbiano talvolta ridotto l'efficacia di questi interventi. Un ulteriore approccio per ridurre il rischio cardiovascolare prevede l'impiego di integratori alimentari/nutraceutici e alimenti funzionali, strategia che sta suscitando un discreto interesse, nonostante l'efficacia di questi prodotti non sempre sia avvalorata da studi clinici condotti con metodi rigorosi (7, 8). L'analisi quantitativa e sistematica dei dati derivanti dagli studi che abbiamo selezionato è descritta nella sezione di meta-analisi, mentre qui di seguito discuteremo l'effetto dei polifenoli su diversi *endpoint* cardiovascolari valutati in studi pubblicati negli ultimi sei anni.

Un limite all'analisi critica degli studi sui polifenoli è legato alla grande eterogeneità dei disegni sperimentali, della popolazione in studio, dei composti impiegati e degli *endpoint* valutati, oltre che alla scarsità di dati sull'attività biologica dei diversi metaboliti, fattori che rendono complesso il confronto tra gli studi e impediscono il raggiungimento di conclusioni univoci.

Un piccolo *trial* clinico randomizzato, controllato verso placebo, in doppio cieco, ha valutato l'effetto di 200 mg/die di proantocianidine oligomeriche, derivanti da un estratto di uva rossa, somministrate per 8 settimane a 70 soggetti moderatamente ipercolesterolemici. Gli autori hanno osservato una significativa riduzione dei livelli plasmatici di colesterolo totale ($-14,8 \text{ mg/dL} \pm 19,7$ vs livello basale, $p=0,001$), trigliceridi ($-19,4 \text{ mg/dL} \pm 42,4$ vs livello

basale, $p=0,001$) e LDL-C ($-13,1 \text{ mg/dL} \pm 20,6$ vs livello basale, $p=0,002$). Nello stesso studio diverse componenti anti-aterogene del plasma risultavano aumentate dal trattamento: apolipoproteina A-I ($9,3 \text{ mg/dL} \pm 11,7$ vs livello basale, $p=0,001$), paraossonasi-1 ($4,5 \text{ IU/L} \pm 7,7$ vs livello basale, $p=0,03$) e HDL-C ($2,1 \text{ mg/dL} \pm 3,7$ vs livello basale, differenza non statisticamente significativa) (9).

In un altro studio 70 soggetti sono stati randomizzati per ricevere 162 mg/die di quercetina derivante da estratto di buccia di cipolla o placebo in un *trial a crossover*, in doppio cieco, controllato verso placebo, per un periodo di trattamento di 6 settimane, intervallato da sei settimane di *washout* (10). Questo studio è di particolare interesse perché in ciascun partecipante sono state misurate le concentrazioni plasmatiche di quercetina, dei suoi derivati monometilati tamrixetina, ($4'$ -O-metil quercetina) ed isoramnetina ($3'$ -O-metil quercetina), e del metabolita deidrossilato kaempferolo. Nel sottogruppo dei soggetti ipertesi, la quercetina ha ridotto significativamente la pressione sistolica (SBP) di 3,6 mmHg ($p=0,022$) rispetto al placebo. Tuttavia, i marcatori infiammatori, tra cui l'endotelina-1, sICAM-1, sVCAM-1, la dimetilarginina asimmetrica, la funzione endoteliale, i marcatori di ossidazione non sono stati influenzati dalla quercetina né in tutti i partecipanti, né nel sottogruppo degli ipertesi. Nella stessa coorte di soggetti, non sono state rilevate variazioni significative nelle concentrazioni sieriche di leptina, adiponectina, nell'HOMA-AD, glucosio, insulina, HOMA-IR, marcatori plasmatici di funzionalità epatica e renale, nei marcatori di infiammazione hs-CRP e TNF- α (11). Uno studio controllato verso placebo, randomizzato, in doppio cieco, che ha coinvolto 72 partecipanti sani, sovrappeso o obesi, trattati con 100 mg/die di quercetina per

12 settimane non ha evidenziato differenze significative nella pressione sanguigna tra i due bracci di trattamento rispetto ai valori basali. Tuttavia il trattamento è stato efficace nel migliorare la funzione endoteliale valutata come dilatazione flusso-mediata (FMD%; da $12,5 \pm 5,2\%$ a $15,2 \pm 6,1\%$; $p=0,002$), e nella conta delle cellule progenitrici endoteliali, valutata tramite citometria di flusso ($44,2 \pm 25,6\%$ vs $52,3 \pm 18,6\%$; $p=0,005$), rispetto ai valori basali (12).

Un altro studio randomizzato, controllato verso placebo, in doppio cieco, con un disegno a *crossover*, ha valutato l'effetto di (-)-epicatechina (100 mg/die) e quercentina-3-glucoside (160 mg/die) su marcatori di funzione endoteliale e d'infiammazione (13) o sulla funzionalità vascolare e la salute cardiometabolica, in una coorte di 37 soggetti sani, in una condizione di pre-ipertensione (SBP = 125-160 mmHg), di età compresa tra i 40 e gli 80 anni. La prima analisi ha mostrato una riduzione dei livelli plasmatici dei marcatori dell'infiammazione vascolare, come le selectine o l'interleuchina-1 beta. Tuttavia nella maggior parte dei casi le differenze non erano statisticamente significative. Nella seconda analisi la supplementazione di epicatechina ha invece migliorato l'insulina plasmatica a digiuno e l'HOMA-IR senza influenzare la pressione arteriosa, la rigidità arteriosa, l'NO, l'endotelina-1 o il profilo lipidico plasmatico. La supplementazione di quercentina-3-glucoside non ha avuto effetto su FMD, insulino resistenza o altri fattori di rischio per malattia cardiovascolare (14). Nonostante l'aderenza alla terapia e l'assorbimento dei polifenoli siano stati monitorati durante le quattro settimane di trattamento misurando le concentrazioni plasmatiche ed urinarie di epicatechina e quercentina, non sono state condotte ulteriori analisi sui metaboliti. Tuttavia, studiare i flavonoidi assunti come tali invece che

quelli integrati nelle complesse matrici alimentari d'origine può suscitare qualche problema. Infatti da una parte questo approccio riduce l'entità di possibili fattori confondenti, dall'altro può escludere potenziali interazioni favorevoli con altri flavonoidi e composti naturalmente presenti nelle fonti originali.

2.2. Meccanismi di cardioprotezione

Il ruolo dello stress ossidativo come promotore di disfunzione endoteliale, a sua volta responsabile dell'insorgenza di aterosclerosi e dei conseguenti disordini cardiovascolari, è ormai ampiamente accettato. Questo concetto fornisce il razionale per la strategia anti-infiammatoria e anti-ossidante nel campo della cardioprotezione (15) e rende i polifenoli degli agenti promettenti nel campo della prevenzione. Le proprietà antiossidanti dei polifenoli dipendono dalla presenza nella loro struttura di gruppi ossidrili che possono essere facilmente ossidati, producendo i corrispondenti O-chinoni (16). Questa conversione risulta in un'efficace attività *scavenger* verso le specie reattive dell'ossigeno, che restano intrappolate entro complessi chimici stabili, senza possibilità di promuovere ulteriori reazioni radicaliche (17). La cosiddetta teoria degli *scavenger* biochimici è attualmente la più accreditata per spiegare gli effetti protettivi dei polifenoli nei confronti di un'ampia gamma di malattie non trasmissibili. Tuttavia, bisogna sottolineare che, nonostante l'attività antiossidante dei polifenoli sia stata largamente indagata, i risultati dei test *in vitro* non sempre si traducono in un aumento dello status antiossidante nell'uomo. Questa discrepanza potrebbe essere dovuta all'ampia variabilità dei test utilizzati *in vitro*, ma anche alla presenza di una significativa variabilità individuale (18).

Oltre all'inibizione dello stress ossidativo, i polifenoli mostrano anche un cosid-

detto effetto antiossidante indiretto, che si manifesta attraverso l'attivazione del fattore di trascrizione nucleare Nrf2. Questo evento induce l'attivazione di sistemi antiossidanti endogeni e sembra essere responsabile del mantenimento del corretto bilancio ossido-riduttivo cellulare, raggiunto attraverso l'equilibrio dell'attività degli enzimi di fase I e di fase II (19, 20). L'attività antinfiammatoria è dovuta a molteplici meccanismi, la maggior parte dei quali mediati dall'inibizione del fattore di trascrizione NF- κ B, da cui deriva la riduzione della produzione cellulare di mediatori dell'infiammazione (21-23), l'inibizione dell'espressione di molecole d'adesione (24), con conseguente alterazione della chemiotassi dei monociti nei tessuti infiammati. Altri meccanismi responsabili dell'attività cardioprotettiva dei polifenoli coinvolgono il metabolismo lipidico, la cui alterazione rappresenta un fattore causale nello sviluppo dell'aterosclerosi (25). A questo proposito, un esauriente trattato sulla capacità di alimenti ricchi di polifenoli di modulare positivamente il metabolismo lipidico e lipoproteico è stato pubblicato dal nostro gruppo di ricerca (26). La riduzione di LDL-C in seguito al consumo di polifenoli è ampiamente riportata in letteratura e sembra essere legata a meccanismi epatici ed intestinali. Nel primo caso, la riduzione della sintesi di colesterolo, l'aumento dell'espressione e dell'attività dei recettori per le LDL (27) e l'aumento dell'espressione dei trasportatori di colesterolo ATP-Binding Cassette G5/ATP-Binding Cassette G8 (28) sono stati dimostrati in modelli *in vivo*. Nel secondo caso, la capacità di polifenoli come l'epigallocatechina gallato di spiazzare il colesterolo dalle micelle intestinali è stato associato ad un aumento dell'eliminazione fecale del colesterolo *in vivo* (29). L'effetto dei polifenoli sui livelli plasmatici di trigli-

ceridi è legato alla riduzione della produzione di apolipoproteina B48 e di apolipoproteina B100 nel fegato e nell'intestino, come dimostrato in soggetti obesi (30), o all'interferenza con l'espressione epatica della lipoproteina lipasi, come evidenziato in modelli sperimentali di suini (31). I meccanismi responsabili dell'aumento di HDL-C sono limitati ad evidenze *in vitro*. Tra queste, è stato riportato un aumento della sintesi di apolipoproteina A-I in colture di epatociti o cellule intestinali esposte ai polifenoli del cacao (32).

I polifenoli possono inoltre migliorare la funzione endoteliale, la cui alterazione è un noto fattore di rischio per lo sviluppo di atherosclerosi. Questa attività è stata dimostrata nell'uomo, ma bisogna segnalare come la dose efficace per aumentare la FMD fosse significativamente più alta rispetto a quella derivante da una normale assunzione dietetica (33). Il meccanismo di questo effetto probabilmente risiede nell'aumento dell'attività della NO sintasi, come suggerito da studi *in vitro* (34) e nell'uomo (35). La vasodilatazione mediata da NO, insieme all'influenza sul sistema della renina-angiotensina (36), è responsabile di un'ulteriore attività cardioprotettiva dei polifenoli: la riduzione della pressione sanguigna. È interessante sottolineare come questo effetto sia evidente anche dopo il consumo di alimenti ricchi di polifenoli (37).

Infine, i benefici cardiovascolari dei polifenoli possono essere imputabili alle peculiari proprietà farmacocinetiche menzionate in precedenza. Mentre questi composti nella maggior parte dei casi raggiungano immodificati la parte distale del tratto gastrointestinale, una volta metabolizzati dal microbiota intestinale possono svolgere un'azione prebiotico-simile (38), favorendo la crescita selettiva di batteri benefici (39-41) e riducendo quella di cep-

pi dannosi (40-42). Questo effetto è stato dimostrato in studi di intervento ed in modelli *ex vivo* di fermentazione fecale, e può essere riconducibile al miglioramento dei marcatori di malattia cardiovascolare.

2.3. Meta-analisi

2.3.1. Metodi

La ricerca in letteratura è stata eseguita utilizzando i *databases* MEDLINE ed Embase, considerando tutti i manoscritti pubblicati in lingua inglese fino al 10 novembre 2018, ed utilizzando la seguente strategia di ricerca: ((*polyphenol*) OR *flavonoids*) OR *polyphenolic compounds*) OR *isoflavanone*) OR *flavanol*) OR *phytoestrogen*) OR *resveratrol*) AND *atherosclerosis*) OR *cardiovascular*) OR *cardiovascular disorder*) OR *cardiovascular health*. La ricerca è stata ripetuta aggiungendo le parole “*administration*” e “*therapy*”, utilizzando termini Mesh. Per la selezione degli studi sono stati adottati i seguenti criteri di inclusione:

- 1) disegno dello studio in doppio cieco, randomizzato e controllato;
- 2) pazienti adulti (di età superiore a 18 anni);
- 3) assunzione cronica di polifenoli;
- 4) assunzione di polifenoli come integratori alimentari o composti isolati.

Pertanto, entrambi i sessi sono stati considerati idonei, così come tutti i composti polifenolici e la via di somministrazione. Inoltre, sono stati inclusi solo periodi di trattamento superiori a 2 settimane. Durante l'estrazione dei dati, sono stati analizzati i seguenti *endpoint*: HDL-C, LDL-C, hs-CRP, FMD e pressione sanguigna.

La meta-analisi dei dati estratti dagli studi inclusi è stata condotta utilizzando il software Review Manager 5.2 (Versione 5.2.4 Copenhagen: The Nordic Cochrane Center, The Cochrane Collaboration, 2012). I dati sono stati combinati utilizzan-

do modelli a effetti casuali o fissi, in base all'eterogeneità dei dati. L'eterogeneità tra i risultati dei diversi studi è stata esaminata ispezionando la dispersione dei dati e la sovrapposizione nei loro intervalli di confidenza, ed eseguendo test del chi-quadrato e misure I^2 . Per I^2 superiore al 60%, è stato adottato un modello a effetti casuali, che fornisce una stima più conservativa dell'effetto complessivo, particolarmente utile nell'analizzare studi di diverso disegno e durata. Le differenze medie ponderate e gli intervalli di confidenza al 95% sono stati stimati per ciascun *endpoint* considerato. I valori di $p<0,05$ sono stati considerati statisticamente significativi.

2.3.2. Risultati

Inizialmente, la ricerca in letteratura ha restituito un totale di 2.370.680 studi. Restringendo la ricerca ai soli studi clinici sull'uomo, sono stati selezionati 123.773 studi, ulteriormente ridotti a 305 eliminando tutti quelli che non rientravano nei criteri d'inclusione. Tra questi, 43 studi sono stati valutati per estrarre dati cardiovascolari, mentre i restanti sono stati esclusi per varie ragioni (es., assenza di *outcome* cardiovascolare o di composti polifenolici nel trattamento). Infine, sono stati ulteriormente esclusi 9 studi per indisponibilità di dati sull'*outcome*, mentre 34 studi sono stati inclusi nella meta-analisi (*Tabella 1*).

16 studi hanno analizzato la pressione arteriosa sistolica (SBP), valutando un totale di 1.190 soggetti (606 trattati con polifenoli e 584 con placebo). L'analisi complessiva ha mostrato una significativa riduzione della pressione sistolica dopo la somministrazione di polifenoli (differenza media -1,01, IC 95%: -2,04; 0,02, $p=0,005$). Inoltre, gli stessi studi hanno mostrato una riduzione significativa anche della pressione arteriosa diastolica in seguito

Tabella I - Caratteristiche degli studi selezionati nella meta-analisi sugli effetti cardiovascolari dei polifenoli.

Autore	Anno	Sostanza o estratto	Endpoint cardiovascolari
Arazi H.	2014	Estratto di tè verde	Pressione sanguigna
Argani H.	2016	Estratto di semi di uva rossa	HDL-C, LDL-C, Apolipoproteina A-I, paraossonasi-1
Atteritano M.	2007	Genisteina	Profilo lipidico, ICAM-1, VCAM-1
Aubertin-Leheudre M.	2008	Isoflavoni	Profilo lipidico
Botden I.P.	2012	Polifenoli del vino rosso	Pressione sanguigna, Indice di augmentation aortica, Velocità dell'onda sfigmica
Brüll V.	2015	Quercetina	HDL-C, LDL-C, trigliceridi, ET-1, ICAM-1, VCAM-1, hs-CRP, pressione sanguigna
Chan Y.H.	2008	Isoflavoni	hs-CRP, superossido dismutasi, FMD, pressione sanguigna
Chiva-Blanch G.	2013	Polifenoli del vino rosso	HDL-C, LDL-C, Apolipoproteina A-I
Choi E.Y.	2015	Estratto di buccia di cipolla	FMD, Cellule endoteliali progenitrici
Colacurci N.	2005	Isoflavoni	ICAM1, VCAM1, E-selectina, FMD
Dower J.I.	2015	Epicatechina	Pressione sanguigna
Egert S.	2009	Quercetina	HDL-C, LDL-C, trigliceridi, TNF α
Gliemann L.	2013	Resveratolo	HDL-C, LDL-C, trigliceridi, ICAM-1, VCAM-1
Hale G.	2002	Isoflavoni	FMD
Hallund J.	2006	Isoflavoni	ET-1, FMD, pressione sanguigna
Hanson L.N.	2006	Isoflavoni	hs-CRP
Hassellund S.S.	2013	Antocianine	HDL-C, LDL-C, trigliceridi
Howes J.B.	2000	Isoflavoni di trifoglio rosso	HDL-C, LDL-C, trigliceridi
Howes J.B.	2003	Isoflavoni di trifoglio rosso	Pressione sanguigna
Jayagopal V.	2002	Isoflavoni	HDL-C, LDL-C, trigliceridi
Lockyer S.	2017	Estratto di foglia di oliva ricco di fenoli	HDL-C, LDL-C, trigliceridi, pressione sanguigna
Mainini G.	2013	Isoflavoni	HDL-C, LDL-C, Apolipoproteina A-I, trigliceridi
Nestel P.	2007	Trans-tetraidrodaidzeina	HDL-C, LDL-C, trigliceridi, pressione sanguigna
Nogueira L.P.	2017	Estratto di tè verde	HDL-C, LDL-C, trigliceridi, pressione sanguigna
Panahi Y.	2015	Combinazione curcuminoide-piperina	hs-CRP
Pipe E.A.	2009	Proteine isolate dalla soia	HDL-C, LDL-C, Apolipoproteina A-I, trigliceridi
Saarenhovi M.	2017	Polifenoli estratti dalla mela	FMD
Teede H.J.	2003	Biochanina	FMD, pressione sanguigna, rigidità arteriosa
Tomé-Carneiro J.	2013	Resveratolo	HDL-C, LDL-C, Apolipoproteina A-I, trigliceridi
Trautwein E.A.	2010	Flavonoidi del tè nero	HDL-C, LDL-C, trigliceridi
Valls R.M.	2016	Oligopin	HDL-C, LDL-C, trigliceridi, pressione sanguigna
Verhoeven M.O.	2007	Isoflavoni	HDL-C, LDL-C, trigliceridi, lipoproteine, hs-CRP
Weseler A.R.	2011	Flavanoli	HDL-C, LDL-C, trigliceridi, hs-CRP
Xie L.	2017	Polifenoli dei frutti di bosco	HDL-C, LDL-C, trigliceridi

ET-1: Endotelina-1; FMD: dilatazione flusso-mediata; HDL-C: colesterolo HDL; hs-CRP: proteina C-reattiva ad alta sensibilità; ICAM: molecola di adesione cellulare intercellulare; LDL-C: colesterolo LDL; TNF- α : fattore di necrosi tumorale alfa; VCAM: molecola di adesione vascolare.

alla somministrazione di polifenoli (differenza media -1,32 mmHg, IC 95%: -2,37, -0,27 mmHg; p=0,001).

La valutazione della colesterolemia (HDL-C e LDL-C) è stata riportata in 21 studi, per un totale di 1.933 soggetti (988 trattati con polifenoli e 945 con placebo). La somministrazione di polifenoli ha aumentato significativamente i livelli sierici di HDL-C (differenza media 2,68 mg/dL, IC 95%: 2,43, 2,92 mg/dL, p<0,001). Allo stesso modo, i livelli sierici di LDL-C erano significativamente ridotti dopo la somministrazione di polifenoli (differenza media -4,39 mg/dL, IC 95%: -7,66, -1,11 mg/dL, p=0,009).

Solo 8 studi hanno valutato la FMD, per un totale di 568 soggetti (289 trattati con polifenoli e 279 con placebo), nei quali la somministrazione di polifenoli ha indotto un aumento significativo di questo parametro di funzionalità endoteliale (differenza media 0,89%, IC 95%: 0,40, 1,38%, p<0,001).

In 9 studi è stata esaminata la hs-CRP, per un totale di 611 pazienti (303 trattati con polifenoli e 308 con placebo). La somministrazione di polifenoli non ha modificato i livelli plasmatici di hs-CRP (p<0,430).

2.3.3. Discussione

Nel tentativo di fornire una valutazione quantitativa dell'effetto dei polifenoli sulla salute cardiovascolare, abbiamo condotto una meta-analisi dei principali parametri misurati negli studi selezionati. Poiché la nostra analisi si è focalizzata specificamente sulla supplementazione di polifenoli, tutte le dosi impiegate sono state tendenzialmente più alte di quelle raggiungibili tramite una dieta comune. Questo aspetto è particolarmente rilevante per i flavonoli, come la quercetina (>100 mg/die) (10-13) e gli isoflavoni (da 80 a 132 mg/die, Mainini 2013 e Jayagopal 2002), mentre in

alcuni casi come per le proantocianidine oligomeriche (200 mg/die (9)), le dosi impiegate rientravano nei livelli raggiungibili con la dieta (43).

Sulla base dei criteri di inclusione ed esclusione, un numero soddisfacente di studi ha contribuito all'analisi: 17 per la pressione arteriosa, 21 per i lipidi plasmatici e 8 per la funzione endoteliale e 9 per l'infiammazione sistemica. Il numero di soggetti valutati è stato da 500 a 2.000, per ogni parametro considerato. Tuttavia è stata riscontrata un'ampia eterogeneità, legata anche alle differenze di trattamento in termini di formulazione, dose, fonte e tipo di polifenoli analizzati, discrepanze che hanno impedito la conduzione di analisi di sottogruppi. Tuttavia, l'analisi complessiva ha rivelato un effetto significativo dei polifenoli nel modulare positivamente i parametri cardiovascolari considerati. In particolare, i trattamenti hanno ridotto la pressione sistolica e, in maniera più accentuata, quella diastolica, così come i livelli plasmatici di LDL-C, e hanno incrementato HDL-C e FMD. La nostra meta-analisi non ha invece evidenziato effetti significativi su hs-CRP. Nonostante questi effetti siano significativi dal punto di vista statistico, le differenze evidenziate sono indubbiamente di modesta entità e talvolta di dubbio beneficio clinico. Per esempio, il valore assoluto di riduzione di LDL-C (differenza media -4,39 mg/dL) potrebbe essere d'interesse, poiché è stato dimostrato che esiste una reazione lineare tra l'abbassamento di LDL-C e la frequenza di eventi cardiovascolari maggiori (44). L'effetto sui livelli di HDL-C è invece più complesso da valutare, poiché è imputabile per circa il 95% ad un singolo studio (45) sui 21 considerati globalmente. Inoltre, secondo le più recenti evidenze derivanti sia da studi di randomizzazione mendeliana che da *trial* clinici, l'aumento

dei livelli di HDL-C in soggetti con un valore basale normale non rappresenta un approccio efficace per la riduzione del rischio cardiovascolare (46-48).

Il valore dei risultati della nostra meta-analisi è corroborato da una recente valutazione dell'appropriatezza degli *outcome* soggetti ad *health claims* per la salute cardiovascolare (49). Questo studio, in accordo con il Regolamento della Commissione Europea 1924/2006, ha fornito evidenze sulla solidità di parametri quali LDL-C e pressione sistolica per sostanziare gli *health claims* nel contesto delle malattie cardiovascolari, mentre HDL-C o trigliceridi non sono attualmente raccomandati.

3. Effetto dei polifenoli sulle funzioni cognitive

3.1 Polifenoli e funzioni cognitive nell'uomo

Grazie ai significativi progressi della medicina, negli ultimi anni si è verificato un notevole aumento della aspettativa di vita. Tuttavia, nonostante le indubbi conseguenze positive, il progressivo invecchiamento della popolazione ha determinato un aumento significativo dell'insorgenza di malattie associate all'età, tra cui le malattie neurodegenerative (50). La neurodegenerazione è una condizione comune condivisa da numerose malattie, tra le quali la sclerosi laterale amiotrofica, la malattia di Huntington, il morbo di Alzheimer (*Alzheimer's disease*, AD), la demenza frontotemporale ed il morbo di Parkinson (51).

L'eziologia di queste patologie è multifattoriale ed i meccanismi che sottendono alla malattia non sono ancora stati completamente chiariti. Tra i diversi fattori coinvolti si possono elencare per esempio l'infiammazione cronica e la neuroinfiammazione, la senescenza cellulare, l'insta-

bilità del genoma e la deregolazione della proteostasi (52, 53). Inoltre, anche fattori esogeni o l'esposizione a tossine possono concorrere ad aumentare il rischio di insorgenza di malattie neurodegenerative, determinando uno stato infiammatorio persistente e causando stress ossidativo (54, 55). Sebbene differenti in termini di manifestazioni cliniche, tutte queste malattie condividono caratteristiche e meccanismi comuni, tra cui è importante annoverare l'accumulo anomalo e l'aggregazione di peculiari proteine, diverse a seconda della malattia, che portano alla progressiva perdita di neuroni e sinapsi in specifiche regioni cerebrali (55, 56).

Da un punto di vista clinico, le malattie neurodegenerative sono caratterizzate da un progressivo deterioramento della funzione cognitiva e/o motoria. Il declino cognitivo è per esempio la condizione preclinica tipica dell'AD e della demenza frontotemporale (57). Nel caso dell'AD, che rappresenta la principale causa di demenza a livello mondiale (60-80%) (58), i primi sintomi sono rappresentati da una progressiva perdita di memoria, da un declino delle funzioni cognitive e da particolari manifestazioni comportamentali, che comprendono cambiamenti del tono dell'umore e insorgenza di depressione (59). In particolare, la forma prodromica di AD è caratterizzata da un lieve deterioramento cognitivo (*mild cognitive impairment*, MCI) e da alterazioni di alcuni specifici domini cognitivi tra cui la memoria, la funzione esecutiva, l'attenzione, le abilità visuo-spaziali ed il linguaggio (60, 61). Questi soggetti hanno un rischio del 50% di progressione dei disturbi neurocognitivi a cinque anni (62). Gli attuali trattamenti per arrestare il declino cognitivo si limitano a contrastarne i sintomi e sembrano avere un impatto positivo sulle performance e sul comportamento che si manifesta tutta-

via in modo transitorio, senza intervenire realmente sulle cause della patologia. Questo attuale scenario rende prioritario lo sviluppo di strategie alternative per prevenire o rallentare la neurodegenerazione. Tra questi approcci, il ruolo della dieta come strumento preventivo nei confronti del declino cognitivo è stato oggetto di intense ricerche negli ultimi anni.

Per esempio, numerosi studi clinici osservazionali e di intervento hanno suggerito l'esistenza di una associazione tra l'assunzione di alimenti ad elevato contenuto di polifenoli, come frutti di bosco, uva, cacao e tè verde, ed un miglioramento delle funzioni cognitive (63-66). Ciò nonostante, non tutti gli studi hanno dato risultati positivi in modo univoco, lasciando aperto il dibattito sul potenziale utilizzo dei polifenoli per il mantenimento della salute cognitiva. In primo luogo, una recente meta-analisi non ha riportato alcun beneficio significativo della dieta mediterranea, il cui apporto di polifenoli corrisponde a circa 1 g/die (43), sull'incidenza del deterioramento cognitivo (67). Inoltre, una revisione sistematica degli studi sull'attività degli isoflavoni della soia ha concluso che gli effetti neuroprotettivi potrebbero essere limitati perché influenzati da diversi fattori legati alle caratteristiche individuali, al tipo di trattamento e anche fattori correlati alla pianta stessa (68). Allo stesso modo, i risultati di una meta-analisi di 21 studi clinici hanno suggerito come il trattamento con un estratto di *Ginkgo biloba* di pazienti che presentavano MCI non abbia portato a risultati convincenti sull'*endpoint* cognitivo (69). Le ragioni per spiegare queste discrepanze si possono ritrovare nei problemi di biodisponibilità precedentemente menzionati, oltre che nella variabilità interindividuale riguardante la composizione e la funzione del microbiota intestinale, che fa sì che l'assunzione degli stessi po-

lifenoli si possa tradurre in effetti diversi, a seconda delle caratteristiche di ciascun individuo (70). In sintesi, la mancanza di risultati convincenti degli studi clinici e le critiche sopra citate rendono difficile trarre una conclusione solida sull'effetto preventivo dei polifenoli sulle funzioni cognitive e sulla neurodegenerazione.

Al fine di contribuire a chiarire l'efficacia dei polifenoli sui diversi aspetti del declino cognitivo, in questo lavoro, abbiamo eseguito una meta-analisi di studi condotti sull'uomo. Nel dettaglio, ci si è focalizzati su soggetti anziani sani o affetti da MCI, per considerare l'impatto dei polifenoli sulla salute cognitiva globale, nonché l'effetto su alcuni domini specifici, tra cui la memoria e le funzioni verbali ed esecutive.

3.2. Meccanismi di neuroprotezione

È probabile che siano molteplici i meccanismi che concorrono a spiegare l'effetto dei polifenoli sulla neurodegenerazione legata all'invecchiamento (71, 72). Importanti osservazioni hanno attribuito questi benefici all'attività di *scavenging* dei radicali liberi molto nota per i polifenoli, consentendo la riduzione dello stress ossidativo e conseguentemente del danno alle cellule cerebrali. Tuttavia, come affermato precedentemente, anche nel caso della neuroprotezione, spesso i test *in vitro* hanno il limite di non riflettere sempre un'efficace capacità antiossidante nell'uomo (18). Un ulteriore meccanismo antiossidante dei polifenoli è rappresentato dall'attività chelante nei confronti dei metalli, che potrebbe impedire la reazione di produzione di specie reattive dell'ossigeno, catalizzata dai metalli stessi (16). Per esempio, è probabile che questo effetto sia responsabile, almeno parzialmente, dell'efficacia neuroprotettiva di alcuni flavonoidi (73). Evidenze recenti suggeriscono che i polifenoli, in particolare i flavonoidi, possano influen-

zare processi specifici coinvolti nell'insorgenza di malattie neurodegenerative. Tra questi, la riduzione dell'accumulo di proteine neuropatologiche (74) ed il miglioramento della plasticità sinaptica (75) sono fenomeni descritti in modelli animali di patologie neurocognitive e trattati con dosi fisiologiche di polifenoli. Inoltre, l'effetto dei polifenoli di miglioramento della funzione vascolare cerebrale, ed il conseguente aumento del flusso sanguigno cerebrale indispensabile per l'attività cognitiva, è stato ben documentato sia in soggetti giovani che di età avanzata (76, 77).

Per quanto riguarda invece lo studio dell'effetto protettivo dei polifenoli sulla neuroinfiammazione i risultati sono meno consistenti. I potenziali meccanismi antinfiammatori sono stati descritti sia in cellule gliali che neuronali esposte a concentrazioni sovrafisiologiche di flavonoidi e alcuni studi sull'uomo hanno rivelato la capacità dei flavonoidi di ridurre i livelli plasmatici di alcuni marcatori di infiammazione (78, 79). Tuttavia, il potenziale antinfiammatorio dei polifenoli rimane incerto, poiché questi effetti non sono stati confermati da altri studi (80, 81).

Inoltre, un meccanismo aggiuntivo che potrebbe spiegare l'azione neuroprotettiva dei polifenoli nell'AD è l'attività di inibizione delle colinesterasi, con conseguente potenziamento della trasmissione colinergica e miglioramento delle funzioni cognitive (82). Questo effetto è stato descritto per esempio per il resveratolo, che ha mostrato la capacità di ridurre l'attività dell'enzima acetilcolinesterasi in specifiche regioni cerebrali in modelli sperimentali di ratti diabetici, con una conseguente attenuazione della compromissione della memoria (83).

Infine, le interrelazioni precedentemente descritte tra polifenoli e microbiota potrebbero avere anche importanti implica-

zioni nel contesto della neuroprotezione. Infatti, è stato dimostrato che i metaboliti dei polifenoli di origine intestinale prevedono l'oligomerizzazione del peptide neurotossico beta amiloide ($A\beta$), con un potenziale effetto protettivo dei disturbi neurodegenerativi in modelli animali (84).

3.3. Meta-analisi

3.3.1. Metodi

La ricerca in letteratura è stata eseguita valutando sia i *databases* MEDLINE che Embase, considerando tutti i manoscritti pubblicati in lingua inglese fino al 10 novembre 2018, utilizzando la seguente strategia di ricerca: ((*polyphenol*) OR *flavonoids*) OR *polyphenolic compounds*) OR *Isoflavone*) OR *flavanol*) OR *phytoestrogen*) OR *resveratrol*) AND *neurocognitive function*) OR *cognitive function*) OR *cognition*). La ricerca in letteratura è stata ripetuta aggiungendo le parole “*administration*” e “*therapy*” utilizzando termini Mesh. Sono stati adottati gli stessi criteri di inclusione descritti sopra, per l'ambito cardiovascolare. Durante l'estrazione dei dati, sono stati considerati come *endpoint* i risultati dei seguenti test cognitivi: *Wisconsin Card Classification Test* (WCST) (85), *Reys Auditory Verbal Learning Task* (RAVLT) (86), *Trail Making test* (TMT A e B) (87), *Alzheimer's Disease Assessment Scale-cognitive subscale* (ADAS-Cog) (88), *Mini-Mental State Examination* (MMSE) (89) e *Wechsler Adult Intelligence Scale* (WAIS) (90). La meta-analisi dei dati estratti dagli studi inclusi è stata condotta come descritto nella Sezione 2.2.1.

3.3.2. Risultati

La ricerca in letteratura ha rilevato 293.093 documenti. Gli studi che valutavano modelli animali o cellulari sono stati esclusi e nei rimanenti 19.907 è stato valutato l'abstract. Tra questi, 61 studi hanno

soddisfatto i criteri di inclusione e sono stati ulteriormente valutati per l'estrazione dei dati. Gli *endpoint* neurocognitivi considerati per l'analisi erano disponibili in 21 studi. Questi ultimi sono stati poi inseriti nella meta-analisi (*Tabella 2*).

Il punteggio ADAS-Cog è stato riportato in 5 studi, per un totale di 508 pazienti trattati e 501 controlli. Gli effetti complessivi non hanno mostrato un impatto significativo dei polifenoli su ADAS-Cog ($p=0,310$). Tuttavia, l'analisi ha mostrato

Tabella 2 - Caratteristiche degli studi selezionati nella meta-analisi degli effetti neurodegenerativi dei polifenoli.

Autore	Anno	Sostanza o estratto	Endpoint neurodegenerativi
Dai C.X.	2018	Estratto di <i>Ginkgo biloba</i>	HAMD, WCST
Anton S.D.	2017	Resveratolo	Controlled Oral Word Association Digits Forward and Backward, Erikson-Flanker, Hopkins Verbal Learning Test-Revised, Task Switching, Trail Making Test
Evans H.M.	2017	Resveratolo	Profile of Mood States, RAVLT, Semantic Memory Tests, Trail Making Test, Visual Spatial Working Memory
Lee J.	2016	Catechina ed epicatechina	ADAS-Cog, CIBIC-Plus, FAS, HARS, HDRS, Hopkins VLT, MMSE, Trail Making Test, WAIS-IIIWATR, WCST-64
Gleason C.E.	2015	Isoflavoni della soia	Fluency, MMSE, GDS, Labirinti, POMS, Stroop Color Word Test, Trail Making Test, Verbal Memory, Visual Memory, Visual Motor
Witte A.V.	2014	Resveratolo	Auditory Verbal Learning Test, MRI
Gavrilova S.I.	2014	Estratto di <i>Ginkgo biloba</i>	CAMCOG, Depression Scale, Geriatric Trail-Making Test, Inventory, MMSE, Neuropsychiatric State-Trait Anxiety Inventory
Henderson V.W.	2012	Isoflavoni della soia	Center for Epidemiological Studies Depression scale (CES-D), Neuropsychological battery, Wechsler Test of Adult Reading
Kaschel R.	2011	Estratto di <i>Ginkgo biloba</i>	Test della memoria
Snitz B.E.	2009	Estratto di <i>Ginkgo biloba</i>	ADAS-Cog, MMSE
Gleason C.E.	2009	Isoflavoni della soia	Boston Naming test, Buschke Selective Reminding test, FAS, Grooved Pegboard, Labirinti, Stroop Color Word test (SCWT), Trail Making Test, VSL
Stough C.	2008	Estratto di Bacopa monnieri	CDR, RVIP
McCarney R.	2008	Estratto di <i>Ginkgo biloba</i>	ADAS-Cog, QOL-AD
Woelk H.	2007	Estratto di <i>Ginkgo biloba</i>	CGI-C, EAAS, HAMA
Casini M.L.	2006	Isoflavoni della soia	Digit Symbol Test, HDRS, WAIS
Kreijkamp-Kaspers S.	2004	Isoflavoni della soia	MMSE, RAVLT, WAIS
Kanowski S.	2003	Estratto di <i>Ginkgo biloba</i>	ADAS-Cog, Valutazione clinica globale, MMSE
Santos R.F.	2003	Estratto di <i>Ginkgo biloba</i>	Toulouse-Pièron Concentrated Attention, WAIS, WCST, Wechsler Memory Scale revised (WMS-R)
Woo J.	2003	Pueraria lobata (isoflavone)	HKLT, MMSE, SF-36, Trail making test, WAIS
Kritz-Silverstein D.	2003	Isoflavoni della soia	Category Fluency, Logical Memory e Recall, Trails A e B
Mix J.A.	2002	Estratto di <i>Ginkgo biloba</i>	SRT, WAIS, WCST
Solomon P.R.	2002	Estratto di <i>Ginkgo biloba</i>	CVLT, Boston Naming test, WAIS, WMS

Segue >>>

Autore	Anno	Sostanza o estratto	Endpoint neurodegenerativi
File S.E.	2001	Isoflavoni della soia	PASAT, Stocking Cambridge Test, WMS
Mix J.A.	2000	Estratto di <i>Ginkgo biloba</i>	MMSE, SCWT, Trail Making Test, WMS
Le Bars P.L.	2000	Estratto di <i>Ginkgo biloba</i>	ADAS-Cog, Valutazione geriatrica (GERRI) e valutazione clinica globale
Le Bars P.L.	1997	Estratto di <i>Ginkgo biloba</i>	ADAS-Cog, Valutazione geriatrica

ADAS-Cog: Alzheimer's Disease Assessment Scale–Cognitive Subscale; ADL-IS: Scala Internazionale delle Attività di Vita Quotidiana; AOT: test della soglia di audibilità; BLMD: Scala dell'umore di Bond e Lader; CAMCOG: Cambridge Cognition Examination; CANTAB: Cambridge Neuropsychological Test Automated Battery; CDR: Clinical Dementia Rating Scale; CIBIC-Plus: The Clinician Interview-Based Impression of Change; CVLT: California Verbal Learning Test; DCT-G: Digit connection test-G; DMTS: Delayed Matching To Sample Test; FAS: misura della fluidità fonemica della parola; GDS: Global Deterioration Scale; HADS: Hospital Anxiety and Depression Scales; HAMA: Hamilton Anxiety Rating; HDRS: Hamilton Depression Rating Scale; HKLT: Hong Kong List-Learning Test; ITVS: Test's increment threshold for visual stimuli; MMSE: Mini Mental State Examination; MRI: magnetic resonance imaging; NPI: Neuropsychiatric Inventory; PASAT: Paced Auditory Serial Addition Task; POMS: profile of mood states; QOL-AD: Quality of Life in Alzheimer's Disease; RAVLT: Rey Auditory Verbal Learning Test; RVIP: Rapid Visual Information Processing; SDS: self-rating depression scale including; SF-36: Short Form Health Survey; SIS-M: subjective intensity scale-mood; SMS: Sensorimotor synchronization test; SRT: Test della Memoria Selettiva; SWM: spatial working memory; WAIS: Wechsler Adult Intelligence Scale; WCST/WCST-64: Wisconsin Card SortingTest/Wisconsin Card Sorting Test-64 (versione ridotta); WMS: Scala della Memoria di Weschler.

un effetto significativo di *Ginkgo biloba* su ADAS-Cog, rispetto al placebo (differenza media -2,02, IC 95% -3,79; -0,26, p=0,020).

Il MMSE è stato riportato in 8 studi, per un totale di 1868 pazienti trattati e 1856 controlli. Complessivamente non è emerso alcun effetto significativo dei polifenoli sull'esito di MMSE (p=0,080).

Per quanto riguarda il WAIS, solo tre *outcome* sono stati riportati in più di 3 studi: *Digital symbol*, *Block design* e *Digit Span*. Pertanto, solo questi 3 ambiti del test WAIS sono stati meta-analizzati. Il *Digital symbol* è stato riportato in 8 studi, per un totale di 4.032 pazienti (2.029 pazienti e 2.003 controlli), senza un effetto significativo dei polifenoli (p=0,380). Il *Block design*, al contrario, è stato valutato in 4 studi, per un totale di 3.389 pazienti, suggerendo una riduzione significativa (p=0,005), in particolare quando è stato utilizzato l'estratto di *Ginkgo biloba* (differenza media -0,43, IC 95%: -0,73; -0,13, p=0,005).

Il *Digit Span* è stato riportato in 5 studi per un totale di 308 pazienti e 309 controlli. L'effetto complessivo non è stato influen-

zato in modo significativo dalla somministrazione di polifenoli (p=0,600).

Il RAVLT è stato riportato in 3 studi, per un totale di 301 soggetti (150 trattati e 151 controlli). La somministrazione di polifenoli ha aumentato significativamente il punteggio del RAVLT - richiamo immediato (differenza media 1,63, IC 95%: 1,25; 2,00, p<0,001).

Il WCST è stato riportato in 4 studi per un totale di 456 pazienti. L'effetto complessivo non è stato significativamente influenzato dalla somministrazione di polifenoli (p=0,070).

Il test *trail making A* (TMT-A) è stato utilizzato in 7 studi, per un totale di 3473 pazienti. La somministrazione di polifenoli non ha migliorato significativamente questo punteggio (p=0,620). Allo stesso modo, il test *trail making B* (TMT-B) è stato utilizzato in 8 studi, per un numero totale di 3.503 soggetti (1.765 pazienti e 1.738 controlli). L'effetto complessivo dei polifenoli è stato statisticamente significativo (differenza media -1,59, IC 95%: -2,75; -0,43, p=0,007), probabilmente per il contributo del resveratolo, valutato in due studi sin-

goli (differenza media -1,85, IC 95%: -3,14, -0,55, p=0,005).

3.3.3. Discussione

Nella meta-analisi condotta, abbiamo preso in considerazione gli effetti dei polifenoli su alcuni aspetti delle funzioni cognitive, al fine di fornire un quadro generale delle attività documentate. Come già specificato in precedenza, la nostra meta-analisi si è limitata ad includere studi di intervento che hanno utilizzato integratori alimentari contenenti polifenoli. In particolare, gli studi selezionati hanno previsto l'utilizzo di estratti ricchi di polifenoli fino ad un quantitativo massimo di 480 mg, 300 mg e 100 mg per *Ginkgo biloba*, resveratolo e isoflavoni della soia, rispettivamente. Questi dosaggi verosimilmente forniscano una quantità di polifenoli decisamente maggiore rispetto a quella raggiungibile tramite la dieta (43).

I risultati della meta-analisi riportano come l'assunzione di polifenoli non abbia determinato miglioramenti significativi della funzione cognitiva globale, valutata tramite gli score MMSE e ADAS-Cog. L'unica eccezione a questo andamento è rappresentata dall'estratto di *Ginkgo biloba*, la cui assunzione ha determinato un miglioramento dello score ADAS-Cog, uno dei test più utilizzati per misurare l'entità del declino cognitivo e che valuta le proprietà di linguaggio e di memoria. I nostri risultati supportano l'osservazione di una precedente meta-analisi di due studi, in cui è stata osservata una tendenza non statisticamente significativa verso il miglioramento dello score del test ADAS-Cog nel gruppo di soggetti trattati con l'estratto di *Ginkgo biloba* (91). Allo stesso modo, tra i risultati dei diversi sotto-test della batteria del test WAIS, solo quello relativo al disegno con i cubi (*Block Design*), spesso identificato come un test prototipo per valutare

l'abilità visuo-percettiva, ha mostrato un miglioramento dopo trattamento con i polifenoli. Analogamente a quanto osservato per il test ADAS-Cog, anche in questo caso i risultati più significativi sono stati ottenuti con l'estratto di *Ginkgo biloba*. Va tuttavia specificato che tale risultato positivo è determinato da uno soltanto dei tre studi analizzati (92). Pertanto, questa osservazione richiede una conferma tramite ulteriori studi. In ogni caso, l'efficacia del *Ginkgo biloba* può essere attribuita alla presenza nell'estratto di diversi componenti attivi, tra cui diterpeni, ginkgolidi e un certo numero di flavonoidi (93). Queste molecole possono agire su molteplici target nel sistema nervoso centrale, contribuendo ad attenuare il declino cognitivo.

Analizzando in modo dettagliato l'impatto dei polifenoli su specifici domini cognitivi, è stato riscontrato un miglioramento significativo nello score del test RAVLT, che valuta l'apprendimento verbale e la memoria, nonostante il numero totale dei partecipanti allo studio fosse limitato. In particolare, i tre studi inclusi nella meta-analisi hanno valutato gli effetti degli isoflavoni della soia e del resveratolo, riportando effetti positivi in tutti i casi. Questa osservazione è coerente con i risultati di due precedenti meta-analisi, specificamente mirate a studiare l'effetto del resveratolo e della soia (94, 95). Tuttavia, quest'ultimo studio sugli effetti della soia ha utilizzato un punteggio unico che ha tenuto conto dei risultati di tutti i test neuropsicologici nel loro insieme, mentre nel nostro studio abbiamo valutato gli effetti sui singoli domini cognitivi. D'altra parte, i nostri risultati sul resveratolo non sono coerenti con quelli di un'altra recente meta-analisi, in cui è stato dimostrato un impatto benefico dello stilbene sul tono dell'umore, piuttosto che sulla memoria e sulle funzioni cognitive (96). Per spiegare

queste discrepanze si possono annoverare i criteri di selezione degli studi (nel nostro caso sono stati inclusi solo pazienti anziani o con MCI) e differenze interindividuali molto elevate riguardo la biodisponibilità del resveratolo, che possono derivare dalla sua scarsa idrosolubilità, dalla instabilità chimica e dal metabolismo epatico e intestinale (97).

Un altro *score* cognitivo che è risultato migliorato dall'integrazione con polifenoli nella meta-analisi effettuata è stato quello del test TMT-B, che valuta le funzioni esecutive, mentre nessun effetto è stato osservato sui livelli di attenzione, misurati tramite il test TMT-A. In questo caso, l'analisi è stata condotta su più di 3.000 soggetti, aspetto che rende questo risultato particolarmente rilevante da un punto di vista clinico. In questo caso il risultato positivo della meta-analisi è trainato dai dati positivi ottenuti con il resveratolo. L'efficacia del resveratolo che si evince dalla nostra meta-analisi è in accordo con l'effetto benefico sulle funzioni cerebro-vascolari e cognitive, come dimostrato in un recente studio condotto su donne nel periodo post-menopausa (98).

Il principale limite di questa meta-analisi è legato all'elevato numero di *score* utilizzati nei vari studi per valutare l'impatto dei polifenoli sulle funzioni cognitive. L'analisi dell'effetto sui singoli *score*, ciascuno dei quali riflette un particolare aspetto del dominio cognitivo, ci ha costretto a restringere l'analisi ad un numero limitato di studi rispetto a quelli disponibili in letteratura. Per ovviare a questa critica, così come si verifica in ambito cardiovascolare, è necessario individuare quali tra i *marker* risultino più solidi nella misurazione del miglioramento neurocognitivo, anche al fine di ottemperare alle richieste dell'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA), per gli *health claims* degli

alimenti. A questo proposito manca una precisa indicazione di quale test psicologico sia più appropriato per la valutazione delle funzioni del sistema nervoso centrale (99). Tuttavia, un progetto tuttora in corso mira proprio a rispondere a questa domanda nel contesto della salute neurocognitiva (49).

D'altra parte invece, un punto di forza del nostro lavoro è la selezione rigorosa dei soggetti, che ha escluso pazienti già affetti da demenza, al fine di evidenziare in modo specifico alcuni potenziali effetti positivi dei polifenoli nella prevenzione del declino cognitivo.

In conclusione, i risultati di questa meta-analisi suggeriscono che l'integrazione con polifenoli potrebbe migliorare alcuni indicatori specifici dello stato cognitivo nell'uomo. Inoltre, tra tutti i composti, lo stilbene resveratolo sembra essere il più attivo. Nel caso dell'estratto di *Ginkgo biloba*, i benefici riportati potrebbero essere attribuiti all'intero fitocomplesso, dove è probabile che sia composti polifenolici che non polifenolici giochino un ruolo attivo.

Considerate le differenze tra gli studi in termini di caratteristiche dei pazienti ed il numero limitato di quelli analizzati, nonché l'incoerenza dei dati di letteratura, si rendono necessarie ulteriori ricerche per verificare se l'assunzione a lungo termine di polifenoli, singolarmente o come miscela, possa rappresentare una promettente strategia per la prevenzione del declino cognitivo nelle malattie legate all'invecchiamento.

4. Discussione

La valutazione globale e obiettiva degli effetti dei polifenoli sulla salute umana presenta diversi punti critici. Uno di questi è l'esistenza di quasi 10.000 polifenoli

con strutture e ruoli fisiologici peculiari, il che rende difficile la comprensione dei loro effetti a breve e lungo termine. Un secondo punto critico riguarda il ruolo recentemente ben delineato del microbiota intestinale nel metabolismo dei polifenoli, che giustifica l'esistenza di differenti metabotipi, i quali possono influenzare in modo differente le funzioni fisiologiche, determinando ampie differenze inter-individuali nella risposta biologica. La terza criticità è legata al fatto che è difficile comparare i dati provenienti da studi osservazionali/epidemiologici con quelli che derivano da *trial* di intervento. Mentre nel primo caso possiamo assumere che l'effetto globale sia il risultato dell'interazione sinergica di più componenti della dieta, nel secondo caso, pur limitando l'interferenza di potenziali fattori confondenti, possiamo andare incontro a scarsa aderenza alla vita reale, dove i polifenoli sono assunti in piccole quantità nell'arco di tutta l'esistenza.

Come suggerito da Mena nel suo recente studio, la ricerca sui polifenoli richiede al più presto un approccio sperimentale rigoroso per svelare il loro potenziale preventivo sullo sviluppo delle malattie (100). Sulla base di questo, la valutazione della quantità di polifenoli effettivamente consumata, degli effettivi metaboliti circolanti, della variabilità inter-individuale e dei *target* cellulari, deve diventare un aspetto cardine da considerarsi in ogni studio. Non appena queste linee guida saranno accettate da tutti i ricercatori, i dati raccolti nel campo dei polifenoli e della salute umana saranno più realistici.

Nella presente revisione, abbiamo valutato criticamente e meta-analizzato solo studi di intervento nei quali era previsto l'utilizzo di integratori alimentari contenenti polifenoli, raccogliendo informazioni promettenti, ma non definitive, sugli effetti

preventivi di alcuni polifenoli nei confronti delle malattie cardiovascolari e del declino cognitivo.

Siamo consapevoli dei limiti di questo studio: la selezione di sperimentazioni che prevedono l'assunzione di integratori alimentari da parte dei soggetti in studio non consente di tener conto dei benefici per la salute derivanti da una dieta naturalmente arricchita di polifenoli, in cui possono comparire gli effetti sinergici di diversi componenti. Analogamente, il consumo di singoli composti polifenolici non può produrre gli stessi benefici osservati negli studi epidemiologici. In più, i dati provenienti da studi sugli integratori alimentari, nei quali l'assunzione di polifenoli è superiore al normale consumo, non possono essere ritenuti realistici in termini di interazione con farmaci o altri componenti della dieta. Inoltre, quando i polifenoli sono assunti sotto forma di formulazioni, dovrebbero essere considerati come nutraceutici ed essere sottoposti ad adeguate analisi di sicurezza alla stregua dei farmaci, specialmente se la loro biodisponibilità e attività biologica vengono incrementate.

5. Conclusioni

Sebbene la maggior parte degli integratori a base di polifenoli presenti sul mercato abbia dimostrato di avere effetti benefici sulla salute basandosi solo su dati *in vitro*, la quantità e la qualità di studi clinici randomizzati condotti in modo rigoroso è notevolmente aumentata negli ultimi anni. Tuttavia, gli effetti a lungo termine devono ancora essere chiariti e gli studi con *endpoint* clinici robusti sono ancora carenti. Per svelare il potenziale ruolo preventivo dei polifenoli nella vita reale sono necessari *in primis* studi volti a caratterizzare la loro farmacocinetica e sicurezza.

Glossario

Alimenti funzionali: alimenti arricchiti, naturalmente o artificialmente, di sostanze aventi funzioni salutistiche al di là delle proprietà nutrizionali.

Alzheimer's Disease Assessment Scale- subscale Cognitive (ADAS-Cog): è un test neuropsicologico utilizzato soprattutto negli studi clinici e costituito da 9 prove che valutano specifiche caratteristiche di efficienza cognitiva sensibili al processo di deterioramento.

Beta amiloide: proteina responsabile della formazione di aggregati insolubili e tossici che si accumulano nelle placche cerebrali tipiche dei soggetti affetti da malattia di Alzheimer.

Dilatazione flusso-mediata (FMD): è definita come la variazione percentuale del diametro dell'arteria brachiale a seguito di iperemia reattiva, indotta tipicamente da un arresto circolatorio di cinque minuti causato dal rigonfiamento del manicotto di uno sfigmomanometro posto in posizione distale rispetto all'arteria, con conseguente rilascio di NO.

Dimetilarginina asimmetrica: biomarcatore di malattia cardiovascolare, i cui livelli sono associati ad eventi acuti e morte. Inibisce la produzione di ossido nitrico, ostacolando di conseguenza la normale omeostasi vascolare.

Endotelina-1: peptide secreto dalle cellule endoteliali e dai macrofagi attivati, dotato di una potente attività vasocostrittrice. I suoi livelli correlano positivamente con la malattia cardiovascolare.

Fattore di necrosi tumorale alfa (TNF- α): citochina proinfiammatoria, secreta principalmente dai macrofagi, ma anche da altre cellule del sistema immunitario. Svolge un ruolo promuovente la formazione della placca aterosclerotica.

Fitocomplesso: insieme dei costituenti chimici di una pianta, che includono sia i principi attivi che molecole ad attività minore e che concorrono, con ruoli diversi, all'attività biologica della pianta stessa.

Homeostasis Model Assessment-Adiponectin (HOMA-AD): È una versione modificata del tradizionale indice HOMA-IR (vedi sotto), che stima l'insulino-resistenza considerando anche i livelli sierici di adiponectina, aggiungendo quindi una misura indiretta di adiposopatia.

Homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR): è un indice che valuta la condizione di insulino resistenza e si calcola con un modello matematico che mette in rapporto le concentrazioni nel sangue di glucosio ed insulina a digiuno.

Interleuchina-1 beta: citochina proinfiammatoria, secreta principalmente dai macrofagi e dalle cellule endoteliali. Come il TNF- α contribuisce allo stato infiammatorio che favorisce l'aterogenesi. Lo studio CANTOS ha dimostrato per la prima volta che la strategia anti-infiammatoria, perseguita tramite anticorpi anti- interleuchina-1 beta, può avere implicazioni cliniche favorevoli nella malattia cardiovascolare.

Metabotipo: è il fenotipo metabolico di un individuo o di una popolazione nel quale sono integrate caratteristiche genetiche e ambientali (dieta, stile di vita, attività microbiotica intestinale), e attualmente rappresenta il fondamento della medicina personalizzata. La classificazione degli individui in sottogruppi in base al loro profilo metabolico è definita come metabotipizzazione e questo approccio è stato impiegato per identificare con successo la risposta differenziale agli interventi dietetici.

Meta-analisi: strumento di ricerca il cui scopo è quello di riassumere i dati provenienti da più trial di uno stesso trattamento in un unico risultato cumulativo.

Mild cognitive impairment (MCI): disturbo cognitivo lieve che si manifesta con deficit di memoria, che può coinvolgere seppure in misura minore altre funzioni cognitive, quali il linguaggio, le abilità visuo-spatiali, le funzioni esecutive, le capacità di ragionamento, senza tuttavia interferire significativamente con le attività giornaliere. Tale condizione può progredire verso una probabile malattia di Alzheimer con un tasso di circa il 10% al 15% per anno.

Mini-Mental State Examination (MMSE): è il test neuropsicologico più utilizzato in ambito clinico, costituito da trenta domande, che fanno riferimento a sette aree cognitive differenti, per la valutazione della presenza di deterioramento cognitivo.

Molecole di adesione vascolare: soluble intercellular/vascular cell adhesion molecule 1 (sICAM-1/sVCAM-1). Sono molecole di adesione espresse dalle cellule endoteliali attivate nelle fasi precoci dell'aterogenesi e costituiscono dei biomarcatori di infiammazione, correlati al rischio cardiovascolare.

Nutraceutici: il termine si applica a preparazioni di origine vegetale o animale, che oltre per la nutrizione sono utilizzati anche a scopo preventivo o terapeutico.

Polifenoli: costituiscono una ampia ed eterogenea famiglia di circa 10.000 molecole largamente presenti nel regno vegetale. Tra le molecole di cui si è maggiormente studiata la bioattività ricordiamo la quercetina, appartenente alla classe dei flavonoidi, il resveratolo, uno stilbene, e le catechine.

Proteina C reattiva ad alta sensibilità (hs-CRP): la PCR è una proteina infiammatoria di fase acuta. Attraverso la misurazione della hs-PCR si determinano con accuratezza concentrazioni estremamente basse della proteina, indice di un basso grado di infiammazione, che è riconosciuto essere associato al rischio di sviluppare una patologia cardiovascolare.

Rey's auditory verbal learning task (RAVLT): è un test costituito da 7 prove per la valutazione della memoria a breve e a lungo termine tramite la misura della capacità di rievocazione immediata e differita.

Trail-making test (TMT): è un test neuropsicologico per la valutazione di deficit cognitivo, che prende in esame l'attenzione visiva e le funzioni esecutive. Il TMT richiede di unire in ordine crescente con una linea venticinque numeri cerchiati disposti casualmente su di un foglio (TMT-A) e di ordinare venticinque numeri e venticinque lettere cerchiati in ordine crescente e alternato (TNT-B), nel minore tempo possibile.

Wechsler Adult Intelligence Scale (WAIS): è costituito da una batteria di 15 test che valutano le performance mentali, per arrivare non solo a determinare numericamente il quoziente intellettuale dell'individuo, ma per analizzarne il funzionamento dal punto di vista cognitivo.

RIASSUNTO

Numerosi studi hanno dimostrato come un'alimentazione ricca di polifenoli possa avere effetti benefici sullo sviluppo di patologie degenerative, quali l'aterosclerosi e malattie che affliggono il sistema nervoso centrale. Questa attività benefica dei polifenoli è stata associata non solo alle loro proprietà antiossidanti e anti-infiammatorie, ma anche a meccanismi aggiuntivi quali la capacità di modulare il metabolismo lipidico e la funzionalità del microbiota intestinale. Tuttavia, studi a lungo termine sull'uomo hanno prodotto risultati controversi, rendendo incerta la predizione dell'impatto dei polifenoli sulla salute. Lo scopo di questa revisione è fornire una panoramica e un'analisi critica della letteratura relativa agli effetti dei principali polifenoli di origine alimentare sulle patologie cardiovascolari e neurodegenerative. La meta-analisi che abbiamo condotto, includendo studi clinici randomizzati controllati su soggetti che avevano assunto integratori a base di polifenoli, ha rivelato che, sebbene alcuni polifenoli possano avere un impatto positivo su determinati marker specifici del rischio cardiovascolare e dello stato cognitivo, in letteratura sono presenti molti dati incoerenti. Pertanto, indicazioni precise riguardanti l'utilizzo di queste sostanze per la prevenzione delle malattie cardiovascolari e del declino cognitivo non sono attualmente disponibili. Una volta chiariti alcuni aspetti fondamentali quali la biodisponibilità dei polifenoli e la caratterizzazione della farmacocinetica e della sicurezza delle formulazioni che li contengono, sarà possibile avere un quadro più chiaro del reale potenziale dei polifenoli per la prevenzione delle malattie.

Parole chiave: Polifenoli, prevenzione, malattia cardiovascolare, malattia neurodegenerativa, meta-analisi.

Bibliografia

1. Tresserra-Rimbau A, Lamuela-Raventos RM, Moreno JJ. Polyphenols, food and pharma. Current knowledge and directions for future research. *Biochem. Pharmacol.* 2018; 156: 186-195.
2. Visioli F, Davalos A. Polyphenols and Cardiovascular Disease: A Critical Summary of the Evidence. *Mini-Reviews Med. Chem.* 2012; 11: 1186-1190.
- 3 Tomé-Carneiro J, Visioli F. Polyphenol-based nutraceuticals for the prevention and treatment of cardiovascular disease: Review of human evidence. *Phytomedicine.* 2016; 23: 1145-1174.
- 4 Marín L, Miguélez EM, Villar CJ, Lombó F. Bioavailability of dietary polyphenols and gut microbiota metabolism: Antimicrobial properties. *Biomed Res. Int.* 2015; 2015.
- 5 Dicker D, et al. Global, regional, and national age-sex-specific mortality and life expectancy, 1950-2017: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet.* 2018; 392: 1684-1735.
6. World Health Organization. World Health Statistics 2018: Monitoring Health for the SDGs Sustainable Development Goals. Intergovernmental Panel on Climate Change. 2018.
7. Mahabir S, Pathak YV. Nutraceuticals and health: Review of human evidence. *Nutraceuticals and Health: Review of Human Evidence.* 2016; 1:366.
8. Liperoti R, Vetrano DL, Bernabei R, G. Onder. Herbal Medications in Cardiovascular Medicine. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2017; 69: 1188-1199.
- 9 Argani H, Ghorbanikhaghjo A, Vatankhahan H, et al. The effect of red grape seed extract on serum paraoxonase activity in patients with mild to moderate hyperlipidemia. *Sao Paulo Med. J.* 2016; 134: 234-239.
10. Brüll V, et al. Effects of a quercetin-rich onion skin extract on 24 h ambulatory blood pressure and endothelial function in overweight-to-obese patients with (pre)-hypertension: A randomised double-blinded placebo-controlled cross-over trial. *Br. J. Nutr.* 2015; 114: 1263-1277.
11. Brüll V, et al. No effects of quercetin from onion skin extract on serum leptin and adiponectin concentrations in overweight-to-obese patients with (pre)-hypertension: a randomized double-blinded, placebo-controlled crossover trial. *Eur. J. Nutr.* 2017; 56: 2265-2275.
12. Choi EY, et al. Effect of onion peel extract on endothelial function and endothelial progenitor cells in overweight and obese individuals. *Nutrition.* 2015; 31: 1131-1135.
13. Dower JI, Geleijnse JM, Gijsbers L, et al. Supplementation of the pure flavonoids epicatechin and quercetin affects some biomarkers of endothelial dysfunction and inflammation in (pre)hypertensive adults: A randomized double-blind, placebo-controlled, crossover trial. *J. Nutr.* 2015; 145: 1459-1463.
- 14 Dower JI, Geleijnse JM, Gijsbers L, et al. Effects of the pure flavonoids epicatechin and quercetin on vascular function and cardiometabolic health: A randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover trial. *Am. J. Clin. Nutr.* 2015; 101: 914-921.
15. Koenig W. Inflammation revisited: Atherosclerosis in the post-CANTOS era. *Eur. Cardiol. Rev.* 2017; 12: 89-91.
- 16 Fraga CG, Galleano M, Verstraeten SV, Oteiza PI. Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols. *Mol. Aspects Med.* 2010; 31: 435-445.
- 17 Sroka Z, Cisowski W. Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and anti-radical activity of some phenolic acids. *Food Chem. Toxicol.* 2003; 41: 753-758.
18. Granato D, et al. Antioxidant activity, total phenolics and flavonoids contents: Should we ban in vitro screening methods? *Food Chem.* 2018; 264: 471-475.
19. Iranshahy M, Iranshahy M, Abtahi SR, Karimi G. The role of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 in hepatoprotective activity of natural products: A review. *Food Chem. Toxicol.* 2018; 120: 261-276.
20. Rahman I, Biswas SK, Kirkham PA. Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols. *Biochem. Pharmacol.* 2006; 72: 1439-1452.
- 21 Callcott ET, Thompson K, Oli P, et al. Coloured rice-derived polyphenols reduce lipid peroxidation and pro-inflammatory cytokines ex vivo. *Food Funct.* 2018; 9: 5169-5175.
- 22 Yu W, Tao M, Zhao Y, et al. 4'-methoxyresveratrol alleviated AGE-induced inflammation via RAGE-mediated NF-κB and NLRP3 inflammasome pathway. *Molecules.* 2018; 23.
- 23 Vitale M, et al. Polyphenol intake and cardiovascular risk factors in a population with type 2 diabetes: The TOSCA.IT study. *Clin. Nutr.* 2017; 36: 1686-1692.
- 24 Medina-Remón A, et al. Polyphenol intake from a Mediterranean diet decreases inflammatory biomarkers related to atherosclerosis: a sub-study of the PREDIMED trial. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 2017; 83: 114-128.
- 25 Hurtubise J, McLellan K, Durr K, et al. The different facets of dyslipidemia and hyperten-

- sion in atherosclerosis. *Curr. Atheroscler. Rep.* 2016; 18.
- 26 Zanotti I, Dall'Asta M, Mena P, et al. Atheroprotective effects of (poly) phenols: A focus on cell cholesterol metabolism. *Food Funct.* 2015; 6: 13-31.
 - 27 Sae-Tan S, Grove KA, Lambert JD. Weight control and prevention of metabolic syndrome by green tea. *Pharmacol. Res.* 2011; 64: 146-15.
 - 28 Hirsova P, et al. Epigallocatechin gallate enhances biliary cholesterol secretion in healthy rats and lowers plasma and liver cholesterol in ethinylestradiol-treated rats. *Eur. J. Pharmacol.* 2012; 691: 38-45.
 - 29 Kobayashi M, et al. Epigallocatechin gallate decreases the micellar solubility of cholesterol via specific interaction with phosphatidylcholine. *J. Agric. Food Chem.* 2014; 62: 2881-2890.
 - 30 Dash S, Xiao C, Morgantini C, et al. High-dose resveratrol treatment for 2 weeks inhibits intestinal and hepatic lipoprotein production in overweight/obese men. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2013; 33: 2895-2901.
 - 31 Azorín-Ortuño M, et al. Effects of long-term consumption of low doses of resveratrol on diet-induced mild hypercholesterolemia in pigs: A transcriptomic approach to disease prevention. *J. Nutr. Biochem.* 2012; 23: 829-837.
 - 32 Yasuda A, Natsume M, Osakabe N, et al. Cacao polyphenols influence the regulation of apolipoprotein in hepg2 and caco2 cells. *J. Agric. Food Chem.* 2011; 59: 1470-1476.
 - 33 Balzer J, et al. Sustained Benefits in Vascular Function Through Flavanol-Containing Cocoa in Medicated Diabetic Patients. A Double-Masked, Randomized, Controlled Trial. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2008; 51: 2141-2149.
 - 34 Leikert JF, Räthel TR, Wohlfart P, et al. Red wine polyphenols enhance endothelial nitric oxide synthase expression and subsequent nitric oxide release from endothelial cells. *Circulation.* 2002; 106: 1614-1617.
 - 35 Fisher NDL, Hughes M, Gerhard-Herman M, Hollenberg NK. Flavanol-rich cocoa induces nitric-oxide-dependent vasodilation in healthy humans. *J. Hypertens.* 2003; 21: 2281-2286.
 - 36 Actis-Goretta L, Ottaviani JI, Keen CL, Fraga CG. Inhibition of angiotensin converting enzyme (ACE) activity by flavan-3-ols and procyanidins. *FEBS Lett.* 2003; 555: 597-600.
 - 37 Taubert D. Effects of low habitual cocoa intake on blood pressure and bioactive nitric oxide. *South. Med. J.* 2008; 101: 49-60.
 - 38 Muñoz-gonzález Bl, Cueva C, Jiménez-girón A et al. A Survey of Modulatio. *Biomed Res. Int.* 7: 1-9.
 - 39 Vendrame S, Guglielmetti S, Riso P, et al. Six-week consumption of a wild blueberry powder drink increases Bifidobacteria in the human gut. *J. Agric. Food Chem.* 2011; 59: 12815-12820.
 - 40 Muñoz-gonzález I, Cueva C, Jiménez-girón A, et al. A survey of modulation of gut microbiota by dietary polyphenols. *Biomed Res. Int.* 2015; 2015.
 - 41 Moreno-Indias I, et al. Red wine polyphenols modulate fecal microbiota and reduce markers of the metabolic syndrome in obese patients. *Food Funct.* 2016; 7: 1775-1787.
 - 42 Cheng H, Jenner AM, Seng C, Kun Y. Effect of tea phenolics and their aromatic fecal bacterial metabolites on intestinal microbiota. *Res. Microbiol.* 2006; 157: 876-884.
 - 43 Scalbert A, Williamson G. Dietary Intake and Bioavailability of Polyphenols. *J. Med. Food.* 2000; 121-125.
 - 44 Cannon CP, et al. Ezetimibe added to statin therapy after acute coronary syndromes. *N. Engl. J. Med.* 2015; 372: 2387-2397.
 - 45 Atteritano M, et al. Effects of the phytoestrogen genistein on some predictors of cardiovascular risk in osteopenic, postmenopausal women: A two-year randomized, double-blind, placebo-controlled study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2007; 92: 3068-3075.
 - 46 Kawashiri M, Tada H, Nomura A, Yamagishi M. Mendelian randomization: Its impact on cardiovascular disease. *J. Cardiol.* 2018; 72: 307-313.
 - 47 Tall AR. Plasma high density lipoproteins: Therapeutic targeting and links to atherogenic inflammation. *Atherosclerosis.* 2018; 276: 39-43.
 - 48 Madsen CM, Varbo A, Nordestgaard BG. Extreme high high-density lipoprotein cholesterol is paradoxically associated with high mortality in men and women: Two prospective cohort studies. *Eur. Heart J.* 2017; 38: 2478-2486.
 - 49 Martini D, et al. Claimed effects, outcome variables and methods of measurement for health claims proposed under European Community Regulation 1924/2006 in the framework of protection against oxidative damage and cardiovascular health. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 2017; 27: 473-503.
 - 50 Jaul E, Barron J. Age-Related Diseases and Clinical and Public Health Implications for the 85 Years Old and Over Population. *Front. Public Heal.* 2017; 5: 1-7.
 - 51 Chung CG, Lee H, Lee SB. Mechanisms of protein toxicity in neurodegenerative diseases. *Cell. Mol. Life Sci.* 2018; 75: 3159-3180.
 - 52 Franceschi C, et al. Inflammaging and anti-inflammaging: A systemic perspective on aging and longevity emerged from studies in humans. *Mech. Ageing Dev.* 2007; 128: 92-105.

- 53 Niranjan R. Recent advances in the mechanisms of neuroinflammation and their roles in neurodegeneration. *Neurochem. Int.* 2018; 120: 13-20.
- 54 Cristani M, Speciale A, Saija A, et al. Circulating Advanced Oxidation Protein Products as Oxidative Stress Biomarkers and Progression Mediators in Pathological Conditions Related to Inflammation and Immune Dysregulation. *Curr. Med. Chem.* 2016; 23: 3862-3882.
- 55 Daniele S, Giacomelli C, Martini C. Brain ageing and neurodegenerative disease: The role of cellular waste management. *Biochem. Pharmacol.* 2018; 158: 207-216.
- 56 Gan L, Cookson MR, Petrucci L, La Spada AR. Converging pathways in neurodegeneration, from genetics to mechanisms. *Nat. Neurosci.* 2018; 21: 1300-1309.
- 57 Katsuno M, Sahashi K, Iguchi Y, Hashizume A. Preclinical progression of neurodegenerative diseases. *Nagoya J. Med. Sci.* 2018; 80: 289-298.
- 58 Gaugler J, James B, Johnson T, et al. Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's Dement.* 2016; 12: 459-509.
- 59 Bature F, Quinn BA, Pang D, Y. Pappas. Signs and symptoms preceding the diagnosis of Alzheimer's disease: A systematic scoping review of literature from 1937 to 2016. *BMJ Open.* 2017; 7.
- 60 Janoutová J, Šerý O, Hosák L, Janout V. Is mild cognitive impairment a precursor of Alzheimer's disease? Short review. *Cent. Eur. J. Public Health.* 2015; 23: 365-367.
- 61 Hadjichrysanthou C, McRae-McKee K, Evans S, et al. Potential factors associated with cognitive improvement of individuals diagnosed with mild cognitive impairment or dementia in longitudinal studies. *J. Alzheimer's Dis.* 2018; 66: 587-600.
- 62 Espinosa A, et al. A longitudinal follow-up of 550 mild cognitive impairment patients: Evidence for large conversion to dementia rates and detection of major risk factors involved. *J. Alzheimer's Dis.* 2013; 34: 769-780.
- 63 Cicero AFG, Fogacci F, Banach M. Botanicals and phytochemicals active on cognitive decline: The clinical evidence. *Pharmacol. Res.* 2018; 130: 204-212.
- 64 Haller S, Montandon ML, Rodriguez C, et al. Impact of coffee, wine, and chocolate consumption on cognitive outcome and MRI parameters in old age. *Nutrients.* 2018; 10: 1-13.
- 65 Pervin M, Unno K, Ohishi T, et al. Beneficial Effects of Green Tea Catechins on Neurodegenerative Diseases. *Molecules.* 2018; 23: 1-17.
- 66 Bell L, Lampert DJ, Butler LT, Williams CM. A review of the cognitive effects observed in humans following acute supplementation with flavonoids, and their associated mechanisms of action. *Nutrients.* 2015; 7: 10290-10306.
- 67 Radd-Vagenas S, Duffy SL, Naismith SL, et al. Effect of the Mediterranean diet on cognition and brain morphology and function: A systematic review of randomized controlled trials. *Am. J. Clin. Nutr.* 2018; 107: 389-404.
- 68 Roozbeh M, Kashef N, Ghazanfarpour R, et al. Overview of the Effect of Herbal Medicines and Isoflavones on the Treatment of Cognitive Function. *J. Menopausal Med.* 2018; 24: 113-118.
- 69 Yang G, Wang Y, Sun J, et al. *Ginkgo biloba* for Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Curr. Top. Med. Chem.* 2015; 16: 520-528.
- 70 Filosa S, Di Meo F, Crispi S. Polyphenols-gut microbiota interplay and brain neuromodulation. *Neural Regen. Res.* 2018; 13: 2055-2059.
- 71 Flanagan E, Müller M, Hornberger M, Vauzour D. Impact of Flavonoids on Cellular and Molecular Mechanisms Underlying Age-Related Cognitive Decline and Neurodegeneration. *Curr. Nutr. Rep.* 2018; 7: 49-57.
- 72 Espargaró A, et al. Combined *in vitro* Cell-Based/in Silico Screening of Naturally Occurring Flavonoids and Phenolic Compounds as Potential Anti-Alzheimer Drugs. *J. Nat. Prod.* 2017; 80: 278-289.
- 73 Amit T, Avramovich-Tirosh Y, Youdim MBH, Mandel S. Targeting multiple Alzheimer's disease etiologies with multimodal neuroprotective and neurorestorative iron chelators. *FASEB J.* 2008; 22: 1296-1305.
- 74 Rezai-Zadeh K, et al. Green tea epigallocatechin-3-gallate (EGCG) reduces β -amyloid mediated cognitive impairment and modulates tau pathology in Alzheimer transgenic mice. *Brain Res.* 2008; 1214: 177-187.
- 75 Li Q, et al. Long-term green tea catechin administration prevents spatial learning and memory impairment in senescence-accelerated mouse prone-8 mice by decreasing A β 1-42 oligomers and upregulating synaptic plasticity-related proteins in the hippocampus. *Neuroscience.* 2009; 163: 741-749.
- 76 Francis ST, Head K, Morris PG, Macdonald IA. The effect of flavanol-rich cocoa on the fMRI response to a cognitive task in healthy young people. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 2006; 47: (Suppl. 2): 215-220.
- 77 Sorond FA, Hurwitz S, Salat DH, et al. Neurovascular coupling, cerebral white matter integrity, and response to cocoa in older people. *Neurology.* 2013; 81: 904-909.

78. Ock KC, Chung SJ, Claycombe KJ, Song WO. Serum C-reactive protein concentrations are inversely associated with dietary flavonoid intake in U.S. adults. *J. Nutr.* 2008; 138: 753-760.
79. Karlsen A, et al. Anthocyanins inhibit nuclear factor- κ B activation in monocytes and reduce plasma concentrations of pro-inflammatory mediators in healthy adults. *J. Nutr.* 2007; 137: 1951-1954.
80. Freese R, Vaarala O, Turpeinen AM, Mutanen M. No difference in platelet activation of inflammation markers after diets rich of poor in vegetables, berries and apple in healthy subjects. *Eur. J. Nutr.* 2004; 43: 175-182.
81. Widlansky ME, et al. Effects of black tea consumption on plasma catechins and markers of oxidative stress and inflammation in patients with coronary artery disease. *Free Radic. Biol. Med.*, 2005; 38: 499-506.
82. Jabir NR, Khan FR, Tabrez S. Cholinesterase targeting by polyphenols: A therapeutic approach for the treatment of Alzheimer's disease. *CNS Neurosci. Ther.* 2018; 24: 753-762.
83. Schmatz R, et al. Resveratrol prevents memory deficits and the increase in acetylcholinesterase activity in streptozotocin-induced diabetic rats. *Eur. J. Pharmacol.* 2009; 610: 42-48.
84. Wang D, et al. Role of intestinal microbiota in the generation of polyphenol-derived phenolic acid mediated attenuation of Alzheimer's disease -amyloid oligomerization. *Mol. Nutr. Food Res.* 2015; 59: 1025-1040.
85. Heaton RKK, et al. Wisconsin Card Sorting Test Manual: Revised and expanded. *Psychological Reports*. 1993; 76: 623-626 (Online).
86. Auditory SM, Test VL. Auditory and Verbal Learning Test: A Handbook; Western Psychological Services: Los Angeles, CA, USA, 1996.
87. Sánchez-Cubillo I, et al. Construct validity of the Trail Making Test: Role of task-switching, working memory, inhibition/interference control, and visuomotor abilities. *J. Int. Neuropsychol. Soc.* 2009; 15: 438-450.
88. Rosen WG, Mohs RC, Davis KL. A new rating scale for Alzheimer's disease. *Am. J. Psychiatry*. 1984; 141: 1356-1364.
89. Folstein PR, Folstein MF, McHugh SE. Mini-mental state. A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J. Psychiatr. Res.* 1975; 12: 189-198.
90. Wechsler D. WAIS-III: Administration and scoring manual: adult intelligence scale. Psychological Corporation. 1997.
91. Hashiguchi M, Ohta Y, Shimizu M, et al. Meta-analysis of the efficacy and safety of *Ginkgo biloba* extract for the treatment of dementia. *J. Pharm. Heal. Care Sci.* 2015; 1.
92. Santos RF, Galduróz JCF, Barbieri A, et al. Cognitive performance, SPECT, and blood viscosity in elderly non-demented people using *Ginkgo biloba*. *Pharmacopsychiatry*. 2003; 36: 127-133.
93. Ude C, Schubert-Zsilavecz M, Wurglics M. *Ginkgo biloba* extracts: A review of the pharmacokinetics of the active ingredients. *Clin. Pharmacokinet.* 2013; 52: 727-749.
94. Marx W, et al. Effect of resveratrol supplementation on cognitive performance and mood in adults: A systematic literature review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Nutr. Rev.* 2018; 76: 432-443.
95. Cheng PF, et al. Do soy isoflavones improve cognitive function in postmenopausal women? A meta-analysis. *Menopause*. 2015; 22: 198-206.
96. Farzaei MH, Rahimi R, Nikfar S, Abdollahi M. Effect of resveratrol on cognitive and memory performance and mood: A meta-analysis of 225 patients. *Pharmacol. Res.* 2018; 128: 338-344.
97. Wang P, Sang S. Metabolism and pharmacokinetics of resveratrol and pterostilbene. *BioFactors*. 2018; 44: 16-25.
98. Evans HM, Howe PRC, Wong RHX. Effects of resveratrol on cognitive performance, mood and cerebrovascular function in post-menopausal women; a 14-week randomised placebo-controlled intervention trial. *Nutrients*. 2017; 9.
99. EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). Guidance on the scientific requirements for health claims related to functions of the nervous system, including psychological functions. *EFSA J.* 2012; 10: 1-13.
100. Mena P, Del Rio D. Gold Standards for Realistic (Poly)phenol Research. *J. Agric. Food Chem.* 2018; 66: 8221-8223.

MECCANISMI DI MALATTIA

INTERAZIONI TRA PCSK9 ED EMOSTASI

Interactions between PCSK9 and hemostasis

FRANCESCO PACIULLO, STEFANIA MOMI, PAOLO GRESELE

Dipartimento di Medicina, Sezione di Medicina Interna e Cardiovascolare, Università di Perugia

SUMMARY

Genetic and epidemiological studies confirm the causal role of low-density lipoproteins (LDL) in the pathogenesis of atherosclerotic cardiovascular disease. Therefore, the reduction of plasma levels of cholesterol contained in this lipoprotein fraction (LDL cholesterol) represents a therapeutic goal of fundamental importance in primary and secondary cardiovascular prevention. A significant step forward in lipid-lowering treatment was the introduction in clinical use of the inhibitors of proprotein convertase subtilisin/kexin 9 (PCSK9), the enzyme that promotes the intracellular degradation of the hepatic receptor for LDL (LDLR). Recent studies suggest that PCSK9 inhibitors, in addition to having a significant cholesterol-lowering action, are also able to exert anti-thrombotic effects. These effects seem, at least in part, to be due to the ability of PCSK9 to interact with some important mechanisms of hemostasis. The addition of recombinant PCSK9 to human platelets in vitro produced an enhancement of platelet reactivity to stimuli. In mice, the PCSK9 gene deletion produced a protective effect against venous and arterial thrombosis. A direct correlation was observed between plasma PCSK9 levels and platelet reactivity in patients with acute coronary syndromes, and between plasma levels of PCSK9 and urinary 11-dehydro-thromboxane B₂, an in vivo platelet activation marker in patients with atrial fibrillation. Finally, intervention studies suggest a possible protective action of PCSK9 inhibitors against venous thromboembolic events. This review aims to discuss the interactions between PCSK9 and the hemostatic system and to examine the current evidence on the potential anti-thrombotic effects of PCSK9 inhibition.

Keywords: PCSK9 inhibitors, antithrombotic effects, platelets, atherosclerosis.

PCSK9, metabolismo lipidico e rischio cardiovascolare

PCSK9 svolge un ruolo determinante nella regolazione del metabolismo lipoproteico (1, 2) principalmente modulan-

do l'espressione del recettore delle LDL (*low-density lipoprotein receptor, LDLR*) sulla superficie epatocitaria. In particolare, PCSK9 blocca LDLR nel complesso lisosomiale all'interno dell'epatocita e ne promuove la successiva degradazione autofagolisosomica, impedendo così il riciclo di LDLR alla superficie dell'epatocita stesso (1, 2). Questa attività di PCSK9 determina una ridotta disponibilità di LDLR sulla superficie epatocitaria generando così una ridotta rimozione delle LDL dal circolo con conseguente incremento dei

Indirizzo per la corrispondenza

Paolo Gresele, MD, PhD
Division of Internal and Cardiovascular Medicine
Department of Medicine and Surgery
University of Perugia
Strada Vicinale Via delle Corse, 06126 Perugia
E-mail: paolo.gresele@unipg.it

livelli plasmatici di colesterolo LDL (1,2). PCSK9 però non regola solo LDLR, ma è anche capace di modulare l'espressione di altri recettori che condividono analogie strutturali con LDLR, tra i quali *very low-density lipoprotein receptor* (VLDLR), CD36, e *LDL-related protein 1* (LRP-1) (3). La capacità di PCSK9 di ridurre l'espressione cellulare di questi recettori sembra essere determinante nella regolazione della clearance delle lipoproteine ricche in trigliceridi (3).

Alla luce di queste conoscenze, nell'ultimo decennio la ricerca lipidologica si è concentrata sullo sviluppo di molecole in grado di ridurre la colesterolemia LDL attraverso l'inibizione di PCSK9, arrivando allo sviluppo e all'approvazione per l'uso clinico degli anticorpi monoclonali inibitori di PCSK9 (4, 5). I risultati di studi clinici di fase III hanno infatti confermato l'efficacia e la sicurezza di due anticorpi monoclonali anti-PCSK9, evolocumab ed alirocumab. Tali farmaci hanno successivamente ricevuto l'approvazione da parte di Food and Drug Administration (FDA) ed European Medicines Agency (EMA) come farmaci per il trattamento dell'ipercolesterolemia e per la prevenzione cardiovascolare nelle forme gravi di ipercolesterolemia primitiva e nei pazienti con malattia vascolare atherosclerotica sintomatica che non riescono a raggiungere i livelli raccomandati di colesterolo LDL nonostante l'uso di terapia ipocolesterolemizzante convenzionale (6, 7).

Una meta-analisi di numerosi studi osservazionali ha mostrato un'associazione diretta significativa, ancorché modesta, tra i livelli plasmatici di PCSK9 e il rischio di eventi cardiovascolari futuri. Nello specifico, alti livelli di PCSK9 sono risultati essere associati ad un rischio del 23% più elevato di eventi cardiovascolari futuri rispetto a bassi livelli di PCSK9 (8). Il ruolo cruciale che ha PCSK9 nel regolare le

concentrazioni plasmatiche di colesterolo LDL è considerato il meccanismo principale che spiega l'associazione tra PCSK9 e rischio cardiovascolare. Tuttavia, negli ultimi anni sono emerse numerose osservazioni precliniche e cliniche che suggeriscono che i meccanismi attraverso cui PCSK9 interviene nella patogenesi del danno vascolare aterosclerotico possano coinvolgere anche mediatori diversi dai lipidi (9).

Una di queste può essere ritrovata in una recente meta-analisi di trials clinici randomizzati controllati che ha dimostrato che la riduzione del rischio di eventi cardiovascolari maggiori prodotta dal trattamento con inibitori di PCSK9 è più elevata rispetto a quella ottenuta con le statine a parità di riduzione del colesterolo LDL (OR 0,49 [IC 95%, 0,34-0,71] vs 0,61 [IC 95%, 0,58-0,65]) (10). Ciò ha fatto ipotizzare che gli inibitori di PCSK9 potessero esercitare un effetto favorevole sul rischio cardiovascolare con ulteriori meccanismi oltre la loro azione ipolipemizzante. Tra i possibili meccanismi colesterolo-indipendenti in grado di spiegare gli effetti protettivi degli inibitori di PCSK9 sul sistema cardiovascolare vi è una loro possibile azione sul sistema emostatico.

PCSK9: un potenziale mediatore della trombosi arteriosa e venosa

La trombosi rappresenta l'evoluzione patologica di un meccanismo naturale di difesa, l'emostasi, teso a garantire l'integrità del sistema circolatorio (11, 12). L'emostasi ha inizio nella sede di un danno vascolare con la vasocostrizione, prosegue con l'adesione e l'aggregazione piastrinica, si amplifica con l'attivazione della cascata coagulativa ed infine arriva alla stabilizzazione del trombo attraverso la generazione di fibrina e al suo consolidamento.

Quando il processo emostatico si estende al di là delle necessità fisiologiche ed arriva ad occludere il vaso nel quale si è innescato si produce la trombosi. La trombosi può coinvolgere sia il distretto venoso che quello arterioso, seppur con meccanismi parzialmente diversi dovuti alle differenti caratteristiche strutturali ed emoreologiche dei due distretti. In particolare, mentre le piastrine svolgono un ruolo primario nelle manifestazioni trombotiche del distretto arterioso, la fase plasmatica della coagulazione è di importanza centrale nella trombosi venosa, anche se esistono significative sovrapposizioni tra i due fenomeni (11, 12).

Il ruolo pro-trombotico del colesterolo LDL nel distretto arterioso è stato storicamente attribuito alla sua capacità di infiltrarsi nella parete arteriosa e di indurre disfunzione e danno endoteliale, promuovendo l'accumulo di cellule infiammatorie e la formazione e progressione della placca aterosclerotica (13). Tuttavia studi recenti suggeriscono che la capacità dei lipidi circolanti di indurre disfunzione e danno endoteliale può svolgere un ruolo pro-trombotico anche nel distretto venoso (12, 14). Inoltre, si è visto che alcune frazioni lipidiche plasmatiche sono capaci di interagire in maniera diretta con alcuni recettori delle piastrine influenzando la reattività di queste ultime (*Tabella 1*). In particolare, due recettori espressi sulle piastrine, CD36 e lectin-like oxidized LDL receptor-1 (LOX-1), sono in grado di legare i lipidi ossidati (15, 16), ed in particolare le LDL ossidate (ox-LDL), innescando una serie di reazioni a cascata che attivano il recettore piastrinico glicoproteina (GP) IIb/IIIa portando alla aggregazione piastrinica (*Figura 1*). Questa capacità delle ox-LDL contribuisce a spiegare come la rottura di placca, con la conseguente esposizione del suo nucleo lipidico ricco

Tabella I - Effetto di alcuni lipidi nella regolazione della funzione piastrinica.

Componente lipidica	Effetti sulla funzione piastrinica	Recettore piastrinico
Ox-LDL	Attivazione	CD-36; LOX-1
Fosfolipidi ossidati	Attivazione	TLR-2
Lp(a)	Attivazione	?
HDL	Inibizione	ApoER2; SRB1

di ox-LDL, scateni una violenta reazione di attivazione piastrinica e la trombosi. Anche la lipoproteina(a) [Lp(a)], una lipoproteina fortemente aterogena dal ruolo ancora in parte sconosciuto, può esercitare effetti pro-trombotici promuovendo l'attivazione piastrinica attraverso meccanismi ancora largamente sconosciuti ed inibendo il plasminogeno, quindi con un effetto anti-fibrinolitico (17). I meccanismi attraverso cui la Lp(a) facilita l'attivazione piastrinica si ipotizza possano essere sia diretti, anche se non è ancora stato identificato uno specifico recettore per la Lp(a) sulla superficie piastrinica, sia indiretti attraverso il legame dei fosfolipidi ossidati in essa contenuti al recettore piastrinico TLR-2 (18). A contrastare i meccanismi sopra descritti di facilitazione dell'attivazione piastrinica entrano in gioco le *high-density lipoproteins* (HDL) che, da un lato, inibiscono direttamente l'attivazione piastrinica legandosi ai recettori piastrinici ApoER2 e scavenger receptor class B type 1 (SRB1) e, dall'altro, promuovono l'efflusso di colesterolo dalla membrana piastrinica (19).

Recenti studi in modelli animali e nell'uomo suggeriscono che PCSK9 potrebbe stimolare l'emostasi primaria e secondaria facilitando così la trombosi arteriosa e venosa sia indirettamente, attraverso i suoi effetti sul metabolismo lipoproteico (aumento dei livelli circolanti di LDL ed Lp(a) e riduzione dei livelli circolanti di HDL),

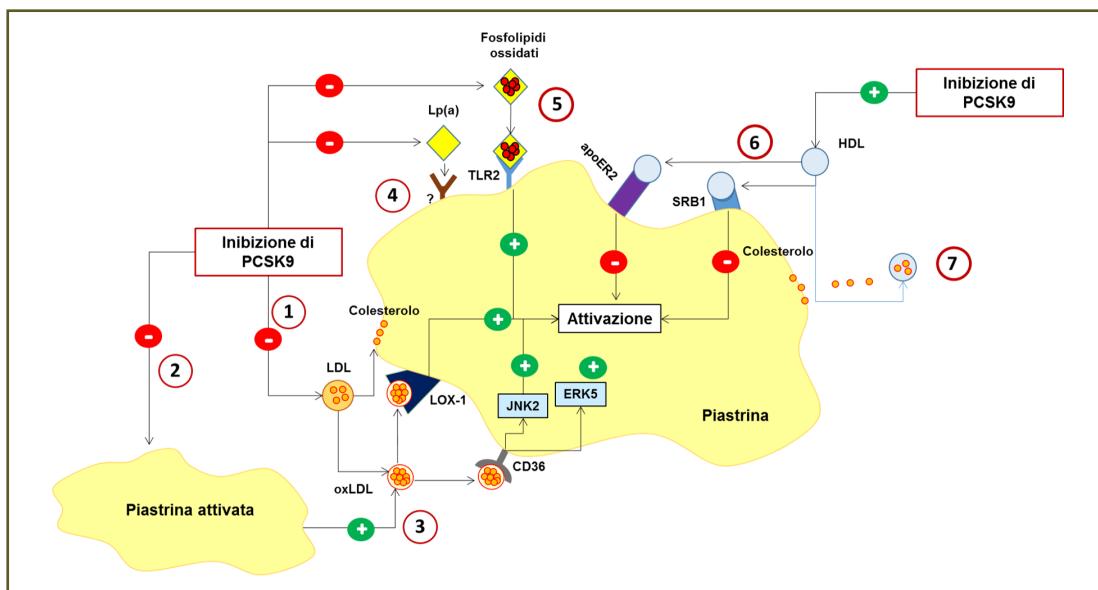


Figura 1 - Possibili effetti dell'inibizione di PCSK9 sull'attivazione piastrinica (1). L'inibizione di PCSK9, attraverso la sua azione ipocolessolemizzante, può determinare una riduzione del contenuto di colesterolo delle membrane piastriniche, limitando di conseguenza la reattività piastrinica (2). L'inibizione di PCSK9 può prevenire la capacità delle piastrine attivate di ossidare le LDL limitando così l'effetto stimolante delle ox-LDL sui recettori CD36 e LOX-1 delle piastrine (3). L'inibizione di PCSK9 riduce i livelli circolanti di Lp(a), il principale trasportatore di fosfolipidi ossidati, in questo modo attenuando la capacità di Lp(a) di facilitare l'attivazione piastrinica direttamente (4) o tramite il recettore dei fosfolipidi ossidati (TRL-2) (5). L'inibizione di PCSK9 aumenta i livelli circolanti di HDL che riducono l'attivazione piastrinica agendo sui recettori apoER2 e SRB1 (6) e facilita l'efflusso di colesterolo dalla membrana piastrinica riducendone la reattività (7).

sia direttamente influenzando la reattività piastrinica. Tali studi verranno dettagliatamente discussi nei prossimi paragrafi.

Studi in vitro e in modelli animali

La dimostrazione della rilevanza fisiopatologica di PCSK9 è stata ottenuta anche grazie ad osservazioni effettuate su topi resi geneticamente deficienti del gene di PCSK9, i quali mostrano una riduzione dei livelli plasmatici di colesterolo totale del 40% e di LDL circolanti dell'80% rispetto ai rispettivi topi esprimenti normalmente PCSK9 (wild-type) ed un aumento dell'espressione di LDL-R negli hepatociti (20-22). PCSK9 è prodotta principalmente, anche se non esclusivamente, a livello epi-

tico. In effetti, la selezione selettiva dell'espressione di PCSK9 a livello epatico determina una riduzione dei livelli circolanti di colesterolo del 27% rispetto ai topi di controllo, quindi inferiore a quella che si osserva nel modello animale "knock-out" (-42% di colesterolo totale), ad indicare che la secrezione extraepatica di PCSK9 svolge un ruolo nell'omeostasi del colesterolo (21).

In topi transgenici iperesprimenti la proteina PCSK9 umana si osservano al contrario elevati livelli circolanti di colesterolo LDL associati ad una riduzione di LDL-R negli hepatociti (23). Queste osservazioni ricalcano quanto osservato negli uomini con un aumento o una riduzione di PCSK9 geneticamente determinate e sug-

geriscono quindi che il modello murino è in grado di rispecchiare fedelmente i meccanismi fisiopatologici regolati da PCSK9. Nel modello murino sono state effettuate alcune interessanti osservazioni sulle interazioni tra PCSK9 e sistema emostatico. In un recente studio volto a valutare gli effetti di PCSK9 nella sepsi, si è visto che i topi iperesperimenti questa proteina sono caratterizzati da ipercoagulabilità, con un aumento del complesso trombina-antitrombina (TAT) e una riduzione della proteina C nel plasma, suggerendo un ruolo di PCSK9 nell'attivazione della coagulazione (24). In accordo con questa osservazione, un successivo studio condotto in topi PCSK9^{-/-} sottoposti a legatura parziale della vena cava inferiore ha mostrato che gli animali deficienti in PCSK9 sviluppano trombi significativamente più piccoli rispetto ai topi *wild type* (25). Nello stesso modello la P-selettina solubile circolante, un marcatore di attivazione piastrinica ed endoteliale (26, 27), aumentava significativamente nel topo *wild type* in seguito alla legatura della vena cava inferiore mentre nei topi PCSK9^{-/-} non si modificava (25), suggerendo che PCSK9 possa influenzare anche l'attivazione piastrinica. In effetti si è visto che i topi PCSK9^{-/-} sono protetti dalla trombosi arteriosa in un modello di danno dell'arteria carotide, un modello in cui la trombosi che si sviluppa è fortemente dipendente dalle piastrine. In questi topi si osservano trombi instabili e non occludenti il lume vascolare oltre ad una ridotta attivazione delle piastrine dimostrata da bassi livelli di espressione di GPIIb/IIIa attivata, P-selettina piastrinica e aggregati piastrine/leucociti (28). Recentemente è stata dimostrata la presenza di PCSK9 nei megacariociti, i precursori midollari delle piastrine (29), e in una frazione delle piastrine circolanti di soggetti sani. Questa frazione è significativamente

più alta nei pazienti con diabete mellito di tipo 2 e ancora maggiore nei diabetici con angina instabile, osservazioni che suggeriscono che l'espressione della proteina nelle piastrine sia regolata dalle condizioni infiammatorie. In questi ultimi pazienti si osserva una iperreattività delle piastrine, dimostrata dall'aumentata espressione di P-selettina, GPIIb/IIIa attivata e fattore tissutale (FT), che correla con l'aumentata espressione piastrinica di PCSK9, un ulteriore indizio che PCSK9 possa stimolare la reattività delle piastrine, in particolare in condizioni patologiche. In un lavoro successivo in pazienti con fibrillazione atriale è stato osservato che l'attivazione piastrinica *in vivo* ed *ex vivo* (valutata misurando aggregazione piastrinica, reclutamento piastrinico, formazione di trombossano B2 e livelli solubili di P-selettina) è significativamente maggiore in quei soggetti che presentano più elevate concentrazioni plasmatiche di PCSK9 (30). Inoltre l'incubazione con PCSK9 delle piastrine dei soggetti arruolati nello studio ne aumentava la reattività agli stimoli, un effetto bloccato dall'inibizione dei recettori CD36 e NOX2, suggerendo che PCSK9 attiva le piastrine interagendo con uno dei due recettori menzionati (30). È in effetti recentissima l'osservazione che PCSK9 è in grado di legarsi direttamente a CD36 piastrinico e, così facendo, di attivare le piastrine attraverso un meccanismo che coinvolge Src, ERK5 e JNK, vie di segnalazione a valle di CD36, cui fa seguito la generazione di TXA₂ mediata da p38MAPK e la conseguente attivazione di α IIb β 3 (31). Nello stesso lavoro si dimostra in un modello murino che l'attivazione di CD36 piastrinico da parte di PCSK9 ha un effetto trombotico favorendo l'infarto del miocardio (31).

LDL-R e LRP1 sono anche implicati nella regolazione dei livelli circolanti del FVIII della coagulazione (FVIII-c) contri-

buendo alla sua rimozione dal circolo. Il Fattore VIII è composto da una catena pesante e da una catena leggera, quest'ultima contenente il sito di legame per LRP1, sito normalmente coperto dal fattore di von Willebrand (VWF) (32). Pertanto, il FVIII circolante non legato al VWF, che rappresenta circa il 5% del totale, viene rapidamente riconosciuto da LRP1 epatico, rimosso dal circolo e successivamente degradato (33). La trombosi venosa è fortemente influenzata dai livelli di FVIII-c (34, 35) e la riduzione della trombosi indotta da legatura della vena cava osservata nel topo PCSK9^{-/-} potrebbe essere in parte dovuta da una riduzione dei livelli circolanti del fattore FVIII.

In effetti, nostre osservazioni preliminari dimostrano che alirocumab, uno degli anticorpi monoclonali anti PCSK9 utilizzati nell'uso clinico, riduce i livelli circolanti di FVIII aumentando simultaneamente l'espressione di LRP1 (36). Dal momento che elevati livelli di FVIII-c rappresentano un fattore di rischio cardiovascolare (37), si può ipotizzare che gli inibitori di PCSK9 esercitino un'attività protettiva contro gli eventi cardiovascolari non solo legata all'abbassamento del colesterolo, ma anche alla riduzione del FVIII-c (36, 38, 39).

Tabella 2 - Meccanismi pro-trombotici ipotizzabili di PCSK9.

Tessuti/cellule target	Possibile meccanismo	Possibile effetto dell'inibizione di PCSK9
Megacariociti	<ul style="list-style-type: none"> - Modulazione CD36 e LOX-1 - Regolazione efflusso del colesterolo 	<ul style="list-style-type: none"> - Generazione di piastrine meno reattive
Piastrine	<ul style="list-style-type: none"> - Modulazione dell'attivazione ox-LDL-mediata 	<ul style="list-style-type: none"> - Inibizione dell'attivazione piastrinica
Coagulazione	<ul style="list-style-type: none"> - Modulazione dei livelli circolanti di Lp(a) 	<ul style="list-style-type: none"> - Riduzione dei livelli di Lp(a)

Studi clinici

Numerosi studi clinici suggeriscono che PCSK9 eserciti un ruolo determinante nella patogenesi della trombosi arteriosa e venosa e che l'inibizione farmacologica di PCSK9 possa svolgere un effetto antitrombotico (*Tabella 2*).

A supportare il ruolo di PCSK9 come potenziale attivatore piastrinico nell'uomo vi sono i risultati di alcuni studi clinici osservazionali che hanno valutato l'associazione tra livelli plasmatici di PCSK9 e reattività piastrinica mettendoli in correlazione con il rischio cardiovascolare. Nello studio prospettico PCSK9-REACT condotto in pazienti con sindrome coronarica acuta sottoposti ad angioplastica e trattati con prasugrel o ticagrelor, è stata osservata una correlazione significativa tra i livelli circolanti di PCSK9 e la reattività piastrinica residua (40). Nello stesso studio inoltre elevati livelli circolanti di PCSK9 all'arruolamento erano in grado di predirne l'incidenza di eventi cardiovascolari maggiori al follow-up (40). In un secondo studio prospettico condotto in pazienti con fibrillazione atriale in trattamento con antagonisti della vitamina K è stata osservata un'associazione diretta significativa tra i livelli plasmatici di PCSK9 e l'incidenza di eventi cardiovascolari maggiori (41). In questo studio i livelli plasmatici di PCSK9 correlavano con i livelli urinari di 11-deidro-trombossano B2, un marcitore di attivazione piastrinica a sua volta associato ad un incremento del rischio di eventi cardiovascolari (42). Questi risultati suggeriscono che la relazione tra PCSK9 e il rischio cardiovascolare possa essere mediata in parte dall'iperreattività piastrinica indotta da PCSK9.

Per ciò che concerne il tromboembolismo venoso, i dati più significativi a favore di un ruolo di PCSK9 derivano da

una recentissima sotto-analisi degli studi FOURIER (Further Cardiovascular Outcomes Research with PCSK9 Inhibition in Subjects with Elevated Risk) e ODYSSEY OUTCOMES (Evaluation of Cardiovascular Outcomes After an Acute Coronary Syndrome During Treatment with Alirocumab) (43), i due studi clinici randomizzati e controllati che hanno valutato l'efficacia rispettivamente di evolocumab ed alirocumab nel ridurre gli eventi cardiovascolari nei pazienti con ipercolesterolemia non controllata dalle statine. Da questa analisi cumulativa emerge che la terapia con anti-PCSK9 si associa ad una riduzione del 31%, altamente significativa, dell'incidenza di tromboembolismo venoso (trombosi venosa profonda e/o embolia polmonare). Una possibile spiegazione di questo effetto suggerita dagli autori potrebbe essere la capacità di tali farmaci di ridurre i livelli circolanti di Lp(a). Infatti, la maggior riduzione del rischio di tromboembolismo venoso è stata osservata nei pazienti che presentavano all'arruolamento livelli plasmatici di Lp(a) più elevati e nei quali si è pertanto ottenuta la maggiore riduzione di Lp(a) con il trattamento. L'effetto favorente il tromboembolismo venoso della Lp(a) è suggerito da numerosi studi sperimentali e clinici. Una recente meta-analisi (10 studi con un totale di 13.542 pazienti) ha confermato che elevati livelli di Lp(a) si associano ad un incremento significativo dell'incidenza di tromboembolismo venoso (Rapporto di

Probabilità [OR]: 1,56, IC 95%: 1,36-1,79) (44). Queste osservazioni sono particolarmente interessanti se si considera che attualmente gli inibitori di PCSK9 sono una delle pochissime strategie farmacologiche capaci di ridurre i livelli circolanti di Lp(a) (45). Tuttavia, oltre al possibile ruolo della riduzione di Lp(a) indotta dagli inibitori di PCSK9 nel dimostrato effetto di inibizione del tromboembolismo venoso, non va dimenticato l'effetto potenziale di questi farmaci sui livelli circolanti di FVIII.

Considerazioni conclusive e prospettive future

Numerose evidenze suggeriscono che PCSK9 possa svolgere un ruolo importante nella patogenesi delle complicazioni trombotiche sia venose che arteriose indipendente dai suoi effetti sul metabolismo lipidico attraverso meccanismi che modulano l'emostasi primaria e secondaria sia indirettamente, attraverso gli effetti sul metabolismo lipoproteico, sia direttamente influenzando la reattività piastrinica e i livelli circolanti di FVIII. Pertanto, l'inibizione farmacologica di PCSK9 potrebbe risultare utile anche come profilassi anti-trombotica. Sono tuttavia necessari ulteriori studi per chiarire il ruolo che gli inibitori di PCSK9 possono avere nella prevenzione e nel trattamento della malattia arteriosa ischemica e nel tromboembolismo venoso.

RIASSUNTO

Studi genetici ed epidemiologici confermano il ruolo causale delle lipoproteine a bassa densità (*low-density lipoproteins, LDL*) nella patogenesi delle malattie cardiovascolari su base aterosclerotica. Pertanto, la riduzione dei livelli plasmatici del colesterolo contenuto in questa frazione lipoproteica (colesterolo LDL) rappresenta un obiettivo terapeutico di importanza fondamentale nella prevenzione cardiovascolare primaria e secondaria. Un significativo passo in avanti nel trattamento ipolipemizzante è stato l'introduzione nell'uso clinico degli inibitori della proproteina convertasi subtilixina/kexina 9 (*PCSK9*), l'enzima che promuove la degradazione intracellulare del recettore epatico per le LDL (*LDLR*).

Studi recenti suggeriscono che gli inibitori di PCSK9, oltre ad avere una significativa azione ipocolesterolemizzante, sono in grado di esercitare anche effetti anti-trombotici. Tali effetti sembrano, almeno in parte, riconducibili alla capacità di PCSK9 di interagire con alcuni importanti meccanismi dell'emostasi. L'aggiunta di PCSK9 ricombinante a piastrine umane in vitro ha prodotto un potenziamento della reattività piastrinica agli stimoli. Nel topo la delezione genica di *PCSK9* ha prodotto un effetto protettivo contro la trombosi venosa e arteriosa. È stata osservata una correlazione diretta tra i livelli plasmatici di PCSK9 e la reattività piastrinica nei pazienti con sindrome coronarica acuta, e tra i livelli plasmatici di PCSK9 e quelli di 11-deidro-trombossano B2 urinario, un marcitore di attivazione piastrinica in vivo nei pazienti con fibrillazione atriale. Infine studi di intervento suggeriscono una possibile azione protettiva degli inibitori di PCSK9 nei confronti di eventi tromboembolici venosi.

Questa rassegna si propone di discutere le interazioni tra PCSK9 e sistema emostatico e di esaminare le attuali evidenze sui potenziali effetti anti-trombotici dell'inibizione di PCSK9.

Parole chiave: *PCSK9 inibitori, effetti antitrombotici, piastrine, aterosclerosi.*

Bibliografia

1. Lagace TA. PCSK9 and LDLR degradation: regulatory mechanisms in circulation and in cells. *Curr Opin Lipidol.* 2014; 25: 387-393.
2. Lin XL, Xiao LL, Tang ZH, et al. Role of PCSK9 in lipid metabolism and atherosclerosis. *Biomed Pharmacother.* 2018; 104: 36-44.
3. Norata GD, Tavori H, Pirillo A, et al. Biology of proprotein convertase subtilisin kexin 9: beyond low-density lipoprotein cholesterol lowering. *Cardiovasc Res.* 2016; 112: 429-442.
4. Abifadel M, Varret M, Rabès JP, et al. Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat Genet.* 2003; 34: 154-156.
5. Kent ST, Rosenson RS, Avery CL, et al. PCSK9 loss-of-function variants, low-density lipoprotein cholesterol, and risk of coronary heart disease and stroke: data from 9 studies of blacks and whites. *Circ Cardiovasc Genet.* 2017; 10: e001632.
6. Sabatine MS, Giugliano RP, Keech AC, et al. FOURIER Steering Committee and Investigators. Evolocumab and clinical outcomes in patients with cardiovascular disease. *N Engl J Med.* 2017; 376: 1713-1722.
7. Navarese EP, Kolodziejczak M, Schulze V, et al. Effects of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 antibodies in adults with hypercholesterolemia: a systematic review and meta-analysis. *Ann Intern Med.* 2015; 163: 40-51.
8. Vlachopoulos C, Terentes-Printzios D, Georgopoulos G, et al. Prediction of cardiovascular events with levels of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9: A systematic review and meta-analysis. *Atherosclerosis.* 2016; 252: 50-60.
9. Cesaro A, Bianconi V, Gragnano F, et al. Beyond cholesterol metabolism: The pleiotropic effects of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9). Genetics, mutations, expression, and perspective for long-term inhibition. *Biofactors.* 2020; 46: 367-380.
10. Silverman MG, Ference BA, Im K, et al. Association Between Lowering LDL-C and Cardiovascular Risk Reduction Among Different Therapeutic Interventions: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA.* 2016; 316: 1289-1297.
11. Santos-Gallego CG, Picatoste B, Badimon JJ. Pathophysiology of acute coronary syndrome. *Curr Atheroscler Rep.* 2014; 16: 401-409.
12. Gresele P, Momi S, Migliacci R. Endothelium, venous thromboembolism and ischaemic cardiovascular events. *Thromb Haemost.* 2010; 103: 56-61.
13. Griffin JH, Fernández JA, Deguchi H. Plasma lipoproteins, hemostasis and thrombosis. *Thromb Haemost.* 2001; 86: 386-394.
14. Morelli VM, Lijfering WM, Bos MHA, et al. Lipid levels and risk of venous thrombosis: results from the MEGA-study. *Eur J Epidemiol.* 2017; 32: 669-681.
15. Chen K, Febbraio M, Li W, Silverstein RL. A specific CD36-dependent signaling pathway is required for platelet activation by oxidized low-density lipoprotein. *Circ Res.* 2008; 102: 1512-1519.
16. Hofmann A, Brunssen C, Morawietz H. Contribution of lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 and LOX-1 modulating compounds to vascular diseases. *Vascul Pharmacol.* 2017.
17. Riches K, Porter KE. Lipoprotein(a): cellular effects and molecular mechanisms. *Cholesterol.* 2012; 2012: 923289.
18. Biswas S, Xin L, Panigrahi S, et al. Novel phosphatidylethanolamine derivatives accumulate in circulation in hyperlipidemic ApoE-/- mice and activate platelets via TLR2. *Blood.* 2016; 127: 2618-2629.
19. Calkin AC, Drew BG, Ono A, et al. Reconstituted high-density lipoprotein attenuates platelet func-

- tion in individuals with type 2 diabetes mellitus by promoting cholesterol efflux. *Circulation.* 2009; 120: 2095-2104.
20. Rashid S, Curtis DE, Garuti R, et al. Decreased plasma cholesterol and hypersensitivity to statins in mice lacking Pcsk9. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005; 102: 5374-5379.
 21. Zaid A, Roubtsova A, Essalmani R, et al. Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9): hepatocyte-specific low-density lipoprotein receptor degradation and critical role in mouse liver regeneration. *Hepatology.* 2008; 48: 646-654.
 22. Lagace TA, Curtis DE, Garuti R, et al. Secreted PCSK9 decreases the number of LDL receptors in hepatocytes and in livers of parabiotic mice. *J Clin Invest.* 2006; 116: 2995-3005.
 23. Machlus KR, Lin FC, Wolberg AS. Procoagulant activity induced by vascular injury determines contribution of elevated factor VIII to thrombosis and thrombus stability in mice. *Blood.* 2011; 118: 3960-3968.
 24. Dwivedi DJ, Grin PM, Khan M, et al. Differential expression of PCSK9 modulates infection, inflammation, and coagulation in a murine model of sepsis. *Shock.* 2016; 46: 672-680.
 25. Wang Q, Wang J, Guo C, Kleiman K, et al. Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) deficiency is protective against venous thromboembolism in mice. *Sci Rep.* 2017; 7: 14360.
 26. Falcinelli E, Francisci D, Belfiori B, et al. In vivo platelet activation and platelet hyperreactivity in abacavir-treated HIV-infected patients. *Thromb Haemost.* 2013; 110: 349-357.
 27. Migliacci R, Becattini C, Pesavento R, et al. Endothelial dysfunction in patients with spontaneous venous thromboembolism. *Haematologica.* 2007; 92: 812-818.
 28. Camera, Rossetti L, Barbieri S, et al. PCSK9 as a Positive Modulator of Platelet Activation *J Am Coll Cardiol.* 2018; 71: 952-954.
 29. Rossetti L, Ferri N, Marchiano S, et al. PCSK9 beyond its role in cholesterol homeostasis: co-activator of platelet function. *Eur Heart J.* 2017; 38: 446-447.
 30. Cammisotto V, Pastori D, Nocella C, et al. PCSK9 Regulates Nox2-Mediated Platelet Activation via CD36 Receptor in Patients with Atrial Fibrillation. *Antioxidants (Basel).* 2020; 9: 296.
 31. Qi Z, Hu L, Zhang J, et al. PCSK9 Enhances Platelet Activation, Thrombosis, and Myocardial Infarct Expansion by Binding to Platelet CD36. *Circulation.* 2020 Sep 29.
 32. Lenting PJ, Neels JG, van Den Berg BM, et al. The light chain of factor VIII comprises a binding site for low density lipoprotein receptor-related protein *J Biol Chem.* 1999; 274: 23734-23739.
 33. Saenko EL, Yakhyaev AV, Mikhailenko I, et al. Role of the low density lipoprotein-related protein receptor in mediation of factor VIII catabolism. *J Biol Chem.* 1999; 274: 37685-37692.
 34. Emmerechts J, Vanassche T, Loyen S, et al. Partial versus complete factor VIII inhibition in a mouse model of venous thrombosis. *Thromb Res.* 2012; 129: 514-519.
 35. Golder M, Mewburn J, Lillicrap D. In vitro and in vivo evaluation of the effect of elevated factor VIII on the thrombogenic process. *Thromb Haemost.* 2013; 109: 53-60.
 36. Paciullo F, Falcinelli E, Petito E, et al. Pleiotropic effects of PCSK9-inhibition on hemostasis: anti-PCSK9 inhibitors reduce FVIII levels by enhancing LRP1 expression. *Blood Transfus.* 2020; (Suppl.): XXVI SISET Congress - Abstract Book.
 37. Samuelson Bannow B, Recht M, Negrer C, et al. Factor VIII: Long-established role in haemophilia A and emerging evidence beyond haemostasis. *Blood Rev.* 2019; 35: 43-50.
 38. Paciullo F, Gresèle P. Effect of statins on measures of coagulation: potential role of low-density lipoprotein receptors. *Eur Heart J.* 2019; 40: 392.
 39. Paciullo F, Falcinelli E, Petito E, et al. Pleiotropic Effects of PCSK9-inhibition on Hemostasis: Anti-PCSK9 Reduce FVIII Levels by Enhancing LRP1 Expression. *ISTH 2020 Congress.* ABSTRACT NUMBER: PB0346.
 40. Navarese EP, Kolodziejczak M, Winter MP, et al. Association of PCSK9 with platelet reactivity in patients with acute coronary syndrome treated with prasugrel or ticagrelor: the PCSK9-REACT study. *Int J Cardiol.* 2017; 227: 644-649.
 41. Pastori D, Nocella C, Farcomeni A, et al. ATHERO-AF Study Group. Relationship of PCSK9 and Urinary Thromboxane Excretion to Cardiovascular Events in Patients with Atrial Fibrillation. *J Am Coll Cardiol.* 2017; 70: 1455-1462.
 42. Pastori D, Pignatelli P, Farcomeni A, et al. Urinary 11-dehydro-thromboxane B2 is associated with cardiovascular events and mortality in patients with atrial fibrillation. *Am Heart J.* 2015; 170: 490-497.
 43. Marston NA, Gurmu Y, Melloni GEM, et al. The Effect of PCSK9 (Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9) Inhibition on the Risk of Venous Thromboembolism. *Circulation.* 2020; 141: 1600-1607.
 44. Dentali F, Gessi V, Marcucci R, et al. Lipoprotein(a) as a Risk Factor for Venous Thromboembolism: A Systematic Review and Meta-analysis of the Literature. *Semin Thromb Hemost.* 2017; 43: 614-620.
 45. O'Donoghue ML, Fazio S, Giugliano RP, et al. Lipoprotein(a), PCSK9 Inhibition, and Cardiovascular Risk. *Circulation.* 2019; 139: 1483-1492.

FATTORI DI PROTEZIONE

IPERALFALIPOPROTEINEMIA E OLTRE: LE HDL SONO PROTETTIVE?

Hyperalphalipoproteinemia and beyond: are HDLs protective?

**ANTONINA GIAMMANCO, ANGELO BALDASSARE CEFALÙ,
DAVIDE NOTO, MAURIZIO AVERNA**

Dipartimento di Promozione della Salute, Materno-Infantile, di Medicina Interna e Specialistica di Eccellenza "G. D'Alessandro" (ProMISE), Università degli Studi di Palermo

SUMMARY

Hyperalphalipoproteinemia (HALP) is a lipid disorder characterized by elevated plasma high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) levels above the 90th percentile of the distribution of HDL-C values in the general population (1). Primary forms of HALP include mutations in the genes coding for cholesteryl ester transfer protein (*CETP*), hepatic lipase (*LIPC*) and apolipoprotein C-3 (*APOC3*) (1). Secondary non-genetic factors such as drugs (i.e. oral estrogens, thiazides, corticosteroids), pregnancy, alcohol intake, kidney diseases (i.e. nephrotic syndrome), liver disease (i.e. primary biliary cirrhosis) might induce HDL increase (2). The pathogenic mechanisms of secondary HALP are not well characterized yet and it's still unknown if an increased production or a reduced catabolism of HDL are the cause of this lipid condition (3). Furthermore, there is evidence that HDL-C is inversely correlated with cardiovascular risk (CV) but recent studies have shown that in patients at high CV risk the HDL-C atheroprotective effect is still controversial. In this review we will first describe the physiological properties of HDLs; we will briefly focus on the primary and secondary forms of HALP and finally we will appraise the evidence for a role of HDL-C in cardiovascular diseases and strategies which might improve HDL metabolism and function.

Key words: *HALP, HDL-C, cardiovascular risk, Mendelian randomization studies, GWAS.*

Introduzione

L'iperalfalipoproteinemia (HALP) è un disordine eterogeneo del metabolismo lipoproteico caratterizzato da livelli plasmatici di colesterolo HDL (HDL-C) >90° percentile della distribuzione nella popolazione generale (1) associata o meno ad evidenti manifestazioni cliniche ed alla predisposizione ad atherosclerosi coronari-

Indirizzo per la corrispondenza

Antonina Giammanco, MD, PhD
Dipartimento di Promozione della Salute,
Materno-Infantile, di Medicina Interna
e Specialistica di Eccellenza "G. D'Alessandro"
(ProMISE), Università degli Studi di Palermo
E-mail: agiamman@gmail.com

ca prematura (4). I livelli plasmatici di colesterolo totale possono essere aumentati, mentre quelli di VLDL e colesterolo LDL sono nel range di normalità o ridotti. Per livelli di HDL-C >80 e <100 mg/dl la HALP è classificata come moderata e per livelli di HDL-C >100 mg/dl come severa (5). Le forme primitive di HALP hanno una trasmissione autosomica co-dominante e sono causate da mutazioni in geni candidati noti oppure in altri geni non identificati (HALP primitiva "orfana"). Cause note di HALP primitiva includono mutazioni nei geni codificanti per la proteina di trasferimento degli esteri del colesterolo (*CETP*), per la lipasi epatica (*LIPC*) e per l'apolipoproteina C3 (*APOC3*) (1). Le forme monogeniche, tuttavia, spiegano solo il 40-60% di HALP (6). Fattori non genetici, quali stile di vita (attività fisica, alimentazione, abitudine all'alcol ed al fumo di sigaretta), gravidanza, farmaci, malattie epatiche e renali, possono influenzare il metabolismo delle HDL (7). Di tali forme secondarie di HALP tuttavia i meccanismi patogenetici non sono ancora ben caratterizzati ed è ancora poco chiaro se alla base di questo disordine lipidico vi sia un'aumentata produzione oppure un ridotto catabolismo delle HDL (3). All'espressione fenotipica sia delle forme primitive che secondarie di HALP potrebbe contribuire l'effetto poligenico di varianti identificate con studi GWAS (8).

Ampi studi prospettici sono tutti in accordo nel sottolineare che la concentrazione plasmatica di HDL-C sia significativamente ed inversamente correlata all'incidenza di malattia coronarica (9, 10). Tuttavia, studi di randomizzazione mendeliana hanno dimostrato che bassi livelli di HDL-C geneticamente determinati non sono associati ad aumentato rischio CV suggerendo che bassi livelli di HDL-C non sono, di per sé, un fattore causale di ma-

lattia cardiovascolare su base aterosclerotica (10, 11). Inoltre, studi epidemiologici suggerirebbero una curva di associazione a U tra livelli di HDL-C ed eventi cardiovascolari, sottolineando che livelli molto elevati di HDL-C sono associati ad un rischio CV aumentato, correlato probabilmente ad alterazioni qualitative delle HDL che le renderebbero disfunzionali (12, 13). In questo senso vanno i recenti dati di randomizzazione mendeliana che indicano che alcune caratteristiche qualitative delle HDL (dimensioni, distribuzione delle particelle e contenuto di colesterolo) sono associate al rischio di CAD ma non i livelli (14). Molto rilevante sembra anche la funzione delle HDL nel trasporto inverso del colesterolo (RCT) (15), il processo per cui il colesterolo in eccesso è rimosso dai tessuti periferici, inclusa la parete vascolare, e trasportato al fegato per l'escrezione. Accanto alla loro maggiore funzione nel

Elenco degli argomenti trattati

- L'ipertalipoproteinemia (HALP) è un disordine eterogeneo del metabolismo lipidico caratterizzato da livelli plasmatici di colesterolo HDL (HDL-C) >90° percentile della distribuzione nella popolazione generale, associata o meno ad evidenti manifestazioni cliniche e alla predisposizione ad aterosclerosi coronarica prematura.
- Esistono forme primitive monogeniche di HALP e forme secondarie. Recentemente, studi GWAS hanno suggerito una correlazione tra livelli plasmatici di HDL ed un'eredità poligenica, che potrebbe contribuire a livelli plasmatici estremamente alti di HDL.
- Il meccanismo patogenetico dell'HALP secondaria non è ancora ben chiaro.
- Vi è evidenza che il colesterolo HDL sia inversamente correlato al rischio cardiovascolare, ma studi recenti hanno mostrato controversie sull'effetto cardioprotettivo.
- Farmaci che aumentano i livelli di HDL-C, tra cui la niacina e gli inibitori di CETP, si sono rivelati fallimentari nella riduzione del rischio CV.

RCT, le HDL svolgono una serie di azioni antinfiammatorie che possono prevenire la disfunzione endoteliale (16), che è considerata una dei principali eventi nell'aterogenesi (17).

Tuttavia, al fine di valutare la relazione tra HDL e rischio CV nella HALP sono necessarie ulteriori studi sulla funzione delle HDL.

La complessità del metabolismo delle HDL rappresenta ancora una sfida e l'ulteriore acquisizione di conoscenze potrà incentivare lo sviluppo di nuovi farmaci capaci di modificare i livelli plasmatici di HDL e modificare il rischio CV.

Fisiologia e proprietà delle HDL

Nel corso degli ultimi anni sono stati fatti importanti progressi nella conoscenza della struttura, delle funzioni e del metabolismo delle HDL. Le HDL sono caratterizzate da un'eterogenea sotto-popolazione di particelle lipoproteiche, che vanno incontro a processi di rimodellamento e di trasformazione attraverso diversi enzimi plasmatici e fattori di trascrizione. Le HDL sono composte da proteine (apolipoproteine) e lipidi, inclusi fosfolipidi, colesterolo libero ed esteri del colesterolo, organizzati in micelle sferiche (18). Le HDL sono divise principalmente in due sottofrazioni maggiori: HDL₂, larghe e ricche di lipidi, e HDL₃, piccole e ricche in proteine (18). Le principali apolipoproteine associate alle HDL sono l'apolipoproteina AI (apoA-I), costituita da 243 aminoacidi (18) rappresenta la principale apolipoproteina strutturale delle HDL, e l'apoA-II, composta da 154 aminoacidi (18). La biogenesi delle HDL inizia nel fegato e nell'intestino attraverso la secrezione di ApoA-I, povera di lipidi, che successivamente interagisce con il trasportatore ABCA1 sulla superficie degli epatociti e degli enterociti acquisendo progressivamente fosfolipidi (FL) e colesterolo libero (CL) dalle cellule. In questo processo, l'apoA-I lipidata è gradualmente convertita in particelle discoidali nascenti (prebeta HDL) composte da colesterolo non esterificato, che va incontro ad esterificazione tramite l'enzima lecitin/colesterolo aciltransferasi (LCAT). Alla fine, le HDL prebeta sono convertite in particelle HDL sferoidali caratterizzate da un core di esteri di colesterolo contenente ApoA-I o ApoE o ApoA-IV (Figura 1). Le particelle di HDL sono coinvolte nel meccanismo di RCT, in cui il colesterolo acquisito dalle HDL mature è trasferito alle lipoproteine contenenti apoB tramite la proteina CETP, per essere successiva-

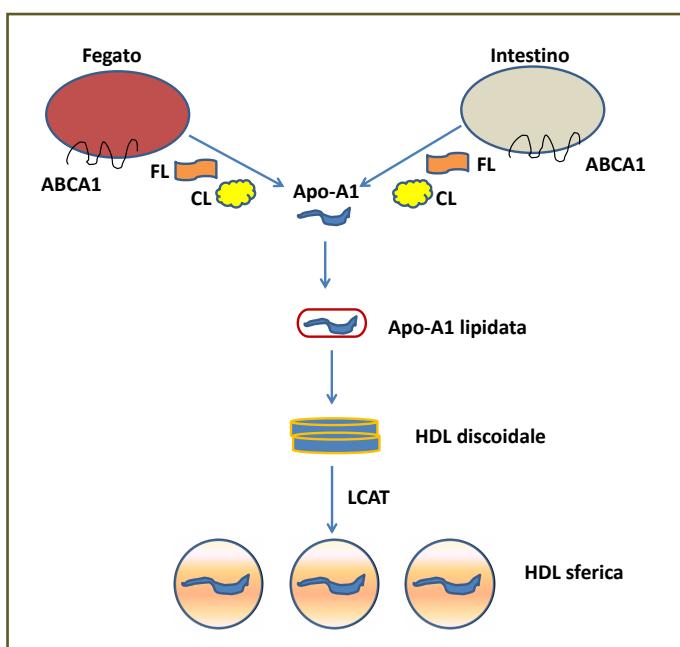


Figura 1 - Rappresentazione schematica della biogenesi delle HDL. La prima tappa della biogenesi comincia con la secrezione di Apo-A1 dal fegato e dall'intestino. L'Apo-A1 povera di lipidi interagisce con ABCA1 e progressivamente acquisisce fosfolipidi (FL) e colesterolo libero (CL) dalle cellule. L'ApoA-I lipidata è gradualmente convertita in particelle discoidali composte da colesterolo non esterificato. Infine, l'enzima lecithin-cholesterol acyltransferase (LCAT) esterifica il CL e le HDL discoidali vengono convertite in particelle HDL sferiche contenenti Apo-A1 o Apo-E o Apo-A4. Adattata da Zannis V.I. et al. *HDL Biogenesis, remodeling and catabolism*. *Handbook of Experimental Pharmacology* (2015); 224(I):53-111.

mente captata dal fegato attraverso il recettore delle LDL (19). Attraverso questo meccanismo le HDL esplicano il loro ruolo anti-aterosclerotico, agendo anche come antiossidanti, antinfiammatorie ed antitrombotiche, grazie alle proteine cargo (20). Nel RCT, l'apoA-I acquisisce il carico di colesterolo proveniente dai macrofagi attraverso ABCA1 (ATP-binding cassette transporter member-1). Le HDL diventano mature acquisendo colesterolo dalle cellule schiumose in un processo mediato dal trasportatore ABCG1. Il colesterolo libero è poi esterificato dalla LCAT che contribuisce a costituire le HDL mature e sferiche caratterizzate da un core di esteri di colesterolo (21). Infine, le HDL vengono captate dal fegato tramite SR-B1 (Scavenger receptor class B type-1), che rimuove selettivamente il colesterolo dalle lipoproteine senza alcuna degradazione delle particelle di HDL (22). Alla fine del processo i remnants di fosfolipidi e proteine possono essere ritrovati nel fegato (21) (*Figura 2*). È stato dimostrato che la capacità di efflusso del colesterolo HDL è inversamente correlato alle malattie cardiovascolari aterosclerotiche (22-25), grazie anche al ruolo delle HDL nell'inibizione dell'ossidazione delle LDL e della trombosi. È stata inoltre dimostrata la capacità delle HDL di ridurre la crescita delle lesioni aterosclerotiche (26).

Figura 2 - Rappresentazione schematica del meccanismo di trasporto inverso del colesterolo (RCT). Nel processo di RCT, l'ApoA-I riceve il colesterolo dalle cellule schiumose (macrofagi) attraverso il trasportatore ATP-binding cassette transporter member 1 (ABCA1), che induce le HDL a diventare mature con un meccanismo mediato dal trasportatore ABCG1. L'enzima Lecitin:Cholesterol Acyl-Transferase (LCAT) esterifica il colesterolo libero (CL) contribuendo così a formare HDL sferiche e mature, costituite da un core di esteri di colesterolo (CE). Le HDL mature si legano al recettore scavenger receptor class B type-1 (SR-B1) nel fegato e vengono rimosse selettivamente dal circolo ematico.

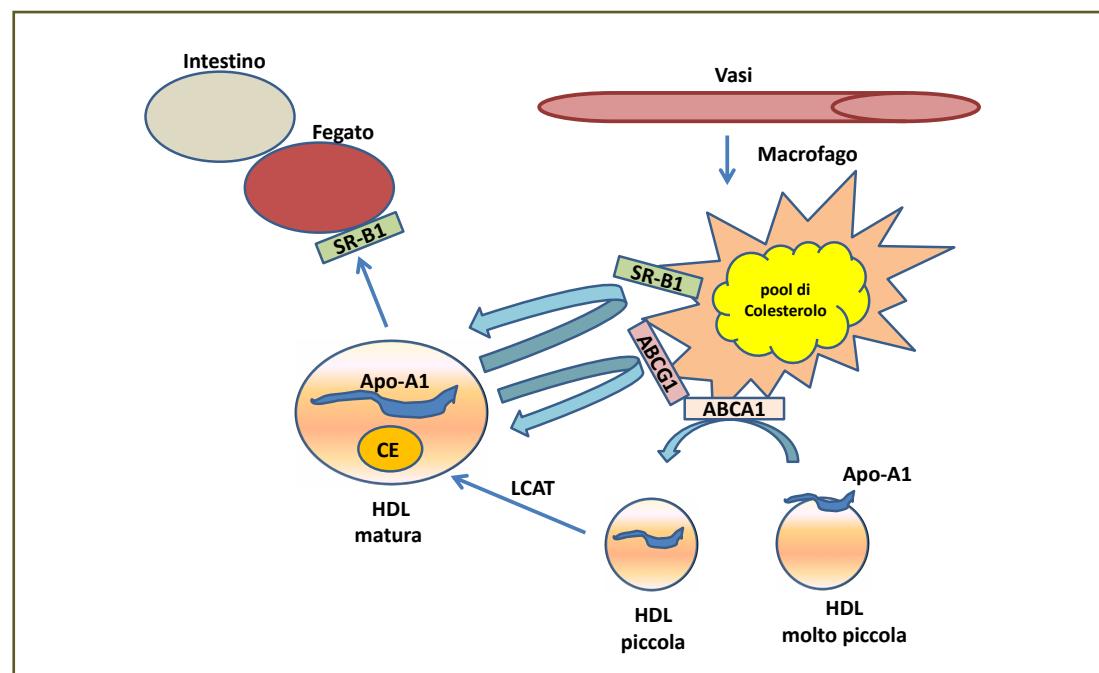


Figura 2 - Rappresentazione schematica del meccanismo di trasporto inverso del colesterolo (RCT). Nel processo di RCT, l'ApoA-I riceve il colesterolo dalle cellule schiumose (macrofagi) attraverso il trasportatore ATP-binding cassette transporter member 1 (ABCA1), che induce le HDL a diventare mature con un meccanismo mediato dal trasportatore ABCG1. L'enzima Lecitin:Cholesterol Acyl-Transferase (LCAT) esterifica il colesterolo libero (CL) contribuendo così a formare HDL sferiche e mature, costituite da un core di esteri di colesterolo (CE). Le HDL mature si legano al recettore scavenger receptor class B type-1 (SR-B1) nel fegato e vengono rimosse selettivamente dal circolo ematico.

Adattata da Brewer H.B.Jr et al. Metabolismo delle lipoproteine ad alta densità (cap.IV): Ballantyne C.M. Mechanismi di base in Clinical Lipidology II Ed. A Companion to Braunwald's Heart Disease – Edizione Italiana a cura di Catapano AL, Manzato E., Averna M.

tre documentata una funzione delle HDL nel regolare il metabolismo del glucosio (26), nella promozione della riparazione endoteliale e dell'angiogenesi (25). Rimane ancora poco chiaro quale componente o sotto-frazione delle HDL eserciti queste funzioni dal momento che le HDL includono parecchie sottopopolazioni di particelle che sono continuamente modificate da diversi fattori metabolici (25) ed è stato difficile finora determinarne le specifiche particelle di HDL coinvolte (25).

Cause secondarie di HALP

Stile di vita

Consumo di alcol: i livelli plasmatici di HDL aumentano per inibizione di CETP (27); il consumo moderato di alcol (40 g/die), indipendentemente dal tipo di bevanda, stimola il RCT e la esterificazione di colesterolo nel plasma (27). Non è chiaro se l'incremento di HDL-C associato al consumo di alcol sia cardioprotettivo (27).

Attività fisica: è associata ad aumentati livelli plasmatici di HDL-C, in quanto aumenta l'attività di LPL e LCAT e riduce quella di HL e CETP, componenti del RCT (28)

Perdita di peso: una metanalisi ha mostrato che i livelli di HDL-C aumentano di 0,35 mg/dl /kg soprattutto in condizioni di riduzione ponderale stabile (28).

Fattori dietetici: una dieta ricca di acidi grassi omega 3 - acido eicosapentenoico (EPA) e l'acido docosahexaenoico (DHA) - può aumentare i livelli plasmatici di HDL-C del 1-3% (29).

Fattori genere-dipendenti

Donne ed estrogeni: gli estrogeni agiscono nel fegato aumentando la sintesi di ApoAI e riducendo l'attività di LPL (che è coinvolta nel catabolismo delle HDL) e di conseguenza potenzia la prima tappa della biogenesi delle HDL (2).

Altre condizioni

Gravidanza: durante la gravidanza, soprattutto durante il secondo e terzo trimestre, il profilo lipidico - colesterolo totale, HDL-C, trigliceridi, LDL-C) e la lipoproteina (a) - tende ad aumentare per promuovere l'accumulo di depositi lipidici da mobilizzare successivamente come riserva energetica (2). L'attività di CETP è aumentata nel corso dell'ultimo trimestre e si correla con l'aumento di HDL-C e trigliceridi (2). L'attività di LPL è ridotta e determina sia un incremento di VLDL che dell'esposizione a CETP (2).

Malattie epatiche e renali: l'HALP secondaria può svilupparsi in condizioni di malattia epatica (come cirrosi biliare primitiva) e glomerulonefrite cronica con sindrome nefritica. Il fegato ed il rene rappresentano i siti principali per il catabolismo delle HDL (30); nel rene, in condizioni fisiologiche, le HDL sono riassorbite attraverso i recettori della cubilina nei tubuli prossimali. Quando entrambi questi tessuti hanno una funzione compromessa, le HDL si accumulano nel circolo ematico e non possono essere catabolizzate (30).

Farmaci: farmaci antinfiammatori (FANS, corticosteroidi, DMARDs come metotrexate o sulfasalazina), somministrazione di contraccettivi a lungo termine e ipolipemizzanti (statine, fibrati) aumentano sia la quantità che la funzione delle HDL. I corticosteroidi inducono la secrezione di HDL nascenti aumentando l'espressione del gene APOA-I negli hepatociti ed inibendo l'attività di CETP (31). I contraccettivi ormonali basati su estrogeni aumentano le HDL (32); questo effetto è antagonizzato da farmaci a base di progestinici (come levonorgestrel), che esercitano una proprietà androgenetica riducendo la sintesi di ApoAI ed aumentando l'attività di LPL. D'altra parte, il clormadinone acetato, un

progestinico con proprietà anti-androge- netiche, aumenta il rapporto HDL/LDL e non antagonizza l'effetto estrogenico sul metabolismo lipidico (32).

Cause primitive di HALP

L'epidemiologia genetica dell'HALP è per lo più basata su studi eseguiti in Giap- pone, un Paese con la più alta prevalenza di HALP primitiva monogenica causata da mutazioni del gene *CETP* (deficit di CETP). Infatti, questo disordine monoge- nico è responsabile di HALP moderata e severa rispettivamente nel 60% e 31%, (3). Il deficit di CETP è molto meno frequente nelle popolazioni caucasiche (33). Molto meno frequentemente la HALP monoge- nica è causata da mutazioni del gene *LIPC* (deficit di lipasi epatica) (34) e del gene *APOC3* (deficit di ApoC3) (35). La Tabella 1 riassume le caratteristiche biochimiche e l'effetto sulla malattia cardiovascolare delle principali forme monogeniche di HALP.

Altri geni possono essere coinvolti nella patogenesi di HALP moderata/severa monogenica. Tra questi emergono nuovi geni candidati (*SR-BI* e *LIPG*) (1).

Cause poligeniche di ipéralipoproteinemia

Studi di Genome Wide Association Studies - GWAS- hanno suggerito un contributo poligenico sui livelli plasmatici di HDL e (8). Thompson e coll. hanno studiato il contributo sui livelli di HDL di 9 polimor- fismi del gene *CETP* in 2.553 soggetti caucasici e afro-americani (36). Considerato l'effetto cumulativo di ogni variante sui livelli di HDL-C, l'incremento stimato dei livelli di HDL-C è di circa il 30%, e non sufficiente a spiegare gli elevati livelli di HDL osservati nell'HALP (36). Queste ed altre osservazioni hanno suggerito che altri geni possono essere coinvolti nella patogenesi dell'HALP. Boes e coll. hanno analizzato i geni candidati coinvolti nel metabolismo delle HDL (37) ed indicato *CETP*, *LPL*, *ABCA1* ed il cluster *APOA-1C3A4A5* come i più rappresentativi insieme a *GALNT2* (2). In aggiunta, altri geni (*LIPC*, *LCAT*, *APOA1*, *APOC3*, *APOA4*, *APOE*, *SR-B1* e *PON1*) sono stati studiati da Weissglass-Volkov et al. ed è stato riportato che modulano il metabolismo del colesterolo HDL (38). Polimorfismi nel promotore del gene *LIPC* agiscono

Tabella I - Caratteristiche biochimiche ed effetto sulla malattia cardiovascolare delle principali forme monogeniche di HALP.

Difetto genico	HDL-C	LDL-C	Sottoclassi di HDL	ApoA-I, Apo-C3, Apo-E	Apo-B	Attività enzimatica	Malattia cardiovascolare	Rif. bibliografico
CETP	↑↑↑↑	↓↓	HDL grandi ↑preβ-HDL	↑↑	Normale o ↓	Assente/ridotta	Effetto neutro	Matsuura F et al. J Clin Invest 2006; 116: 1435-1442
LIPC	↑↑	-	HDL grandi ↑remnants	-	-	Assente/ridotta	↑	Hegele RA et al. Biochem Biophys Res Commun 1991; 179: 78-84
APO-C3	↑↑	-	-	-	-	Assente/ridotta	-	von Eckardstein A et al. J Clin Invest 1991; 87: 1724-1731

CETP: gene codificante per la proteina di trasferimento degli esteri di colesterolo; LIPC: gene codificante per la lipasi epatica; APOC3: gene codificante per l'apolipoproteina C3; HDL-C: colesterolo HDL; LDL-C: colesterolo LDL; Apo-A1: Apolipoproteina A1; Apo-B: Apolipoproteina B; Apo-C3: Apolipoproteina C3; Apo-E: Apolipoproteina E.

come modificatori dei livelli di HDL-C, inducendo un modesto incremento di HDL. Inoltre, Aouizerat BE e coll. hanno considerato il contributo del gene *PLTP* sui livelli plasmatici di HDL (39). Oates C. et al. hanno identificato nuovi polimorfismi in 8 geni candidati non riportati in precedenza per essere associati al metabolismo delle HDL. Questi geni sono: *UGT1A3*, *PLLP*, *PLEKHH1*, *ANK2*, *DIS3L*, *ACACB* e *LRP4* (40). Diversi polimorfismi del gene *CETP* e di *TaqIB* (che rappresenta un polimorfismo del primo introne del gene *CETP*) sono stati identificati ed associati a livelli plasmatici elevati di HDL, così come una ridotta attività di CETP è stata individuata in studi effettuati su popolazioni (41). Non è ancora ben chiaro in che modo *TaqIB* possa influenzare l'espressione di *CETP* (2). Un'altra metanalisi ha mostrato che tre genotipi di *CETP* (*TaqIB*, I405V, -629C>A) correlano con una lieve riduzione dell'attività di CETP, un minimo incremento di HDL ed un'associazione inversa con la malattia coronarica (42). Klerkx AHEM e coll. hanno analizzato l'associazione tra *TaqIB* e quattro polimorfismi strettamente collegati (-2708→A, +784CCC→A, -971G→A e -629C→A) e hanno applicato un metodo per predire gli effetti dell'aplotipo in termini di concentrazione di CETP e livelli plasmatici di HDL-C (43): l'allele -629 ha mostrato un effetto significativo sulla riduzione di CETP e le varianti -2708 e -971 potrebbero giocare un ruolo sulle concentrazioni di CETP (43). Diversi studi (Framingham Offspring, Veterans Affair HDL-C Intervention Trial e WOSCOPS) hanno confermato l'associazione dell'allele B2 di *CETP* con un basso rischio cardiovascolare nel sesso maschile (44-46). Inoltre, nello studio AtheroGene, che ha valutato 1211 pazienti affetti da malattia coronarica in follow-up, è stata dimostrata l'associazione dell'allele A della variante

-629 del gene *CETP* con una ridotta mortalità cardiovascolare (47). L'effetto degli aploidi nei geni *CETP* e *LIPC* sono stati valutati in studi di popolazione (44): l'aplotipo H2_{*CETP*} è stato associato ad un effetto cardioprotettivo; gli aploidi H5_{*CETP*} e H6_{*LIPC*} sono stati associati ad aumentato rischio CV (44). Un altro studio condotto ad Hainan (Cina del Sud) ha recentemente mostrato una correlazione tra polimorfismi del gene *CETP* e longevità: *TaqIB* e I405V sono stati combinati ed analizzati in un gruppo di centenari ed è stato trovato che gli alleli B1 e V contribuiscono ad un ruolo protettivo sulla longevità in questa coorte di soggetti (48).

Sebbene siano stati scoperti diversi geni associati al metabolismo delle HDL, allo stato attuale solo una piccola percentuale di questa variabilità genetica può essere spiegata ed il loro effetto sul fenotipo delle HDL dovrebbe essere ulteriormente approfondito e probabilmente correlato a fattori ambientali (49, 50). Non appena saranno identificate ulteriori varianti genetiche, sarà possibile predire, attraverso uno score di rischio allelico, i soggetti ad alto rischio CV e le possibili strategie di prevenzione (51).

HDL e rischio cardiovascolare

Diversi studi, successivi allo studio Framingham che originariamente descrisse la relazione tra HDL-C e malattia coronarica, hanno documentato le funzioni delle HDL in termini di protezione contro le malattie cardiovascolari (23, 52), ma nonostante ciò, recentemente, alcune scoperte controverse, supportate da studi di randomizzazione mendeliana, hanno suggerito che soggetti con elevati livelli plasmatici di HDL hanno mostrato un aumentato rischio di malattia coronarica (CAD) (10). Infatti, uno studio descritto da Voight. et

al. ha indicato che l'analisi di 14 SNPs e alcune varianti del gene *LIPG* associati ad elevato HDL-C non riducono il rischio CV (53). Un altro studio di randomizzazione mendeliana (11) ha analizzato 54.500 soggetti e si è concluso senza alcuna significativa correlazione tra incremento di HDL-C e CAD. Questo concetto è anche supportato dalla valutazione che interventi terapeutici basati sull'aumento di HDL-C abbiano fallito nella riduzione degli outcomes cardiovascolari (23). Uno dei maggiori problemi riguardanti la relazione tra HALP primitiva e malattia cardiovascolare è se livelli molto elevati di HDL-C siano ateroprotettivi o no. Le cause della controversia sono basate su dati ottenuti in studi su modelli animali di deficit di CETP. L'espressione e la sovraespressione di *CETP* nel modello murino, che naturalmente non esprime *CETP*, è aterogenica in presenza di difetti del recettore LDL e di ipercolesterolemia, mentre è anti-aterogenico in presenza di HDL alterate nel contenuto. L'inibizione quasi completa (95%) di CETP nel coniglio è responsabile di un incremento dei livelli di HDL-C (circa il 90%), una condizione che mima la HALP umana primitiva che si associa ad un effetto antiaterogenico (54). In modelli murini, knock-out per il gene *SR-BI*, l'aumento di HDL-C che ne deriva è invece associato ad atherosclerosi accelerata (55). In sintesi, in modelli animali, puntando su diversi geni coinvolti nel metabolismo delle HDL, è possibile produrre un incremento di HDL-C, che può indurre effetti aterogeni o ateroprotettivi in base allo scenario metabolico ed in relazione al ruolo che i diversi geni svolgono in uno specifico meccanismo biochimico. Nell'uomo, l'HALP dovuta a deficit di *CETP* rappresenta finora l'unico setting in cui la relazione tra elevato HDL-C e malattia cardiovascolare è stata studiata. In Giappone pazienti con deficit

di *CETP* e livelli di HDL-C >80 mg/dl non sembrano essere protetti contro le malattie cardiovascolari (56). Apo-AI e livelli plasmatici elevati di HDL-C non correlano con un rischio CV ridotto, così come la variante *LIPG* che incrementa HDL-C (55). Un'ipotesi recente ha indotto a pensare ad un processo di RCT disfunzionale che potrebbe aumentare i livelli plasmatici di HDL-colesterolo libero.

Questo processo, che regola la biodisponibilità di colesterolo libero, potrebbe esercitare proprietà pro-aterogene e potenzialmente tossiche in diversi tessuti, inclusa la parete vascolare incrementando così il rischio di atherosclerosi (56). L'efflusso del colesterolo è alterato in pazienti obesi con sindrome metabolica (57): la perdita di peso così come la riduzione di altri fattori di rischio CV, come l'ipertensione e l'indice HOMA-IR, dovrebbero essere considerati un'importante strategia terapeutica a fronte di un alterato processo di RCT (57). Diversi studi hanno mostrato che diversi meccanismi basati sull'aumento di HDL-C, che potenziano l'efflusso e l'esterificazione del colesterolo, non sono certamente anti-aterogenici (56). Allo stato attuale, solo la tappa SR-BI del processo RCT sembra essere protettiva contro l'aterosclerosi, riducendo i livelli plasmatici di HDL-C (56). I più recenti studi di coorte prospettici hanno dimostrato che nell'ambito dell'intero intervallo dei livelli plasmatici di HDL-C, non c'è una correlazione lineare tra HDL-C e mortalità per eventi CV (58). Il paradosso dell'alta mortalità osservata in soggetti con livelli estremamente elevati di HDL-C è stata testata da Madsen CM et al. nello studio Copenaghen City Heart e nello studio Copenaghen General Population, che rappresentano due studi prospettici basati su popolazioni che riflettono la possibile associazione di varianti genetiche sia con

concentrazioni elevate di HDL-C che con elevato rischio CV (59, 60). La distribuzione di HDL-C su una scala continua è stata correlata al rischio di mortalità per tutte le cause in 52268 uomini e 64240 donne ed è stata osservata un'associazione a forma di U tra livelli plasmatici di HDL-C e mortalità per eventi CV in entrambi i generi, sebbene il rischio di altre cause di mortalità fosse stata meno pronunciata negli uomini (59). La più bassa frequenza di rischio CV è stata osservata per valori di HDL-C di circa 58 mg/dl negli uomini e 77 mg/dl nelle donne; non è stata evidenziata ulteriore protezione cardiovascolare per valori di HDL-C più alti di questo cut-off (59). Una possibile spiegazione è la presenza di varianti geniche nei geni *CETP*, *ABCA1*, *LIPC* e *SCARB1* che correlano ad elevato HDL-C e aumentato rischio CV (58). Altre ipotesi si basano sulla presenza di particelle di HDL anomale in soggetti con livelli estremamente elevati di HDL-C (59) oppure la presenza di alcune differenze nei fattori di rischio che potrebbero essere associate sia a livelli elevati di HDL-C che alla mortalità (59). Inoltre, si potrebbe supporre che al di sopra di questo intervallo di livelli plasmatici, le HDL cambiano la loro forma diventando più larghe di dimensioni e di conseguenza potrebbero rimanere intrappolate nell'intima della parete vasale promuovendo così il deposito di colesterolo e la progressione dell'aterosclerosi (60). Nello studio CANHEART, Ko et al. hanno mostrato una correlazione inversa tra HDL-C ed eventi CV, ma non è stata rilevata ulteriore riduzione di rischio per valori di HDL-C >90 mg/dl (61): le HDL possono rappresentare un "fattore di confondimento piuttosto che un fattore di rischio indipendente e modificabile" (61). In una metanalisi derivata da studi clinici basati su statine, Boekholtd e coll. hanno dimostrato che solo l'incremento di Apo-

AI era inversamente correlato a basso rischio CV (62). Questi risultati sono stati confermati da altri studi condotti da Bowe et al., che hanno mostrato un aumento di malattie CV per valori di HDL-C >90° percentile (63) e da Ridker et al. nello studio JUPITER, che hanno evidenziato come nei pazienti trattati con rosuvastatina 20 mg le HDL-C non sono un fattore predittivo del rischio CV residuo (64, 65).

Farmaci che aumentano HDL-C

Statine-Niacina-Fibrati

Il concetto che incrementare il colesterolo HDL possa essere vantaggioso in termini di riduzione del rischio CV è stato preso in considerazione per decenni come importante strategia per lo sviluppo di nuovi farmaci. Tra i farmaci che indirettamente inducono un incremento di HDL-C, la niacina è stata considerata, nell'era pre-statine, il farmaco principale per aumentare HDL-C accanto ai suoi effetti sulla riduzione di trigliceridemia e LDL-C, anche se diversi studi clinici hanno fallito nel dimostrare i benefici in termini di *endpoint* cardiovascolari. La Tabella 2 riporta una visione schematica dei principali studi clinici sulla niacina ed il loro effetto su HDL-C e sul rischio CV. Franceschini G et al. hanno confrontato niacina a lento-rilascio e fenofibrato in un gruppo di 66 soggetti con dislipidemia, 24 con basso HDL-C (<40 mg/dl) e 42 con livelli normali di HDL-C (40-59 mg/dl), che hanno ricevuto per 6 settimane fenofibrato (160 mg/d) o niacina a lento rilascio (0,5 g/d per 3 settimane, poi 1 g/d) con 4 settimane di wash-out tra i trattamenti. In questo studio, entrambi, fenofibrato e niacina, hanno mostrato simili risultati nell'aumentare i livelli plasmatici di HDL-C, ma hanno modificato diversamente la distribuzione delle dimensioni delle particelle di HDL (66).

Tabella 2 - Principali studi clinici basati su niacina e loro effetti su HDL-C e rischio CV.

Studio clinico	Descrizione	Effetto su HDL-C e outcomes CV	Riferimenti bibliografici
AIM-HIGH	3414 soggetti sono stati trattati con niacina o placebo "on top" al trattamento statinico ad alta efficacia	Il braccio di trattamento con niacina ha mostrato un modesto ma significativo aumento di HDL-C (25% vs 12%) ma nessun beneficio in termini di <i>outcome</i> CV. Lo studio è stato interrotto in anticipo per mancata efficacia	Boden WE et al. Niacin in patients with low HDL cholesterol levels receiving intensive statin therapy. <i>N Engl J Med.</i> 2011; 365: 2255-2267
HPS2-THRIVE	25673 soggetti affetti da malattie CV sono stati randomizzati per ricevere niacina a rilascio prolungato + laropiprant (per ridurre l'effetto collaterale di flushing indotto dalla niacina) o placebo entrambi "on top" alla terapia statinica	Dopo un <i>follow up</i> medio di 3,9 anni, il gruppo trattato con niacina ha mostrato un modesto ma significativo aumento di HDL-C (6 mg/dl), ma nessuna differenza nell'incidenza di eventi CV	HPS2-THRIVE Collaborative Group. Effects of extended-release niacin with laropiprant in high-risk patients. <i>N Engl J Med.</i> 2014; 317: 203-212
Niacin Study Group	Maschi affetti da sindrome metabolica (obesi, ipertrigliceridemici, non-diabetici) e bassi livelli di HDL-C hanno ricevuto niacina per 8 settimane	Riduzione di LDL-C e colesterolo totale associate a riduzione di infiammazione, adesione cellulare e <i>biomarker</i> di proliferazione. Non variazioni significative degli eventi CV	Adiels M, Chapman MJ et al. Niacin Study Group Niacin action in the atherogenic mixed dyslipidemia of metabolic syndrome: insights from metabolic biomarker profiling and network analysis. <i>J Clin Lipidol.</i> 2018; 12: 810-821
Coronary Drug Project (CDP)	8341 maschi dopo infarto miocardico trattati con niacina o clofibrato vs placebo	Incremento di HDL-C, riduzione di LDL-C e TG. Non variazioni significative degli eventi CV	Canner PL et al. Fifteen year mortality in Coronary Drug Project patients: long-term benefit with niacin. <i>J Am. Coll. Cardiol.</i> 1986; 86: 1245-1255
ARBITER-2	167 pazienti con malattia coronarica sono stati trattati con niacina a rilascio prolungato 1 g/die vs. placebo "on top" a terapia statinica stabile	Aumento di HDL-C del 21%. Progressione di cIMT nel gruppo trattato con niacina	Taylor AJ, et al. Arterial biology for the investigation of the treatment effects of reducing cholesterol (ARBITER) 2: a double-blind, placebo-controlled study of extended release niacin on atherosclerosis progression in secondary prevention patients treated with statins. <i>Circulation</i> (2004); 110: 3512-3517
ARBITER-6	208 pazienti (≥ 30 anni) con CAD o equivalente di rischio CAD sono stati trattati con niacina a rilascio prolungato vs. ezetimibe "on top" alla terapia statinica	Aumento di HDL-C nel gruppo Niacina a rilascio prolungato; ridotta incidenza di eventi CV del 5% nel gruppo trattato con Niacina a rilascio prolungato vs 1% nel gruppo trattato con Ezetimibe	Taylor AJ, et al. Extended-release niacin or ezetimibe and carotid intima-media thickness. <i>N Engl J Med.</i> 2009; 361: 2113-2122.

Segue >>>

Studio clinico	Descrizione	Effetto su HDL-C e outcomes CV	Riferimenti bibliografici
AFREGS	143 pazienti (<76 anni) con basso HDL-C e malattia coronarica sono stati trattati con Niacina 0.25-3 g gemfibrozil 1.2 g colestiramina 2 g vs placebo	Aumento di HDL-C del 36%; riduzione del 13.7% di eventi CV combinati. Dati non significativi	Whitney EJ, et al. A randomized trial of a strategy for increasing high-density lipoprotein cholesterol levels: effects on progression of coronary heart disease and clinical events. Ann Intern Med. 2005; 142: 95-104
CLAS	162 maschi dopo CABG trattati con Niacina 3-12 g/die + colestipolo 30 g/die vs. placebo	Aumento di HDL-C del 31%; riduzione di CT del 15-20% e riduzione di LDL-C del 43%; regressione aterosclerosi nel 16,2% dei pazienti a 2 anni e del 17,9% a 4 anni, confrontati con 2,4% e 6,4%, rispettivamente nel gruppo placebo	Blankenhorn DH, et al: Beneficial effects of combined colestipol-niacin therapy on coronary atherosclerosis and coronary venous bypass grafts. JAMA. 1987; 257: 3233-3240
Stockholm trial	558 pazienti dopo IM, età <70 trattati con Clofibrato 2x1 g + niacina 3x1 g vs placebo	Riduzione di CT del 26%; riduzione di TG del 30 %; riduzione di Infarto miocardico non fatale del 50%	Carlson LA, et al. Atherosclerosis. Reduction of myocardial reinfarction by the combined treatment with clofibrate and nicotinic acid. Atherosclerosis. 1977; 28: 81-86
HATS	160 pazienti con CAD e basso HDL-C distribuiti in 4 braccia e trattati con: Gruppo A A: simvastatin 10-20 mg/d + niacina 2-4 g/d; Gruppo B: antiossidante; Gruppo C: simvastatina + niacina + antiossidante; Gruppo D: placebo	Riduzione di LDL-C del 42%; incremento di HDL-C del 26%; regressione di stenosi coronarica severa del 0,4% vs placebo; riduzione di eventi CV del 88% (morte coronarica, IM o stroke, o rivascolarizzazione)	Brown BG, et al. Simvastatin and niacin, antioxidant vitamins, or the combination for the prevention of coronary disease. N Engl J Med. 2001; 345: 1583-1589

AIM-HIGH (Atherothrombosis Intervention in Metabolic Syndrome with Low HDL/High Triglyceride and Impact on Global Health Outcomes); HPS2-THRIVE (Heart Protection Study 2 - Treatment of HDL to Reduce the Incidence of Vascular Events); CDP (Coronary Drug Project); ARBITER-2 (Arterial Biology for the Investigation of the Treatment Effects of Reducing Cholesterol); ARBITER-6 (Arterial Biology for the Investigation of the Treatment Effects of Reducing Cholesterol-6-HDL); AFREGS (Armed Forces Regression Study); CLAS (The Cholesterol Lowering Atherosclerosis Study); HATS (HDL-Atherosclerosis Treatment Study).

cIMT: spessore medio-intimale carotideo; CABG: Coronary Artery Bypass Graft surgery; CT: Colesterolo totale; TG: Trigliceridi; HDL-C: HDL-Colesterolo; LDL-C: LDL-Colesterolo; CAD: Coronary Artery Disease - malattia coronarica; IM: Infarto miocardico.

I fibrati sono stati utilizzati per anni per aumentare HDL-C ed il loro effetto è stato valutato in diversi studi clinici (i più importanti sono: FIELD - Fenofibrate Intervention and Event Lowering in Diabetes; ACCORD - Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes; VA-HIT - Veterans Administration HDL Intervention Trial and the HHS – Helsinki Heart Study), che hanno fallito nel dimostrare una significativa

riduzione del rischio CV a fronte dell'incremento di HDL-C. Le statine hanno mostrato un effetto importante nell'aumento di HDL-C e diversi studi clinici ne hanno confermato questa proprietà. Tra questi, lo studio VOYAGER ha valutato il ruolo di rosuvastatina (5-40 mg), atorvastatina (10-80 mg) e simvastatina (10-80 mg) nell'aumento di HDL-C e nella riduzione di LDL-C.

Inibitori di CETP

Gli inibitori di CETP sono stati proposti nel corso degli anni per aumentare i livelli plasmatici di HDL, ma non sono stati registrati benefici nella prevenzione CV e gli studi clinici hanno fallito nel provare il loro ipotetico effetto positivo (67). È stato suggerito che l'inibizione di CETP avrebbe potuto bloccare il trasferimento di CE dalle HDL alle LDL/VLDL attraverso il fegato, causando conseguentemente l'accumulo di CE nelle HDL e riducendo nello stesso tempo la loro capacità di rimuovere il colesterolo dalle cellule (68). La correlazione tra CETP e aterosclerosi è stata incoerente dal momento che alcuni studi avevano promosso un ruolo antiaterogeno, alcuni altri sono stati neutri e diversi studi ne hanno indicato un ruolo pro-aterogeno (69). Questi risultati non univoci sono stati parzialmente attribuiti all'utilizzo di diverse metodiche usate per misurare l'attività e/o massa di CETP (69). Nello studio Copenaghen City Heart è stato dimostrato che due polimorfismi di CETP si correlano a ridotto rischio CV e longevità (69). Gli studi clinici con torcetrapib, un inibitore di CETP che aumenta i livelli plasmatici di HDL-C e ApoAI, hanno mostrato sia un effetto neutro sull'aterosclerosi (studio RADIANCE) sia un aumento della mortalità cardiovascolare (studio ILLUMINATE); quest'ultimo è stato sospeso 18 mesi prima per incrementati eventi fatali di natura cardiovascolare (69). Un'analisi post-hoc dello studio ILLUMINATE ha mostrato che, dal momento che i soggetti trattati con torcetrapib avevano riportato una normale o aumentata capacità di efflusso di colesterolo dalle cellule, probabilmente le cause di morti cardiovascolari potrebbe essere stata da correlare ad effetti *off-target* dell'inibitore di CETP indipendente dalla sua funzione princi-

pale (69). Recentemente l'inibitore di CETP dalcetrapib è stato valutato in uno studio condotto su pazienti ospedalizzati per sindrome coronarica (Dal-ACUTE): sebbene sia stato dimostrato un aumento del 30% di HDL-C, il CEC era aumentato solo in minima parte (70); il secondo studio su dalcetrapib era uno studio di fase 3 controllato da placebo (Dal-OUTCOMES) in pazienti affetti da recente sindrome coronarica acuta (70): 15.871 soggetti sono stati valutati e trattati con dalcetrapib o placebo on top alla terapia statinica. Sebbene i livelli di HDL-C siano aumentati più di quanto osservato con la niacina, gli outcomes CV non erano migliorati (70). Un altro inibitore di CETP, Anacetrapib, è stato valutato in termini di efficacia e tollerabilità nello studio DEFINE, dove soggetti ad alto rischio CV erano randomizzati per ricevere anacetrapib o placebo: dopo 76 settimane il HDL-C era aumentato del 140% e il LDL-C ridotto del 36% nel braccio di anacetrapib, il farmaco era stato sicuro e ben tollerato ma non sono stati ottenuti risultati coerenti in termini di rischio CV (70). Due ampi studi clinici su anacetrapib (studio REVEAL) ed evacetrapib (studio ACCELERATE) hanno dimostrato che entrambi i farmaci aumentano l'efflusso di colesterolo, ma allo stato attuale non ci sono evidenze forti sulla riduzione del rischio CV (71). Inoltre, nel 2014 una metanalisi basata su studi clinici su niacina, fibrati ed inibitori di CETP non ha mostrato alcuna riduzione della mortalità CV (69). Ad oggi l'unico vantaggio dell'inibizione di CETP è stata testata nella prevenzione della schistosomiasi epatica fatale (72). In base a questi studi si dovrebbe affermare pertanto che non ci sono dati coerenti sul ruolo di CETP valutato in studi clinici randomizzati-controllati e la variabilità dei parametri lipidici dei soggetti trattati

con inibitori di CETP, insieme agli sfavorevoli outcomes riportati, non ha permesso ad oggi di trovare un farmaco capace di ridurre il rischio CV (71).

Glossario

- ABCA1:** ATP-binding cassette transporter member-1
- apoA-I:** apolipoproteina A-I
- apoA-II:** apolipoproteina A-II
- apoA-IV:** apolipoproteina A-IV
- apo C-III:** apolipoproteina C-III
- ApoE:** apolipoproteina E
- CAD:** Coronary Artery Disease - Malattia arteriosa coronarica
- CEC:** capacità di efflusso del colesterolo HDL
- CL:** colesterolo libero
- CETP:** cholesterol ester transfer protein - Proteina di trasferimento degli esteri del colesterolo
- DHA:** acido docosaeisoenoico
- DMARDs:** Disease modifying antirheumatic drugs - Farmaci antireumatici che modificano la malattia
- EL:** Endothelial Lipase - Lipasi endoteliale
- EPA:** acido eicosapentenoico
- FANS:** Farmaci antinfiammatori non steroidei
- FL:** fosfolipidi
- GWAS:** Genome Wide Association Studies - studi di associazione sull'intero genoma
- HALP:** iperalfalipoproteinemia
- HDL-C:** High Density Lipoprotein Cholesterol - Colesterolo delle lipoproteine ad alta densità
- HL:** Hepatic Lipase - Lipasi epatica
- HOMA-IR:** Homeostasis model assessment-insulin resistance - è un indice utilizzato per valutare l'insulino resistenza basato su un modello omeostatico matematico che considera le concentrazioni sieriche di glucosio e insulina a digiuno.
- LCAT:** Lecitin-colesterolo acil-transferasi
- LDL:** Low Density Lipoproteins - Lipoproteine a bassa densità
- LIPC:** Lipasi C
- LPL:** Lipasi lipoproteica
- PLTP:** Phospholipid Transfer Protein - Proteina di trasferimento di fosfolipidi
- RCT:** Reverse Cholesterol Transport - Trasporto inverso del colesterolo
- Remnants:** lipoproteine "a densità intermedia" della degradazione delle altre particelle lipoproteiche
- SR-B1:** Scavenger receptor class B type-1
- VLDL:** Very Low Density Lipoproteins - Lipoproteine a densità molto bassa

Nuovi farmaci per aumentare il HDL-C

Studi clinici stanno valutando il ruolo di nuovi targets per studiare la cardioprotezione incrementando specifiche sottoclassi di HDL oppure migliorando le funzioni delle HDL (73).

L'oligonucleotide antisenso (ASO) è una nuova strategia per inibire CETP attraverso la degradazione del mRNA di CETP e può rappresentare un modo alternativo per aumentare HDL-C (74).

Terapie basate su HDL ricostituite (rHDL) che includono una molecola che mimetizza le HDL (CER-001), un derivato di apoAI (CLS112) e un LCAT umano ricombinante (ACP-501) insieme agli anticorpi anti-apoAI (anti-ApoAI IgG) potrebbero rappresentare la base per lo sviluppo di targets concentrati sull'incremento della sottoclasse HDL3 (funzionalmente superiori alle HDL2) oppure basati sul miglioramento delle funzioni di HDL piuttosto che aumentare necessariamente il HDL-C che è stato già testato senza alcun risultato incoraggiante (73).

Conclusioni

In sintesi, l'HALP è un disordine eterogeneo i cui meccanismi patogenetici sono ancora in corso di caratterizzazione. Le controversie sul ruolo protettivo delle HDL nel rischio CV sono state valutate nel corso degli anni, parecchi studi hanno mostrato che diversi meccanismi basati sull'aumento di HDL-C, potenziando sia l'efflusso che l'esterificazione di colesterolo, non sono con certezza anti-aterogene. Sono stati caratterizzati diversi geni correlati al metabolismo delle HDL e allo stato attuale è chiaro che uno stesso incremento di HDL-C possa indurre effetti proaterogeni o ateroprotettivi in base allo scenario

metabolico ed al ruolo che diversi geni giocano in una specifica via metabolica. Sarebbero necessari nuovi saggi funzionali per misurare la qualità delle HDL in una

modalità validata, riproducibile ed economicamente vantaggiosa, per comprendere meglio gli effetti sull'aterosclerosi e sul rischio CV.

Questionario di auto-apprendimento

1) L'iperalfalipoproteinemia:

- a. È un difetto monogenico del metabolismo lipidico caratterizzato da livelli di HDL-C >90° percentile della popolazione generale.
- b. È un difetto del metabolismo lipidico caratterizzato da livelli di HDL-C >90° percentile della popolazione generale. Può essere monogenico, poligenico o causato da fattori secondari.
- c. È un difetto del metabolismo lipidico caratterizzato da incrementati livelli plasmatici di colesterolo totale.

al rischio di mortalità per tutte le cause:

- a. È stata osservata un'associazione a forma di U tra livelli plasmatici di HDL-C e mortalità per eventi CV in entrambi i generi;
- b. La più bassa frequenza di rischio CV è stata osservata per valori di HDL-C attorno a 58 mg/dl (1,5 mmol/L) negli uomini e 77 mg/dl (2,0 mmol/L) nelle donne;
- c. a + b

5) Gli inibitori di CETP:

- a. Si sono dimostrati efficaci nel ridurre il rischio cardiovascolare.
- b. Non hanno indotto benefici e gli studi clinici hanno fallito nel provarne il loro ipotetico effetto positivo.
- c. si correlano ad aumentato rischio cardiovascolare.

6) Tra i nuovi farmaci in fase di sperimentazione clinica per aumentare HDL-C vi sono:

- a. Oligonucleotidi antisenso (ASO), HDL ricostituite (rHDL), LCAT umano ricombinante (ACP-501) e anticorpi anti-apoAI (anti-ApoAI IgG).
- b. Acido bempedoico.
- c. Niacina e fenofibrato.

2) Le HDL:

- a. Sono divise in due sottofrazioni maggiori: HDL2, larghe e ricche di lipidi, e HDL3, piccole e ricche in proteine.
- b. Sono costituite da particelle lipidiche discoidali.
- c. Sono costituite da particelle lipidiche sferiche.

3) La forma monogenica

più frequente di HALP è:

- a. Deficit del gene codificante per la Lipasi epatica (HL).
- b. Deficit di APO-CIII.
- c. Deficit di CETP.

4) Nel Copenaghen City Heart Study, in cui la distribuzione di HDL-C su una scala continua è stata correlata

Risposte corrette:
1b; 2a; 3c; 4c; 5b; 6a

RIASSUNTO

L'iperalfipoproteinemia (HALP) è un disordine del metabolismo lipoproteico caratterizzato da elevati livelli plasmatici di colesterolo HDL, superiori al 90° percentile della distribuzione dei valori di HDL-C nella popolazione generale. Forme primitive di HALP includono mutazioni nei geni codificanti per la proteina di trasferimento degli esteri del colesterolo (*CETP*), la lipasi epatica (*LIPC*) e l'apolipoproteina C-III (*APOC3*). Fattori secondari non genetici come farmaci (ad es. estrogeni, tiazidi, corticosteroidi), gravidanza, assunzione di alcol, patologie renali (ad es. la sindrome nefrosica) ed epatiche (ad es. la cirrosi biliare primitiva) possono indurre incremento di HDL-C. I meccanismi patogenetici dell'HALP secondaria non sono stati ancora ben caratterizzati e non si sa se la causa di questo disordine lipidico sia un'aumentata produzione oppure un ridotto catabolismo delle HDL. Inoltre, vi è una certa evidenza che il HDL-C sia inversamente correlato al rischio CV, ma studi recenti hanno mostrato che in pazienti ad alto rischio CV, l'effetto ateroprotettivo del HDL-C è ancora controverso. In questa rassegna, abbiamo descritto inizialmente le proprietà fisiologiche delle HDL; abbiamo poi concentrato brevemente l'attenzione sulle forme primitive e secondarie di HALP ed infine abbiamo valutato il ruolo del HDL-C nelle malattie CV e le nuove conoscenze che potrebbero migliorare le strategie per intervenire nel metabolismo delle HDL.

Parole chiave: *HALP, HDL-C, rischio cardiovascolare, studi di randomizzazione mendeliana, GWAS.*

Bibliografia

1. Tall AR, Breslow JL, Rubin EM. Genetic disorders affecting plasma high density lipoproteins. In: Scriver CR, Beaudet AL, Valle D, Sly WS, eds. The metabolic and molecular bases of inherited disease. Vol. II. 8th ed. New York, McGraw Hill 2915-2936.
2. Ramasamy I. Update on the molecular biology of dyslipidemias. *Clin Chim Acta.* 2016; 454: 143-185.
3. Barter P, Kastelein J, Nunn A, Hobbs R. High density lipoproteins (HDLs) and atherosclerosis; the unanswered questions. *Atherosclerosis.* 2003; 168: 195-211.
4. Yamashita S, Maruyama T, Hirano K, Sakai N, et al. Molecular mechanisms, lipoprotein abnormalities and atherogenicity of hyperalphalipoproteinemia. *Atherosclerosis.* 2000; 152: 271-285.
5. Nagano M, Yumashita S, Hirano K, et al. Molecular mechanisms of cholesteryl ester transfer protein deficiency in Japanese. *J Atheroscler Thromb.* 2004; 11: 110-121.
6. Qasim A, Rader DJ. Human genetics of variation in high-density lipoprotein cholesterol. *Curr Atheroscler Rep.* 2006; 8: 198-205.
7. de Backer G, de Bacquer D, Kornitzer M. Epidemiological aspects of high density lipoprotein cholesterol. *Atherosclerosis.* 1998; 137: (Suppl.): S1-S6.
8. Motazacker MM, Peter J, Treskes M, et al. Evidence of a polygenic origin of extreme high-density lipoprotein cholesterol levels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013; 33: 1521-1528.
9. Franceschini G. Epidemiologic evidence for high-density lipoprotein cholesterol as a risk factor for coronary artery disease. *Am J Cardiol.* 2001; 88: 9-#8722.
10. Holmes MV, Asselbergs FW, Palmer TM, et al. Mendelian randomization of blood lipids for coronary heart disease. *Eur Heart J.* 2015; 36: 539-550.
11. Haase CL, Tybjærg-Hansen A, Qayyum AA, et al. LCAT, HDL cholesterol and ischemic cardiovascular disease: a Mendelian randomization study of HDL cholesterol in 54500 individuals. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012; 97: E248-E256.
12. Zhong S, Sharp DA, Grove JS, et al. Increased coronary heart disease in Japanese-American men with mutation in the Cholesteryl Ester Transfer Protein gene despite increased HDL levels. *J Clin Invest.* 1996; 97: 2917-2923.
13. Allard-Ratnick M. Association between very high levels of HDL-C and increased risk of CV events. In: Atlanta: ESC; 2018. <https://ipccs.org/2018/09/04/association-between-very-high-levels-of-hdl-c-and-increased-risk-of-cv-events/>
14. Prats-Uribe A, Sayols-Baixeras S, Fernandez-Sanles A, et al. High-density lipoprotein characteristics and coronary artery disease: a mendelian randomization study. *Metab Clin Exp.* 2020; 112: 154351.
15. von Eckardstein A, Nofer JR, Assmann G. High density lipoproteins and arteriosclerosis. Role

- of cholesterol efflux and reverse cholesterol transport. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001; 21: 13-27.
16. Calabresi L, Gomaraschi M, Franceschini G. Endothelial protection by high-density lipoproteins: from bench to bedside. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003; 23: 1724-1731.
 17. Ross R. Atherosclerosis—an inflammatory disease. *N Engl J Med.* 1999; 340: 115-126.
 18. Kontush A, Lindahl M, Lhomme M, et al. Structure of HDL: particle subclasses and molecular components. In: von Eckardstein A, Kardassis D, editors. *Handbook of Experimental Pharmacology.* Cham: Springer International Publishing. 2015; 3-51.
 19. Okada T, Ohama T, Takafuji K, et al. Shotgun proteomic analysis reveals proteome alterations in HDL of patients with cholesteryl ester transfer protein deficiency. *J Clin Lipidol.* 2019; 13: 317-325.
 20. Vaisar T, Pennathur S, Green PS, et al. Shotgun proteomics implicates protease inhibition and complement activation in the anti-inflammatory properties of HDL. *J Clin Invest.* 2007; 117: 746-756.
 21. Rosales C, Gillard BK, Xu B, et al. Revisiting reverse cholesterol transport in the context of high-density lipoprotein free cholesterol bioavailability. *Methodist DeBakey Cardiovasc J.* 2019; 15: 47-54.
 22. Trigatti BL, Krieger M, Rigotti A. Influence of the HDL receptor SR-B1 on lipoprotein metabolism and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003; 23: 1732-1738.
 23. Khera AV, Cuchel M, de la Llera-Moya M. Cholesterol efflux capacity, high-density lipoprotein function, and atherosclerosis. *N Engl J Med.* 2011; 363: 127-135.
 24. Rohatgi A, Khera A, Berry JD, et al. HDL efflux capacity and incident cardiovascular events. *N Engl J Med.* 2014; 371: 2383-2393.
 25. Rye KA, Barter PJ. Cardioprotective functions of HDLs. *J Lip Res.* 2014; 55: 168-179.
 26. Drew BG, Rye KA, Duffy SJ, et al. The emerging role of HDL in glucose metabolism. *Nat Rev Endocrinol.* 2012; 8: 237-245.
 27. van der Gaag MS, van Tol A, Vermunt SH, et al. Alcohol consumption stimulates early steps in reverse cholesterol transport. *J Lipid Res.* 2001; 42: 2077-2083.
 28. Ruiz-Ramie JJ, Barber JL, Sarzynski MA. Effects of exercise on HDL functionality. *Curr Opin Lipidol.* 2019; 30: 16-23.
 29. Burillo E, Martin-Fuentes P, Mateo-Gallego R, Baila-Rueda L. Omega-3 fatty acids and HDL. How do they work in the prevention of cardiovascular disease? *Curr Vasc Pharmacol.* 2012; 10: 432-441.
 30. Ossoli A, Pavanello C, Calabresi L. High-Density Lipoprotein, Lecithin:Cholesterol Acyltransferase, and Atherosclerosis. *Endocrinol Metab.* 2016; 31: 223-229.
 31. Malik S. Transcriptional regulation of the apolipoprotein AI gene. *Front Biosci.* 2003; 8: d360-d368.
 32. Godslan IF. Biology: risk factor modification by OCs and HRT lipids and lipoproteins. *Maturitas.* 2004; 47: 299-303.
 33. Van der Steeg WA, Hovingh GK, Klerkx EM, et al. Clolesteryl ester transfer protein and hyperalphalipoproteinemia in Caucasians. *J Lip Res.* 2007; 48: 674-682.
 34. Hegele RA, Little JA, Connelly PW. Compound heterozygosity for mutant hepatic lipase in familial hepatic lipase deficiency. *Biochem Biophys Res Commun.* 1991; 179: 78-84.
 35. von Eckardstein A, Holz H, Sandkamp M, et al. Apolipoprotein C-III (lys58>glu): identification of an apolipoprotein C-III variant in a family with hyperalphalipoproteinemia. *J Clin Invest.* 1991; 87: 1724-1731.
 36. Thompson JF, Durham LK, Lira ME, et al. CETP polymorphisms associated with HDL cholesterol may differ from those associated with cardiovascular disease. *Atherosclerosis.* 2005; 181: 45-53.
 37. Boes E, Coassini S, Kollerits B, et al. Genetic-epidemiological evidence on genes associated with HDL cholesterol levels: a systematic in-depth review. *Exp Gerontol.* 2009; 44: 136-160.
 38. Weiglass-Volkov D, Pajukanta P. Genetic causes of high and low serum HDL cholesterol. *J Lipid Res.* 2010; 51: 2032-2057.
 39. Aouizerat BE, Engler MB, Natanzon Y, et al. Genetic variation of PLTP modulates lipoprotein profiles in hypoalphalipoproteinemia. *J. Lipid Res.* 2006; 47: 787-793.
 40. Oates C, Koenig D, Rhyne J, Bogush N, et al. Novel polymorphisms associated with Hyperalphalipoproteinemia (HALP) and apparent cardioprotection. *J Clin Lipidol.* 2018; 12: 110-115.
 41. Wu Z, LouY, Qiu Y, et al. Association of cholesteryl ester transfer protein (CETP) gene polymorphism, high density lipoprotein cholesterol and risk of coronary artery disease: a meta-analysis using a Mendelian randomization approach. *BMC Med Genet.* 2014; 15: 118.
 42. Thompson A, Di Angelantonio E, Sarwar N, et al. Association of cholesteryl ester transfer protein genotypes with CETP mass and activity, lipid levels and coronary risk. *JAMA.* 2008; 299: 2777-2788.

43. Klerkx AHEM, Tanck MWT, Kastelein JJP, et al. Haplotype analysis of the CETP gene: not TaqIB, but the closely linked -629C->A polymorphism and a novel promoter variant are independently associated with CETP concentration. *Human Molecular Genetics*. 2003; 12: 111-123.
44. Ordovas JM, Cupples LA, Corella D, et al. Association of cholesteryl ester transfer protein TaqIB polymorphism with variations in lipoprotein subclasses and coronary heart disease risk: the Framingham study. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2000; 20: 1323-1329.
45. Brouseeau ME, O'Connor JJ, Ordovas JM, et al. Cholesteryl ester transfer protein TaqI B2B2 genotype is associated with higher HDL cholesterol levels and lower risk of coronary heart disease end points in men with HDL deficiency: Veterans Affairs HDL Cholesterol Intervention Trial. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2002; 22: 1148-1154.
46. Freeman DJ, Samani NJ, Wilson V, et al. A polymorphism of the cholesteryl ester transfer protein gene predicts cardiovascular events in non-smokers in the West of Scotland Coronary Prevention Study. *Eur. Heart. J.* 2003; 24: 1833-1842.
47. Blankeberg S, Rupprecht HJ, Bickel C, et al. Common genetic variation of the cholesteryl ester transfer protein gene strongly predicts future cardiovascular death in patients with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol.* 2003; 41: 1983-1989.
48. Zhang YX, Su Y, Tang L, et al. CETP polymorphisms confer genetic contribution to centenarians of Hainan, south of China. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 2016; 9: 872-876.
49. Ahmad T, Chasman DI, Buring JE, et al. Physical activity modifies the effect of LPL, LIPC and CETP polymorphism on HDL-levels and the risk of myocardial infarction in women of European ancestry. *Circ. Cardiovasc. Genet.* 4 (2011), 74-80.
50. Huggins GS, Papandonatos GD, Erar B, et al. Genetic Subgroup of the Action for Health in Diabetes (Look AHEAD) Study, Do genetic modifier of high-density lipoprotein cholesterol and trygliceride levels also modify their response to a lifestyle intervention in the setting of obesity and type-2 diabetes mellitus?: the Action for Health in Diabetes (Look AHEAD) study. *Circ. Cardiovasc. Genet.* 2013; 6: 391-399.
51. Kathiresan S, Willer CJ, Peloso GM, et al. Common variants at 30 loci contribute to polygenic dyslipidemia. *Nat. Genet.* 2009; 41: 56-65.
52. Feghaly JJ, Mooradian AD. The rise and fall "ing" of the HDL hypothesis. *Drugs*. 2020; 80: 353-362.
53. Voight BF, Peloso GM, Orho-Melander M, et al. Plasma HDL cholesterol and risk of myocardial infarction: a mendelian randomization study. *Lancet*. 2012; 380, 572-580.
54. Aghebati T, Badiiee A, Hooshang Mohammadpour A, Afshar M. Anti-atherosclerosis effect of different doses of CETP vaccine in rabbit model of atherosclerosis. *Biomed Pharmacother*. 2016; 81: 468-473.
55. Cuchel M, Rader DJ. Macrophage reverse cholesterol transport: key to the regression of atherosclerosis? *Circulation*. 2006; 113: 2548-2555.
56. Rosales C, Gillard BK, Xu B, et al. Revisiting reverse cholesterol transport in the context of high-density lipoprotein free cholesterol bioavailability. *Methodist Debakey Cardiovasc J.* 2019; 15: 47-54.
57. Vasudevan M, Tchoua U, Gillard BK, et al. Modest diet-induced weight loss reduces macrophages cholesterol efflux to plasma of patients with metabolic syndrome. *J Clin Lipidol*. 2013; 7: 661-670.
58. Hamer M, O'Donovan G, Stamatakis E. High-density lipoprotein cholesterol and mortality. Too much of a good thing? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2018; 38: 669-672.
59. Madsen CM, Varbo A, Nordestgaard BG. Extreme high high-density lipoprotein cholesterol is paradoxically associated with high mortality in men and women: two prospective cohort studies. *European Heart Journal*. 2017; 38, 2478-2486.
60. Madsen CM, Nordestgaard BG. Is it time for new thinking about high-density lipoprotein? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2018; 38: 484-486.
61. Ko DT, Alter DA, Guo H, et al. High-density lipoprotein cholesterol and cause-specific mortality in individuals without previous cardiovascular conditions: the CANHEART study. *J Am. Coll. Cardiol.* 2016; 68: 2073-2083.
62. Boekholdt SM, Arsenault BJ, Hovingh GK, et al. Levels and changes of HDL cholesterol and apolipoprotein A-I in relation to risk of cardiovascular events among statin-treated patients: a meta-analysis. *Circulation*. 2013; 128: 1504-1512.
63. Bowe B, Xie Y, Xian H, Balasubramanian S, et al. High density lipoprotein cholesterol and the risk of all-cause mortality among U.S. Veterans. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 2016; 11: 1784-1793.
64. Ridker PM, Genest J, Boekholdt SM, et al. JUPITER Trial Study Group. HDL cholesterol and residual risk of first cardiovascular events after treatment with potent statin therapy: an analysis from the JUPITER trial. *Lancet*. 2010; 376: 333-339.

65. Barter P, Genest J. HDL cholesterol and ASCVD risk stratification: a debate. Clinical and scientific debates on atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2019; 283: 7-12.
66. Franceschini G, Favari E, Calabresi L, et al. Differential effects of fenofibrate and extended-release niacin on high-density lipoprotein particle size distribution and cholesterol efflux capacity in dislipidemic patients. *J Clin Lipidol*. 2013; 7: 414-422.
67. Nissen SE., Tardif JC., Nicholls SJ., Revkin JH., et al. Effect of torcetrapib on the progression of coronary atherosclerosis. *N. Engl. J. Med.* 2007; 356: 1304-1316.
68. Schwarts GG, Olsson AG, Abt M, et al. Effects of dacepirid in patients with a recent acute coronary syndrome. *N. Engl. J. Med.* 2012; 367: 2089-2099.
69. Yamashita S, Sakai N, Hirano K, et al. Molecular genetics of plasma cholesteryl ester transfer protein. *Curr. Opin. Lipidol.* 1997; 8: 101-110.
70. Barter PJ, Nicholls SJ, Kastelein JJP, et al. CETP inhibition as a strategy to reduce cardiovascular risk: the pro case. *Circulation*. 2015; 132: 423-432.
71. Siddiqi HK, Kiss D, Rader D. HDL-cholesterol and cardiovascular disease: rethinking our approach. *Curr Opin Cardiol*. 2015; 30: 536-542.
72. Hovingh GK, Ray KK, Boekholdt SM. Is Cholesteryl Ester Transfer Protein Inhibition an Effective Strategy to Reduce Cardiovascular Risk? CETP as a target to lower CVD risk: suspension of disbelief? *Circulation*. 2015; 132: 433-440.
73. Yokoyama S. Unique features of high-density lipoproteins in the Japanese: in population and in genetic factors. *Nutrients*. 2015; 7: 2359-2381.
74. Woudberg NJ, Pedretti S, Lecour S, et al. Pharmacological intervention to modulate HDL: what do we target? *Front. Pharmacol.* 2018; 8: 989.
75. Mabuchi H, Nohara A, Inazu A. Cholesteryl Ester Transfer Protein (CETP) Deficiency and CETP inhibitors. *Mol. Cells*. 2014; 37: 777-784.

FATTORI DI RISCHIO

IL VALORE CLINICO DELLA MISURAZIONE DELLA CIRCONFERENZA VITA COME MARKER DI RISCHIO DI MALATTIA CARDIOVASCOLARE

The clinical value of waist circumference measurement as a cardiovascular disease risk marker

PAOLO MAGNI^{1,2}

¹Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano;

²IRCCS Multimedica, Milano

SUMMARY

Obesity, especially obesity with abdominal-visceral adipose accumulation, is associated with an important increase in the risk of cardiovascular and metabolic diseases. It is interesting to observe that in various countries the prevalence of overweight and obesity has stabilized or is moderately increasing if evaluated by means of BMI. However, if we evaluate them by measuring the waist circumference, a major increase is observed, suggesting that what has increased in the population is abdominal obesity. This anthropometric parameter provides, compared to BMI, a better estimate of the accumulation of visceral adipose, which in turn, due to a series of metabolic, hormonal and inflammatory alterations, is a powerful promoter of atherosclerotic vascular disease. Waist circumference measurement should therefore be incorporated into regular clinical practice for diagnostic and prognostic reasons. Its strengths include the simplicity of measurement, its diagnostic and prognostic value and the possibility of using it to monitor the effectiveness of an intervention on lifestyles, especially in relation to physical activity and nutrition. Among the current limitations of waist circumference, there is the fact that to date it has not yet been possible to insert it into cardiovascular risk calculators and the complex BMI-waist circumference interaction requires further studies, also in consideration of ethnic variations. In summary, even with some aspects still to be clarified, the waist circumference is nowadays an important parameter to be regularly evaluated in the clinical practice, especially in the cardiovascular and metabolic area.

Key words: *Cardiovascular risk, waist circumference, visceral adipose, chronic low-grade inflammation, obesity.*

Indirizzo per la corrispondenza

Paolo Magni

Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari,

Università degli Studi di Milano

E-mail: paolo.magni@unimi.it

Introduzione

La prevalenza del sovrappeso e dell'obesità negli adulti, valutata con la misurazione del BMI (body mass index o indice di massa corporea), è aumentata in tutto il mondo dagli anni '80, e nessun paese ne ha mostrato riduzioni rilevanti negli ultimi 33 anni (1). L'obesità è un grave problema di salute pubblica in Italia e nel mondo (2) e la dipendenza dalla sola misurazione del BMI si è dimostrata inadeguata al fine di consentire ai medici una valutazione e gestione del rischio per la salute correlato all'obesità nei propri pazienti. Sebbene, nell'arco della vita, molti individui con sovrappeso o obesità possano progressivamente sviluppare complicazioni cardio-metaboliche, come il diabete mellito di tipo 2 (DMT2) e le malattie cardiovascolari (CVD), una minoranza considerevole rimarrà esente da queste malattie croniche, secondo un fenomeno che è stato descritto come "obesità metabolicamente sana" (MHO). La prevalenza di MHO tra gli adulti varia notevolmente da studio a studio a causa delle differenze di età, etnia e fattori ambientali, nonché della mancanza di una definizione universale di salute metabolica e di un sistema di classificazione universale per l'obesità (3). Al riguardo, vari studi con periodi di follow-up a lungo termine hanno generalmente chiarito che l'MHO è spesso uno stato temporaneo o di transizione per la maggior parte delle persone affette da obesità. Infatti, in uno studio con un follow-up di 20 anni, circa la metà degli adulti con MHO è diventata metabolicamente patologica entro la fine dello studio stesso. In un altro studio, i partecipanti con MHO erano a maggior rischio di eventi cardiovascolari dopo un follow-up a lungo termine (4). In generale, uno studio che ha considerato l'intera

gamma di definizioni possibili per MHO ha suggerito che il rischio di un evento cardiovascolare associato al fenotipo MHO aumenta con tempi di follow-up più lunghi (5). Nonostante il fatto che i limiti del BMI come indice di obesità siano noti da decenni, diverse linee guida sull'obesità in tutto il mondo rimangono ferme nella raccomandazione che il BMI da solo sia la misura per caratterizzare la morbilità correlata all'obesità e il rischio di morte (6, 7).

L'incapacità del BMI di descrivere in modo affidabile il rischio cardiometabolico è in parte correlata al fatto che il BMI, per sé stesso, è un biomarcatore insufficiente di adiposità addominale. Allo stesso tempo, la misurazione della circonferenza della vita è un metodo semplice per valutare l'adiposità addominale ed è facilmente standardizzabile e applicabile nella pratica clinica.

La circonferenza della vita è fortemente associata a mortalità per tutte le cause (8, 9) e alla mortalità cardiovascolare (10), con o senza aggiustamento per BMI (8), anche se la robustezza dell'associazione tra circonferenza della vita con morbidità e mortalità si realizza solo dopo l'aggiustamento per BMI (8, 11). Pertanto, l'utilizzo

Elenco degli argomenti trattati

- Obesità e rischio cardiovascolare e metabolico
- Prevalenza dell'obesità addomino-viscerale
- Circonferenza della vita e identificazione del fenotipo di obesità ad alto rischio cardiometabolico
- Significato clinico della misurazione della circonferenza addominale nella diagnosi e prognosi del rischio cardiovascolare
- Misurazione della circonferenza della vita
- Valori di soglia per stimare il rischio cardiovascolare e metabolico

della circonferenza della vita consente di migliorare la precisione della definizione del rischio per la salute ottenibile con il BMI; questa misurazione dovrebbe quindi essere inclusa quando si stratifica il rischio di malattia correlato all'obesità (12). La resistenza all'inclusione di routine della circonferenza della vita nella pratica clinica quindi non solo ignora l'evidenza a favore della sua utilità, ma non sfrutta un'opportunità per consigliare i pazienti riguardo al fenotipo obeso ad alto rischio cardiovascolare. Inoltre, la misurazione sia del BMI che della circonferenza della vita può fornire opportunità uniche per monitorare l'efficacia degli interventi proposti per gestire l'obesità e le malattie metaboliche correlate.

Prevalenza dell'obesità addomino-viscerale

Nonostante una forte associazione tra circonferenza della vita e BMI a livello della popolazione, i dati disponibili suggeriscono che la circonferenza della vita potrebbe aumentare oltre quanto previsto in base al BMI nelle varie popolazioni. In altre parole, il fenotipo dell'obesità potrebbe mutare nel tempo verso uno che riflette un aumento dell'adiposità addominale (13). Ad esempio, in un campione della popolazione canadese, nell'arco di 30 anni, per un determinato livello di BMI, i partecipanti presentavano una circonferenza della vita maggiore nel 2007 rispetto al 1981. In particolare, i ricercatori hanno osservato una circonferenza della vita che era maggiore di 1,1 cm negli uomini e 4,9 cm nelle donne, in presenza di un BMI di 25 kg/m^2 (quindi ai limiti superiori dell'intervallo di normalità) tra il 1981 e 2007 (14). Analogamente, Albrecht e Colleghi hanno esaminato i cambiamenti secolari nella circonferenza

della vita negli Stati Uniti (1988-2007), Inghilterra (1992-2008), Cina (1993-2011) e Messico (1999-2012) (15) e hanno riportato un aumento statisticamente significativo dei valori della circonferenza della vita rispetto al BMI in tutti i paesi studiati e nella maggior parte delle sottopopolazioni.

Secondo un'ampia revisione, la maggior parte dei dati suggerisce una tendenza in cui gli aumenti relativi della circonferenza della vita erano maggiori degli aumenti relativi del BMI, indipendentemente da età, sesso ed etnia (16). L'inadeguatezza del BMI nel rilevare un tale aumento dell'obesità addominale conferma i limiti del solo BMI per identificare il fenotipo dell'obesità che comporta il maggior rischio per la salute.

Circonferenza della vita e identificazione del fenotipo di obesità ad alto rischio cardiovascolare

Non sorprende che la circonferenza della vita e il BMI siano individualmente associati positivamente a morbilità e mortalità cardiovascolare (17) e per tutte le cause (18), indipendentemente da età, sesso e etnia, data la forte associazione tra queste variabili antropometriche nelle coorti. È però ben definito che, per ogni determinato BMI, la variazione nella circonferenza della vita è considerevole e, per qualsiasi livello di BMI, gli adulti con valore di circonferenza della vita più alto sono a maggior rischio per la salute rispetto con quelli con una circonferenza della vita inferiore (19-21). Questa osservazione è ben illustrata da Cerhan et al., che hanno raccolto i dati di 11 studi di coorte con 650.386 adulti bianchi negli Stati Uniti, Australia e Svezia di età compresa tra 20 e 83 anni. In questo studio, gli au-

tori hanno osservato che la circonferenza della vita era positivamente associata alla mortalità all'interno di ogni livello di BMI categoria esaminata, da 20 kg/m^2 a 50 kg/m^2 (9). Analogamente, una meta-analisi che coinvolgeva oltre 58.000 adulti prevalentemente bianchi provenienti da tutto il mondo ha concluso che, dopo correzione per età e fumo, la mortalità era sostanzialmente maggiore per quelli con una circonferenza della vita elevata, all'interno delle categorie normopeso, sovrappeso e obesità definite con il BMI (22). La capacità della circonferenza della vita di migliorare la accuratezza della previsione del rischio per la salute osservato all'interno di una data categoria di BMI fornisce la base per l'attuale sistema di classificazione utilizzato per caratterizzare il rischio per la salute correlato all'obesità (6). La piena forza dell'associazione tra la circonferenza della vita con morbilità e/o mortalità è quindi completamente realizzata con l'aggiustamento per il BMI (9, 10).

Osservazioni allineate con quelle sopraindicate, ottenute in soggetti in prevenzione cardiovascolare primaria e comunque sani, sono state anche raccolte in una coorte di 14.284 adulti con CVD, che sono stati seguiti per 2,3 anni, con un totale di 5.696 decessi. La coorte era divisa in terzili sia per la circonferenza della vita che per BMI. Rispetto al terzile più basso, la circonferenza della vita nel terzile più alto aveva un'associazione più elevata con il rischio di morte, dopo aggiustamento per età, sesso, fumo, diabete mellito, ipertensione e BMI (HR 1,29, 95% CI 1,20-1,39) (23). Al contrario, quando veniva considerato il valore di BMI, sempre dopo aggiustamento per età, sesso, fumo, diabete mellito, ipertensione e circonferenza della vita, la correlazione col rischio di morte era addirittura inver-

sa (HR 0,64, IC 95% 0,59-0,69) (23), indicando come un elevato BMI, aggiustato però per le variabili indicate, risultasse di per sé protettivo.

In sintesi, quando l'associazione tra circonferenza della vita e BMI con morbilità e mortalità è considerata in modelli continui, per una data circonferenza della vita, maggiore è il BMI minore è il rischio per la salute. Il motivo per cui l'associazione tra la circonferenza della vita e il rischio per la salute è aumentato in seguito all'aggiustamento per BMI non è ben chiaro, ma possono essere formulate alcune ipotesi.

L'effetto protettivo per la salute di un BMI maggiore per una data circonferenza della vita può essere spiegata da un aumento dell'accumulo del tessuto adiposo sottocutaneo nella parte inferiore del corpo (24), che si associa negativamente a intolleranza al glucosio e dislipidemia (25, 26).

Inoltre, la capacità di immagazzinare il consumo energetico in eccesso negli adipociti sottocutanei gluteo-femorali potrebbe proteggere dall'eccessiva deposizione di lipidi in nell'adiposo viscerale e in sedi ectopiche come il fegato, il cuore e il muscolo scheletrico, che è fortemente associato al rischio di CVD (25, 26). In sintesi, la combinazione di BMI e circonferenza della vita può identificare il fenotipo di obesità a più alto rischio meglio di entrambe le misure da sole. Sulla base delle osservazioni riportate sopra, la circonferenza della vita potrebbe essere altrettanto importante, se non più informativa, in persone con BMI nella norma o appena sopra tale soglia, dove una circonferenza della vita elevata è più probabile che significhi adiposità viscerale e aumento del rischio cardiometabolico, come può spesso riscontrarsi nelle persone anziane (27).

Significato clinico della misurazione della circonferenza addominale nella diagnosi e prognosi del rischio cardiovascolare

Per il clinico, la decisione di includere una nuova misura nella pratica clinica è guidata in gran parte da due domande importanti, ma molto diverse. La prima è se la misura o il biomarcatore migliori il rischio di previsione in una popolazione specifica per una specifica malattia. Ad esempio, se aggiungere un nuovo fattore di rischio migliori le prestazioni prognostiche di un consolidato algoritmo di previsione del rischio, come il Pooled Cohort Equazioni (PCE) o il Framingham Risk Score (FRS) o lo SCORE (ESC/EAS) (28) in adulti a rischio di CVD. La seconda domanda è se il miglioramento del nuovo indicatore di rischio possa portare a una corrispondente riduzione del rischio, ad esempio, di eventi cardiovascolari. In ogni caso, spesso anche se un biomarcatore non viene aggiunto al calcolo della previsione del rischio, può comunque servire come valido obiettivo per la riduzione del rischio stesso.

Circonferenza della vita e previsione del rischio

La valutazione dell'utilità di qualsiasi biomarcatore, come la circonferenza della vita, per la previsione del rischio di CVD richiede una conoscenza approfondita del contesto epidemiologico in cui si inserisce la valutazione del rischio stesso. Nel 2009, l'American Heart Association ha pubblicato un documento scientifico sui criteri richiesti per la valutazione di nuovi marcatori di rischio di CVD (29) e, successivamente, raccomandazioni per la valutazione del rischio cardiovascolare negli asintomatici adulti nel 2010 (30). Pertanto, per valutare in modo critico la circonferenza della vita come un nuovo biomarcatore da

utilizzare negli algoritmi di previsione del rischio, questi criteri rigorosi devono essere applicati. Numerosi studi dimostrano un'associazione statistica tra circonferenza della vita e mortalità e morbilità nelle coorti epidemiologiche. Ad esempio, una revisione sistematica con analisi di meta-regressione di 18 studi comprendente oltre 680.000 partecipanti europei con un massimo di 24 anni di follow-up ha dimostrato che la circonferenza della vita è stata associata con un aumento della morte per tutte le cause sopra valori di 95 cm per gli uomini e 80 cm per le donne (31). In particolare, l'aumento della circonferenza della vita al di sopra di queste soglie era associato ad un aumento del rischio relativo di morte per tutte le cause, anche tra i soggetti con BMI normale (20,0-24,9 kg/m²) (31).

Uno studio sul rischio di patologia aterosclerotica ha dimostrato che la circonferenza della vita era associata ad un aumento del rischio della malattia coronarica (553 eventi; RR 1,37, IC 95% 1,21-1,56), ma non a morte per tutte le cause (32). Nonostante l'esistenza di una solida associazione statistica con morte per tutte le cause indipendentemente dal BMI, non vi è però una prova solida che l'aggiunta della circonferenza della vita ai modelli standard di rischio cardiovascolare (come FRS o SCORE) migliori la previsione del rischio utilizzando di più rigorosi modelli statistici, confermando quanto l'aggiunta di qualsiasi biomarcatore possa con difficoltà migliorare sostanzialmente le prestazioni prognostiche. È stato stimato che i fattori di rischio non modificabili (età, sesso, etnia) da soli giustificano il 63-80% delle prestazioni prognostiche dei modelli di rischio cardiovascolare e che l'aggiunta di pressione sanguigna sistolica, livelli plasmatici di colesterolo non HDL, diabete mellito o fumo a un modello con altri

fattori di rischio ne aumenta le prestazioni prognostiche di molto poco (33).

Inoltre, qualsiasi valore additivo della circonferenza della vita per gli algoritmi di previsione del rischio potrebbe essere confuso da fattori di rischio causali posti a valle dell'aumento dell'adiposo viscerale (di cui la circonferenza della vita è un predittore), come pressione sanguigna elevata, livelli elevati di colesterolo LDL e concentrazioni plasmatiche anormali di glucosio. In altre parole, la circonferenza della vita potrebbe non migliorare le prestazioni prognostiche poiché, indipendentemente dal BMI, essa è un determinante principale delle alterazioni dei fattori di rischio cardiometabolici sopraindicati.

In sintesi, se la circonferenza della vita aggiunga qualcosa alle prestazioni prognostiche dei modelli di rischio cardiovascolare attuali rimane ancora da definire. Tuttavia, essa è un chiaro indicatore di livelli alterati di fattori e marker di rischio cardiometabolico. Di conseguenza, la riduzione della circonferenza della vita è un passaggio fondamentale nella riduzione del rischio cardiometabolico stesso, poiché offre un obiettivo pragmatico e semplice per la gestione del rischio del paziente (34).

Circonferenza della vita: reattività del parametro e utilità della sua riduzione

Numerose revisioni e meta-analisi confermano che, indipendentemente dall'età e dal sesso, una diminuzione dell'apporto energetico attraverso la dieta e/o un aumento del dispendio energetico attraverso l'esercizio fisico sono associati a una sostanziale riduzione della circonferenza della vita (35). Per gli studi in cui il bilancio energetico negativo è indotto dalla sola dieta, l'evidenza degli studi randomizzati controllati (RCT) suggerisce che la circonferenza della vita è ridotta indi-

pendentemente dalla composizione della dieta e dalla durata del trattamento (36). Non è chiaro se esista una relazione dose-risposta tra un bilancio energetico negativo indotto dalla dieta e la circonferenza della vita. Sebbene sia intuitivo suggerire che una maggiore quantità di esercizio potrebbe essere positivamente associata a corrispondenti riduzioni della circonferenza della vita, ad oggi questa nozione non è supportata dall'evidenza degli RCT (35). In un ampio studio RCT in cui i partecipanti (n=300) sono stati assegnati a un braccio di controllo o un braccio di intervento con diversi livelli di esercizio, il raddoppio del dispendio energetico indotto dall'esercizio non ha comportato una differenza nella riduzione della circonferenza della vita tra i gruppi di esercizi. Tuttavia, tutti i gruppi di intervento hanno ridotto significativamente la circonferenza della vita (~5 cm) rispetto al braccio di controllo (37). In altri studi basata sull'intervento con attività fisica è stata osservata una riduzione significativa della circonferenza della vita in tutti i gruppi con esercizio rispetto ai controlli senza esercizio, senza differenze tra i diversi livelli di attività prescritti (38). Alcuni RCT e meta-analisi hanno esaminato gli effetti dell'intensità dell'esercizio sulla circonferenza della vita (35) e in generale le differenze nell'intensità dell'esercizio non hanno influenzato l'entità della riduzione della circonferenza della vita, pur osservando sempre una riduzione di questo parametro (39). Inoltre, ad oggi sebbene sia ragionevole suggerire che una riduzione della circonferenza della vita sia associata a una riduzione della massa dell'adiposo viscerale, non è possibile una stima precisa della riduzione individuale dello stesso a partire dalla sola misurazione della circonferenza della vita. In ogni caso, la corrispondente riduzione di adiposo viscerale in parallelo con la cir-

BOX I**Misurazione della circonferenza della vita**

- La circonferenza della vita rappresenta la circonferenza minima tra la gabbia toracica e l'ombelico, con il soggetto in piedi e con i muscoli addominali rilassati.
- Usare un metro da sarto (quindi flessibile ma non estensibile) o analoghi metri a nastro.
- Il paziente deve stare in ortostatismo. Se è più comodo per l'operatore, il paziente può salire su una pedana bassa in modo da rendere più agevole la misurazione.
- Il paziente deve avere l'addome completamente scoperto da abiti.
- Il metro va usato tenendolo complanare al pavimento di appoggio.

conferenza della vita evidenzia l'importanza della misurazione di routine di questo parametro nella pratica clinica, anche in condizioni di esercizio fisico non associato a calo di peso rilevante.

Misurazione della circonferenza della vita

L'emergere della circonferenza della vita come un forte indicatore indipendente di morbilità e mortalità è abbastanza sorprendente dato che non vi è consenso riguardo al protocollo ottimale e con solide basi scientifiche per la misurazione della circonferenza della vita stessa.

Nel 2008, un gruppo di esperti ha eseguito una revisione sistematica di 120 studi per determinare se il protocollo di misurazione ha influenzato la relazione tra circonferenza della vita, morbilità e mortalità e ha osservato modelli simili di associazione tra i risultati e tutti i protocolli della circonferenza della vita per dimensioni del campione, sesso, età ed etnia (40). Dopo un'attenta revisione dei vari protocolli descritti in letteratura, il gruppo ha raccomandato che il protocollo della circonferenza della

vita descritto dalle linee guida dell'OMS (il punto medio tra il bordo inferiore della gabbia toracica e la cresta iliaca (il bordo superiore dell'ala dell'ileo) e le linee guida NIH (il bordo superiore della cresta iliaca) sono probabilmente misure più affidabili e fattibili sia per il medico che per il pubblico in generale (*vedi Box 1*).

Modalità di misurazione secondo NIH-NHANES*Immediatamente sopra la cresta iliaca*

(NIH e NHANES; Raccomandato nelle linee guida del National Institutes of Health (NIH) e utilizzato nel Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III) (41).

- Posizionare il metro intorno all'addome nudo, in modo che passi appena sopra le creste iliache.
- Assicurarsi che il metro sia parallelo al pavimento e teso, ma senza comprimere la pelle.
- Questa misurazione viene considerata un surrogato della misura del tessuto adiposo addominale.
- La circonferenza vita rappresenta la parte più stretta dell'addome e normalmente si trova appena al di sopra della porzione superiore del bordo laterale della cresta iliaca.
- Qualora tale zona non fosse ben evidente (obesità rilevante), la misura viene presa a livello dell'ombelico.

Modalità di misurazione secondo OMS*Punto intermedio tra ultima costa e cresta iliaca*

(OMS-WHO; Raccomandato in the World Health Organization (WHO) guidelines).

Posizionare il metro intorno all'addome nudo, a metà tra il bordo inferiore della

gabbia toracica e le creste iliache (bordo laterale) delle ossa del bacino, punto che di solito si trova all'altezza dell'ombelico.

Assicurarsi che il metro sia parallelo al pavimento e teso, ma senza comprimere la pelle.

Questa conclusione è stata fatta poiché entrambi i protocolli di misurazione della circonferenza della vita utilizzano punti di riferimento ossei per identificare la corretta posizione di misurazione della circonferenza della vita. Il gruppo di esperti ha riconosciuto che potrebbero esistere differenze nelle misure assolute della circonferenza della vita a causa della differenza nei protocolli tra i metodi OMS e NIH. Alcuni studi hanno confrontato le misure nei siti raccomandati dall'OMS e dall'NIH. In generale, sebbene l'adozione di un approccio standard alla misurazione della circonferenza della vita sarebbe importante, le stime di prevalenza dell'obesità addominale nelle popolazioni prevalentemente bianche utilizzando i protocolli della cresta iliaca o del punto medio non sembrano essere sostanzialmente differenti (41). Ad esempio, le stime di prevalenza dell'obesità addominale (qui definita come circonferenza della vita >88 cm per le donne e >102 cm per gli uomini) identificate utilizzando i protocolli della cresta iliaca e del punto medio erano di circa il 32% per entrambi i protocolli negli uomini e 47% e 41% per i protocolli cresta iliaca e punto medio, rispettivamente, nelle donne (42).

Diverse indagini hanno valutato la relazione tra circonferenza della vita misurata da sé e misurata dal tecnico (35). Si è osservato un buon accordo tra la circonferenza della vita misurata da sé e quella misurata dal tecnico, con forti coefficienti di correlazione compresi tra 0,8 e 0,9 sia per gli uomini che per le donne. Tuttavia, sia gli uomini che le donne tendono a sottostimare le misure della circonferenza della

vita rispetto ai valori misurati dal tecnico, con differenze comprese tra circa 1 cm e 3 cm. Inoltre, BMI elevato e una grande circonferenza della vita di base sono associati a un maggior grado di sottostima (43, 44). Nel complesso queste osservazioni sono incoraggianti e suggeriscono che le auto-misurazioni della circonferenza della vita possono essere ottenute in modo semplice e sono in buon accordo con i valori misurati dal tecnico, magari supportandole con video didattici.

Valori di soglia per stimare il rischio cardiovascolare e metabolico

Le attuali linee guida per l'identificazione dell'obesità indicano che il rischio per la salute aumenta quando si passa dal peso normale alle categorie superiori di BMI. Inoltre, all'interno di ciascuna categoria di BMI, gli individui con valori di circonferenza vita alta corrono un rischio maggiore rispetto a quelli con valori di circonferenza vita normali (45). La soglia per gli adulti bianchi (uomini >102 cm; donne >88 cm) è attualmente utilizzata per indicare una elevata circonferenza della vita, indipendentemente dalla categoria del BMI. Da notare che queste soglie specifiche per sesso sono state originariamente sviluppate utilizzando dati trasversali negli adulti bianchi, tra i quali una circonferenza della vita di 102 cm negli uomini e 88 cm nelle donne corrispondeva a un BMI di 30,0 kg/m², che è il BMI soglia per l'obesità (45). Pertanto, questi valori soglia della circonferenza della vita sono stati progettati per essere utilizzati al posto del BMI come un modo alternativo per identificare l'obesità e di conseguenza non sono stati sviluppati in base alla relazione tra la circonferenza della vita e il rischio per la salute. Per affrontare questa limitazione, Ardern et al.

Tabella 1 - Soglie per la circonferenza della vita (46).

Categoria di BMI (kg/m ²)	Circonferenza vita (cm)*	
	Donne	Uomini
Peso normale (18,5-24,9)	≥80	≥90
Sovrappeso (25-29,9)	≥90	≥100
Obesità I grado (30-34,9)	≥105	≥110
Obesità II e III grado (≥35)	≥115	≥125

La tabella fornisce le soglie della circonferenza della vita stratificate per BMI per individui caucasici; individui con misurazioni superiori a questi valori hanno un alto rischio di futuri eventi coronarici (basato sul rischio a 10 anni di eventi coronarici o presenza di diabete mellito).

hanno sviluppato e convalidato in modo incrociato soglie di circonferenza della vita all'interno delle categorie di BMI in relazione al rischio stimato di CVD future (utilizzando FRS) (*Tabella 1*) (46).

*Circonferenza della vita-soglia che indica un aumento del rischio per la salute all'interno di ciascuna categoria di BMI.

Valori specifici per etnia per la circonferenza della vita ottimizzati per l'identificazione di soggetti con elevato rischio di CVD sono riportati in *Tabella 2*. Con poche eccezioni, i valori presentati nella *Tabella 2* sono stati derivati utilizzando dati trasversali e non sono stati considerati in associazione con BMI. La gamma di valori di circonferenza della vita ad alto rischio per entram-

bi gli uomini adulti (80-98 cm) e le donne (80-96 cm) variano notevolmente tra le etnie, il che conferma la necessità di valori di circonferenza della vita specifici per etnia (47). Dovranno quindi essere effettuati studi prospettici per definire soglie di circonferenza della vita specifiche per ogni fascia di BMI anche in base alle diverse etnie.

Considerazioni conclusive

La raccomandazione principale di questa rassegna è che la circonferenza della vita dovrebbe essere misurata di routine nella pratica clinica, in quanto può fornire informazioni aggiuntive per guidare la gestione del paziente. In effetti, decenni di ricerca hanno prodotto prove inequivocabili che la circonferenza della vita fornisce informazioni sia indipendenti che aggiuntive al BMI per la previsione di morbilità e mortalità, soprattutto in ambito cardiovascolare.

Sulla base di queste osservazioni, non includere la misurazione della circonferenza della vita nella pratica clinica di routine significa escludere un approccio ottimale per stratificare i pazienti in base al rischio. La misurazione della circonferenza della vita in contesti clinici è importante e fattibile. L'automisurazione della circonferenza della vita è facilmente ottenibile e in buon accordo con la circonferenza della vita misurata dal tecnico. Numerosi studi epidemiologici e RCT hanno ora dimostrato che una riduzione della circonferenza della vita può essere ottenuta con esercizio fisico di routine di intensità moderata e/o miglioramenti della nutrizione.

Su questo tema, studi futuri contribuiranno a chiarire alcuni aspetti ancora poco definiti, con il perfezionamento dei valori soglia della circonferenza della vita per una data categoria di BMI in età diverse, per sesso e per etnia.

Tabella 2 - Circonferenza della vita: soglie specifiche per gruppo etnico (35).

Giapponese	uomini ≥85	donne ≥90
Giordano	uomini ≥98	donne ≥96
Cinese	uomini ≥80	donne ≥80
Coreano	uomini ≥90	donne ≥85
Tunisino	uomini ≥85	donne ≥85
Iraniano	uomini ≥89	donne ≥91
Indiano (Asia)	uomini ≥90	donne ≥80

I valori, espressi in cm, sono soglie al di sopra delle quali il volume del tessuto adiposo viscerale è >100 cm³.

Questionario di auto-apprendimento

- 1) La prevalenza globale dell'obesità addominale misurata con la circonferenza della vita è:**
- in diminuzione
 - in aumento
 - invariata
 - non ci sono dati al riguardo
- 2) L'utilità di un'unica soglia di circonferenza della vita per gli adulti (uomini >102 cm; donne >88 cm) per indicare una circonferenza della vita aumentata, indipendentemente dalla fascia di BMI di appartenenza:**
- risulta abbastanza limitata se non correlata alla categoria di BMI
 - è sufficientemente precisa nella descrizione del rischio cardiovascolare
 - non è di alcuna utilità
 - b) + c)
- 3) Le differenze assolute nella circonferenza della vita ottenute dai due protocolli più utilizzati, la cresta iliaca (NIH) e il punto medio tra l'ultima costola e la cresta iliaca (OMS), sono:**
- nulle (non ci sono differenze)
 - grandi per gli uomini e per le donne
 - piccole per gli uomini e per le donne
 - generalmente piccole per gli uomini ma maggiori per le donne
- 4) L'esercizio e/o la dieta coerenti con le raccomandazioni delle linee guida sono associati a:**
- riduzioni sostanziali della circonferenza della vita, solo nella donna
 - aumenti sostanziali della circonferenza della vita, indipendentemente dall'età
 - a riduzioni sostanziali della circonferenza della vita, indipendentemente da età, sesso o etnia
 - a minime o nulle variazioni della circonferenza della vita
- 5) La regolare misurazione della circonferenza della vita da parte dei professionisti:**
- è fortemente raccomandata, perché fornisce una semplice misura antropometrica per determinare l'efficacia delle strategie basate sullo stile di vita per ridurre l'obesità addominale
 - va effettuata solo se ritenuto utile in specifici pazienti in prevenzione cardiovascolare secondaria
 - non è raccomandata su base regolare in quanto non è inserita nei calcolatori del rischio cardiovascolare
 - va effettuata solo a discrezione del professionista

Risposte corrette: 1b; 2a, 3d; 4c, 5a

RIASSUNTO

L'obesità, soprattutto quella caratterizzata da accumulo di adiposità addomino-viscerale, è associata ad un importante aumento del rischio di malattie cardiovascolari e metaboliche. È interessante osservare come in vari paesi la prevalenza di sovrappeso e obesità si sia stabilizzata o sia in moderato aumento se valutati mediante il BMI. Tuttavia, se li valutiamo mediante la misurazione della circonferenza della vita, se ne osserva un importante aumento, suggerendo che di fatto ciò che è aumentato nella popolazione è l'obesità addominale. Questo parametro antropometrico fornisce, rispetto al BMI, una migliore stima dell'accumulo di adiposità viscerale, che a sua volta, a causa di una serie di alterazioni metaboliche, ormonali e infiammatorie, è un potente promotore della patologia vascolare aterotrombotica. La misurazione della circonferenza della vita dovrebbe quindi essere inserita nella regolare pratica clinica, per motivi diagnostici e prognostici.

Tra i suoi punti di forza vi è la semplicità della misurazione, il suo valore diagnostico e prognostico e la possibilità di utilizzarlo per monitorare l'efficacia di un intervento sugli stili di vita, soprattutto in relazione ad attività fisica e nutrizione. Tra le attuali limitazioni della circonferenza della vita, vi sono il fatto che ad oggi non è stato ancora possibile inserirla nei calcolatori del rischio cardiovascolare e che la complessa interazione BMI-circonferenza della vita richiede ulteriori studi, anche in considerazione delle variazioni etniche. In sintesi, pur con alcuni aspetti da chiarire, la circonferenza della vita è oggi un importante parametro da valutare regolarmente nella pratica clinica, soprattutto in area cardiovascolare e metabolica.

Parole chiave: *Rischio cardiovascolare, circonferenza addominale, adiposo viscerale, infiammazione cronica di basso grado, obesità.*

Bibliografia

1. Ng M, Fleming T, Robinson M, et al. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet.* 2014; 384: 766-781.
2. Afshin A, Forouzanfar MH, Reitsma MB, et al. Health Effects of Overweight and Obesity in 195 Countries over 25 Years. *N Engl J Med.* 2017; 377: 13-27.
3. Phillips CM. Metabolically healthy obesity across the life course: epidemiology, determinants, and implications. *Ann N Y Acad Sci.* 2017; 1391: 85-100.
4. Bell JA, Hamer M, Sabia S, et al. The natural course of healthy obesity over 20 years. *J Am Coll Cardiol.* 2015; 65: 101-102.
5. Eckel N, Meidtner K, Kalle-Uhlmann T, et al. Metabolically healthy obesity and cardiovascular events: A systematic review and meta-analysis. *Eur J Prev Cardiol.* 2016; 23: 956-966.
6. Jensen MD, Ryan DH, Apovian CM, et al. Guidelines ACoCAHATFoP, Society O: 2013 AHA/ACC/TOS guideline for the management of overweight and obesity in adults: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines and The Obesity Society. *Circulation.* 2014; 129: S102-138.
7. Tsigos C, Hainer V, Basdevant A, et al. Obesity OMTFotEAfSo: Management of obesity in adults: European clinical practice guidelines. *Obes Facts.* 2008; 1: 106-116.
8. Pischedda T, Boeing H, Hoffmann K, et al. General and abdominal adiposity and risk of death in Europe. *N Engl J Med.* 2008; 359: 2105-2120.
9. Cerhan JR, Moore SC, Jacobs EJ, et al. A pooled analysis of waist circumference and mortality in 650,000 adults. *Mayo Clin Proc.* 2014; 89: 335-345.
10. Zhang C, Rexrode KM, van Dam RM, et al. Abdominal obesity and the risk of all-cause, cardiovascular, and cancer mortality: sixteen years of follow-up in US women. *Circulation.* 2008; 117: 1658-1667.
11. Seidell JC. Waist circumference and waist/hip ratio in relation to all-cause mortality, cancer and sleep apnea. *Eur J Clin Nutr.* 2010; 64: 35-41.
12. Ross R, Neeland IJ, Yamashita S, et al. Waist circumference as a vital sign in clinical practice: a Consensus Statement from the IAS and ICCR Working Group on Visceral Obesity. *Nat Rev Endocrinol.* 2020; 16: 177-189.
13. Walls HL, Wolfe R, Haby MM, et al. Trends in BMI of urban Australian adults, 1980-2000. *Public Health Nutr.* 2010; 13: 631-638.
14. Janssen I, Shields M, Craig CL, et al. Changes in the obesity phenotype within Canadian children and adults, 1981 to 2007-2009. *Obesity (Silver Spring).* 2012; 20: 916-919.
15. Albrecht SS, Gordon-Larsen P, Stern D, Popkin BM. Is waist circumference per body mass index rising differentially across the United States, England, China and Mexico? *Eur J Clin Nutr.* 2015; 69: 1306-1312.
16. Visscher TL, Heitmann BL, Rissanen A, et al. A break in the obesity epidemic? Explained by biases or misinterpretation of the data? *Int J Obes (Lond).* 2015; 39: 189-198.
17. Song X, Jousilahti P, Stehouwer CD, et al. Comparison of various surrogate obesity indicators as predictors of cardiovascular mortality in four European populations. *Eur J Clin Nutr.* 2013; 67: 1298-1302.
18. Jacobs EJ, Newton CC, Wang Y, et al. Waist circumference and all-cause mortality in a large US cohort. *Arch Intern Med.* 2010; 170: 1293-1301.

19. Rexrode K, Carey V, Hennekens CH, et al. Abdominal adiposity and coronary heart disease in women. *JAMA*. 1998; 280: 1843-1848.
20. Després JP. Excess visceral adipose tissue/ectopic fat the missing link in the obesity paradox? *J Am Coll Cardiol*. 2011; 57: 1887-1889.
21. Zhang X, Shu XO, Yang G, et al. Abdominal adiposity and mortality in Chinese women. *Arch Intern Med*. 2007; 167: 886-892.
22. de Hollander EL, Bemelmans WJ, Boshuizen HC, et al. The association between waist circumference and risk of mortality considering body mass index in 65- to 74-year-olds: a meta-analysis of 29 cohorts involving more than 58 000 elderly persons. *Int J Epidemiol*. 2012; 41: 805-817.
23. Coutinho T, Goel K, Corrêa de Sá D, et al. Central obesity and survival in subjects with coronary artery disease: a systematic review of the literature and collaborative analysis with individual subject data. *J Am Coll Cardiol*. 2011; 57: 1877-1886.
24. Després JP, Lemieux I. Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature*. 2006; 444: 881-887.
25. Snijder MB, Visser M, Dekker JM, et al. Low subcutaneous thigh fat is a risk factor for unfavourable glucose and lipid levels, independently of high abdominal fat. *The Health ABC Study*. *Diabetologia*. 2005; 48: 301-308.
26. Eastwood SV, Tillin T, Wright A, et al. Thigh fat and muscle each contribute to excess cardiometabolic risk in South Asians, independent of visceral adipose tissue. *Obesity (Silver Spring)*. 2014; 22: 2071-2079.
27. Janssen I, Katzmarzyk P, Ross R. Body mass index is inversely related to mortality in older people after adjustment for waist circumference. *J Am Geriatr Soc*. 2005; 53: 2112-2118.
28. Mach F, Baigent C, Catapano AL, et al. 2019 ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: lipid modification to reduce cardiovascular risk. *Eur Heart J*. 2019.
29. Hlatky MA, Greenland P, Arnett DK, et al. Criteria for evaluation of novel markers of cardiovascular risk: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation*. 2009; 119: 2408-2416.
30. Greenland P, Alpert JS, Beller GA, et al. 2010 ACCF/AHA guideline for assessment of cardiovascular risk in asymptomatic adults: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation*. 2010; 122: e584-636.
31. Carmienke S, Freitag MH, Pischedl T, et al. General and abdominal obesity parameters and their combination in relation to mortality: a systematic review and meta-regression analysis. *Eur J Clin Nutr*. 2013; 67: 573-585.
32. Hong Y, Jin X, Mo J, et al. Metabolic syndrome, its preeminent clusters, incident coronary heart disease and all-cause mortality-results of prospective analysis for the Atherosclerosis Risk in Communities study. *J Intern Med*. 2007; 262: 113-122.
33. Pencina MJ, Navar AM, Wojdyla D, et al. Quantifying Importance of Major Risk Factors for Coronary Heart Disease. *Circulation*. 2019; 139: 1603-1611.
34. Neeland IJ, Ross R, Després JP, et al. Visceral and ectopic fat, atherosclerosis, and cardiometabolic disease: a position statement. *The lancet Diabetes & endocrinology*. 2019; 7.
35. Ross R, Neeland IJ, Yamashita S, et al. Waist circumference as a vital sign in clinical practice: a Consensus Statement from the IAS and ICCR Working Group on Visceral Obesity. *Nature reviews Endocrinology*. 2020; 16.
36. Sacks FM, Bray GA, Carey VJ, et al. Comparison of weight-loss diets with different compositions of fat, protein, and carbohydrates. *N Engl J Med*. 2009; 360: 859-873.
37. Ross R, Hudson R, Stotz PJ, Lam M. Effects of exercise amount and intensity on abdominal obesity and glucose tolerance in obese adults: a randomized trial. *Ann Intern Med*. 2015; 162: 325-334.
38. Church TS, Earnest CP, Skinner JS, Blair SN. Effects of different doses of physical activity on cardiorespiratory fitness among sedentary, overweight or obese postmenopausal women with elevated blood pressure: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2007; 297: 2081-2091.
39. Wewege M, van den Berg R, Ward R, Keech A. The effects of high-intensity interval training vs. moderate-intensity continuous training on body composition in overweight and obese adults: a systematic review and meta-analysis. *Obes Rev*. 2017; 18: 635-646.
40. Ross R, Berentzen T, Bradshaw AJ, et al. Does the relationship between waist circumference, morbidity and mortality depend on measurement protocol for waist circumference? *Obes Rev*. 2008; 9: 312-325.
41. Wang J, Thornton JC, Bari S, et al. Comparisons of waist circumferences measured at 4 sites. *Am J Clin Nutr*. 2003; 77: 379-384.
42. Mason C, Katzmarzyk PT. Variability in waist circumference measurements according to

- anatomic measurement site. *Obesity* (Silver Spring). 2009; 17: 1789-1795.
43. Spencer EA, Roddam AW, Key TJ. Accuracy of self-reported waist and hip measurements in 4492 EPIC-Oxford participants. *Public Health Nutr.* 2004; 7: 723-727.
 44. Bigaard J, Spanggaard I, Thomsen BL, et al. Self-reported and technician-measured waist circumferences differ in middle-aged men and women. *J Nutr.* 2005; 135: 2263-2270.
 45. Janssen I, Katzmarzyk PT, Ross R. Body mass index, waist circumference, and health risk: evidence in support of current National Institutes of Health guidelines. *Arch Intern Med.* 2002; 162: 2074-2079.
 46. Bajaj HS, Brennan DM, Hoogwerf BJ, et al. Clinical utility of waist circumference in predicting all-cause mortality in a preventive cardiology clinic population: a PreCIS Database Study. *Obesity* (Silver Spring). 2009; 17: 1615-1620.
 47. Staiano AE, Bouchard C, Katzmarzyk PT. BMI-specific waist circumference thresholds to discriminate elevated cardiometabolic risk in White and African American adults. *Obes Facts.* 2013; 6: 317-324.

MEDICINA, SCIENZA E SOCIETÀ

COVID E CUORE: LE MOLTE FACCE DEL PROBLEMA

COVID and heart: the many sides of the problem

**GIANFRANCO SINAGRA, VINCENZO NUZZI, MATTEO DAL FERRO,
MARCO MERLO**

*SC Cardiologia, Dipartimento Cardiotoracovascolare, Azienda Sanitaria Universitaria
Giuliano Isontina, Università di Trieste*

Tra la fine del 2019 e l'inizio del 2020 si è assistito al diffondersi progressivo di una nuova epidemia, dovuta ad un virus appartenente alla famiglia dei Coronaviridae, denominato Coronavirus della SARS2 (SARS-CoV-2). Il COronaVIrus Disease 19 (COVID-19) è la conseguente possibile manifestazione clinica. L'organizzazione del Sistema Sanitario, insieme a tanti altri aspetti della vita quotidiana, è cambiata radicalmente e i cardiologi hanno dovuto fronteggiare quotidianamente situazioni precedentemente non contemplate (1).

Oltre la sindrome respiratoria: danno miocardico

Il principale bersaglio dell'infezione di SARS-CoV-2 è costituito da cellule dell'apparato respiratorio, testimoniato dall'elevata frequenza di necessità di supporto con ossigenoterapia tra i soggetti sintomatici. Tuttavia, non sono trascurabili i legami tra il virus e l'apparato cardiovascolare. Un primo legame risiede nell'associazione tra le malattie cardiache preesistenti, inclusi i fattori di rischio cardiovascolari quale l'ipertensione arteriosa, e la prognosi dei pazienti ricoverati per polmonite in corso di infezione da SARS-CoV-2. Tuttavia, la connessione SARS-CoV-2 - cuore di maggior interesse è il coinvolgimento cardiologico de novo durante l'ospedalizzazione per COVID-19 (*Tabella 1*). Questo fenomeno può essere espresso, dal punto di vista clinico, in diversi modi, ma quello con il maggior grado di evidenza è il rilascio di biomarkers indicativi di danno miocardico. Infatti, la quota di pazienti ospedalizzati per COVID-19 con livelli di troponina plasmatici elevati, cioè con cosiddetta "myocardial injury", è ben rappresentata, sfiorando il 45% del totale in alcune coorti (2). Questo dato è stato confermato in tutte le coorti di popolazioni studiate, comprendenti dunque diverse etnie, con diversi profili di comorbidità e

Indirizzo per la corrispondenza

Gianfranco Sinagra
SC Cardiologia, Dipartimento
Cardiotoracovascolare, Azienda Sanitaria
Giuliano-Isontina (ASUGI)
Università Degli Studi di Trieste
Via Pietro Valdoni, 7
34100 Trieste
gianfranco.sinagra@asugi.sanita.fvg.it

Tabella I - Tabella riassuntiva dei principali studi di coinvolgimento cardiaco in COVID-19.

	Popolazione	Espressione cardiaca del danno	Risultati principali
Guo et al.	187 cinesi	Incremento troponinico	Il danno miocardico predice l'outcome, mentre le comorbidità cardiovascolari in assenza di incremento troponinico non pregiudicano l'outcome
Carubelli et al.	614 italiani	Incremento troponinico	45% ha danno miocardico; l'incremento troponinico predice l'outcome a prescindere dal background cardiovascolare
Lala et al.	2736 americani	Incremento troponinico	Il rilascio troponinico in genere è di entità contenuta, ma anche a basse concentrazioni ha peso rilevante sull'outcome
Stefanini et al.	397 italiani	Incremento troponinico e/o del BNP	23% ha BNP aumentato, l'incremento del BNP è un fattore prognostico indipendente, a prescindere dalla diagnosi di scompenso cardiaco
Inciardi et al.	1 paziente affetto da miocardite	Miocardite	L'infiammazione cardiaca da miocardite COVID-relata è un'entità possibile

diversa età media, pertanto può ritenersi molto solido (3, 4). A questo riguardo, la più elevata quota di pazienti con danno miocardico emerso nella popolazione italiana (45%), riflette il peso delle caratteristiche di base dei pazienti italiani inclusi nello studio nel rischio di sviluppare coinvolgimento cardiaco durante l'infezione (2). Di notevole interesse, è la frequente assenza di qualsiasi manifestazione clinica di coinvolgimento cardiaco, pur in presenza di elevati livelli di troponina nel plasma. È stato ampiamente dimostrato che coloro che manifestano un incremento del livello sierico di troponina al momento del ricovero hanno un maggior rischio di *outcome* intraospedaliero sfavorevole (2, 3). In un ampio studio multicentrico italiano (2) la presenza di biomarcatori di danno miocardico è risultata essere un fattore prognostico negativo, anche dopo aggiustamento per altre variabili di rilievo, tra cui anamnesi positiva per coronaropatia, scompenso cardiaco cronico e fibrillazione atriale. Un'ulteriore conferma del ruolo prognostico della troponina plasmatica in pazienti ricoverati per COVID-19 è rap-

presentata dall'aumentato rischio di complicanze, quali sepsi, *multiorgan failure* ed embolia polmonare, in assenza di una chiara acuzie cardiologica (2). Non è chiaro se il rilascio troponinico rappresenti un fattore causale diretto nel determinare la prognosi, oppure un marker che identifica pazienti affetti da una forma più severa della malattia (maggiore necessità di ossigenoterapia e prevalenza di insufficienza multiorgano nei pazienti con *myocardial injury*) (2). In questo senso, le evidenze suggeriscono che, insieme agli altri parametri, la ricerca dei biomarcatori di danno miocardico al momento del ricovero possa migliorare la stratificazione prognostica e permettere di individuare i pazienti a maggior rischio di morte intraospedaliera (3, 4).

La complessa interazione tra COVID-19 e sistema antineurormonale

Un altro *biomarker* espressione del coinvolgimento cardiologico in pazienti affetti da COVID-19 è costituito dai pep-

tidi natriuretici. In questo campo, è stato riportato che la quota di pazienti con incremento del BNP o dell'NTproBNP non è trascurabile, così come il peso prognostico di questo *biomarker* (5). Ad ogni modo, non è chiaro il motivo e, di conseguenza, l'interpretazione e l'eventuale necessità di terapia specifica in caso di incremento dei peptidi natriuretici. Infatti, la diagnosi di scompenso cardiaco acuto è sicuramente poco agevole in questo *setting*, dal momento che molti segni e sintomi, quali dispnea, linee B all'ecografia polmonare e vena cava inferiore dilatata possono essere ascrivibili sia all'infezione, sia alla ventilazione meccanica, sia ad un eventuale scompenso cardiaco acuto.

Meccanismi di danno miocardico

Incremento teorico dei recettori ACE-2

I meccanismi che sono stati individuati come possibili responsabili del danno miocardico e, quindi, dell'impatto prognostico, sono molteplici. Uno dei meccanismi maggiormente chiamati in causa è il legame tra le particelle virali ed il recettore ACE2. Questo meccanismo biologico è stato al centro di numerosi dibattiti che hanno ipotizzato possibili problemi di sicurezza nell'utilizzo degli antipertensivi inibitori dell'ACE e degli antagonisti dei recettori dell'angiotensina II (6). Infatti, dal punto di vista teorico, l'utilizzo in cronico di questi farmaci, che si legano ed inibiscono il recettore ACE1, determina un incremento compensatorio dell'espressione di recettori ACE2. Intuitivamente sarebbe possibile speculare che questo fenomeno favorisca l'ingresso del virus all'interno delle cellule ospite e, di conseguenza, favorisca l'infezione. Inoltre, l'aumentata incidenza di *outcome* sfavorevole tra i pazienti ipertesi ha inizialmente alimentato questi dubbi. Tali

ipotesi non sono state tuttavia confermate nelle corti di pazienti studiati e la Società Europea di Cardiologia, attraverso uno *statement* ufficiale ha dichiarato sicura l'assunzione di ACE-inibitori e sartani sia al di fuori dell'infezione che durante l'ospitalizzazione per COVID-19 (7).

Coinvolgimento cardiaco come parte della sindrome infiammatoria

Un altro meccanismo additato come possibile responsabile del danno miocardico è la sindrome infiammatoria sistematica (SIRS) propria dei pazienti COVID-19. La tempesta citochinica, infatti, può essere responsabile di un'infiammazione coinvolgente anche le cellule miocardiche. Ne consegue una quota di miocardio depressione e miocardio necrosi e, quindi, un incremento dei valori plasmatici di troponina (8).

Il danno diretto del SARS-CoV-2 sul cuore

Un ulteriore meccanismo che potrebbe sottostare al danno miocardico in corso di infezione da SARS-CoV-2 è il danno miocarditico diretto, dovuto all'infezione del miocardiocita da parte di SARS-CoV-2. Tuttavia, questo meccanismo fisiopatologico al momento rimane speculativo ed epidemiologicamente non rilevante, dal momento che su riscontri autoptici non è mai stato possibile dimostrare la presenza di SARS-CoV-2 all'interno delle cellule miocardiche. A tal proposito, meccanismi di infiammazione diretta specificatamente contro il cuore, determinanti miocarditi acute, sono stati riportati (8), anche con evidenza di particelle virali morfologicamente compatibili con il coronavirus nell'interstizio miocardico, al di fuori dei miocardiociti (9). Si tratta di un ambito di particolare interesse, che necessita di ulteriore ricerca per conoscerne al meglio manifestazioni ed esiti.

COVID e allerta sulle aritmie

Ciò che al momento non è noto è l'eventuale possibilità che l'infezione da SARS-CoV-2 possa agire da *trigger* su aritmie ventricolari o sopraventricolari. In questo senso, merita sicuramente attenzione particolare l'utilizzo di farmaci che possono creare un substrato aritmogeno, nello specifico allungando il QTc. In particolare, farmaci ampiamente utilizzati nelle prime fasi della pandemia, quali l'azitromicina e l'idrossiclorochina, necessitano di un attento monitoraggio ECG, come raccomandato dalla Società Italiana di Cardiologia.

Possibili reliquati dopo la fase acuta

Ultimo punto di interesse cardiologico è rappresentato dai possibili reliquati cardiologici nei pazienti guariti da COVID-19. Questo aspetto è stato esplorato in una piccola coorte cinese di Wuhan (10) che è stata sottoposta, dopo essere guarita e dimessa, ad un esame di risonanza magnetica cardiaca per l'insorgenza di sintomi cardiologici (dispnea, cardiopalmo). Il risultato di maggior interesse e che richiederà ulteriori verifiche è la presenza di edema miocardico in una quota non trascurabile, nel 58%, di questi pazienti. Questo risultato merita di essere seguito nel tempo per verificare se possa avere rilevanza clinica ed un significato prognostico. Non va inoltre sottovalutata la possibilità di fibrosi interstiziali polmonari ed ipertensione polmonare, aspetti questi ultimi da monitorare.

Sintesi

L'insufficienza respiratoria acuta configurata dalla SARS CoV2 può determina-

re danno miocardico ipossico, testimoniato dal rilascio di biomarcatori come la troponina I ed i peptidi natriuretici. Ciò è particolarmente frequente quando i profili di comorbidità condizionano coronaropatie o ipertrofia miocardica o cardiopatie di varia eziologia. Non vanno sottovalutati gli effetti sul miocardio di alcune terapie attuate nelle prime fasi dell'epidemia. La tempesta citochinica e lo stato settico possono avere un ruolo nel danno miocardico. La miocardite direttamente mediata da COVID-19 (mictolisi virale) risulta essere un evento raro, epidemiologicamente non rilevante. Da non sottovalutare il rischio di aritmie che riconoscono vari meccanismi. Anche il sovraccarico ventricolare destro da embolia polmonare va considerato fra le cause di danno miocardico. SARS-CoV-2 ha infine posto lo scenario di malattie cardiovascolari acute efficacemente curabili, purtroppo ospedalizzate tardivamente come l'infarto miocardico, i blocchi atrioventricolari, le endocarditi batteriche protratte, lo scompenso cardiaco, la fibrillazione atriale. Si tratta di condizioni con esiti usualmente contenuti, se tempestivamente ospedalizzate, che in *lockdown* per SARS-CoV-2 sono state tardivamente identificate e trattate, condizionando una maggior mortalità ed esiti residui.

Bibliografia

1. Driggin E, Madhavan MV, Bikdelli B, et al. Cardiovascular Considerations for Patients, Health Care Workers, and Health Systems During the COVID-19 Pandemic. *J Am Coll Cardiol.* 2020; 75.
2. Lombardi CM, Carubelli V, Iorio A, et al. Association of Troponin Levels With Mortality in Italian Patients Hospitalized With Coronavirus Disease 2019: Results of a Multicenter Study. *JAMA Cardiol.* Published online. 2020.
3. Lala A, Johnson KW, Januzzi JL, et al. Mount

- Sinai Covid Informatics Center. Prevalence and impact of myocardial injury in patients hospitalized with COVID-19 infection. *J Am Coll Cardiol.* 2020; S0735-1097: 35552-2.
4. Guo T, Fan Y, Chen M, et al. Cardiovascular Implications of Fatal Outcomes of Patients With Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *JAMA Cardiol.* 2020; 5: 811-818.
 5. Stefanini GG, Chiarito M, Ferrante G. On behalf of the Humanitas COVID-19 Task Force, et al. Early detection of elevated cardiac biomarkers to optimise risk stratification in patients with COVID-19. *Heart.* 2020; 106: 1512-1518.
 6. Aleksova A, Ferro F, Gagno G, et al. COVID-19 and renin-angiotensin system inhibition: role of angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) - Is there any scientific evidence for controversy? *J Intern Med.* 2020; 288: 410-421.
 7. [https://www.escardio.org/Councils/Council-on-Hypertension-\(CHT\)/News/position-statement-of-the-esc-council-on-hypertension-on-ace-inhibitors-and-ang](https://www.escardio.org/Councils/Council-on-Hypertension-(CHT)/News/position-statement-of-the-esc-council-on-hypertension-on-ace-inhibitors-and-ang).
 8. Inciardi RM, Lupi L, Zaccone G, et al. Cardiac Involvement in a Patient With Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *JAMA Cardiol.* 2020; 5: 819-824.
 9. Tavazzi G, Pellegrini C, Maurelli M, et al. Myocardial localization of coronavirus in COVID-19 cardiogenic shock. *Eur J Heart Fail.* 2020; 22: 911-915.
 10. Huang L, Zhao P, Tang D, et al. Cardiac Involvement in Patients Recovered From COVID-2019 Identified Using Magnetic Resonance Imaging (published online ahead of print, 2020 May 12). *JACC Cardiovasc Imaging.* 2020; S1936-878X(20)30403-4.

NOTIZIE DALL'EAS 2020**EAS 2020****MANUELA CASULA**

SEFAP - Servizio di Epidemiologia e Farmacologia Preventiva,
Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano

Nel mese di ottobre 2020, in un innovativo formato virtuale reso necessario dalla recente pandemia, si è tenuto l'88esimo meeting annuale dell'European Atherosclerosis Society (EAS). Tra gli argomenti discussi durante il congresso, le più recenti evidenze dagli studi sui farmaci ipolipemizzanti e le basi molecolari dei disordini del metabolismo lipidico.

**Quanto sono diverse - o simili
- le linee guida sui lipidi europee
e statunitensi?**

Una delle sessioni congiunte, tra EAS e NLA (National Lipid Association), ha analizzato somiglianze e differenze delle più recenti versioni europea e americana delle linee guida per la prevenzione cardiovascolare attraverso il controllo lipidico. La via europea è fortemente basata sulle evidenze che sostengono il ruolo causale delle lipoproteine a bassa densità (LDL) nella malattia cardiovascolare aterosclerotica (ASCVD). I dati da studi osservazionali e genetici, così come da studi controllati randomizzati, hanno dimostrato che la relazione tra LDL e ASCVD è continua e causale

in tutto il range di livelli di colesterolo LDL (c-LDL). Inoltre, negli studi clinici è stata riscontrata una correlazione dose-risposta costante tra l'abbassamento del c-LDL e il beneficio clinico, che si estende fino ai livelli di c-LDL molto bassi raggiunti con gli inibitori di PCSK9, senza alcun apparente compromesso tra sicurezza ed efficacia. Queste evidenze hanno fornito un quadro scientifico per la definizione degli obiettivi terapeutici di c-LDL, e gli studi con gli inibitori di PCSK9 hanno supportato l'abbassamento degli obiettivi di c-LDL a livelli più stringenti nelle linee guida ESC EAS 2019. Le evidenze scientifiche supportano un approccio pragmatico: gli individui a più alto rischio e con i più alti livelli di c-LDL, nonostante la terapia con statine, meritano chiaramente l'aggiunta di un secondo agente ipolipemizzante. Infine, sebbene attualmente non ci siano obiettivi di trattamento per i trigliceridi e il colesterolo HDL, il rischio residuo associato è integrato negli obiettivi secondari previsti per colesterolo non HDL e apolipoproteina B.

Indirizzo per la corrispondenza

Manuela Casula
SEFAP, Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano
Via Balzaretti, 9 - 20133 Milano
E-mail: manuela.casula@unimi.it

D'altra parte, nel 2015, la NLA ha raccomandato una gestione della dislipidemia centrata sul paziente, con obiettivi mirati a garantire che l'intensità del trattamento rispecchi il rischio assoluto. Nelle linee guida ACC/AHA del 2018, i pazienti ad alto rischio sono stati ulteriormente classificati come a rischio molto alto, in base alla presenza di ASCVD; ulteriori "potenziatori del rischio" includevano, tra gli altri fattori, la lipoproteina(a) >50 mg/dL. Ciò ha consentito alle linee guida di introdurre soglie di c-LDL per l'aggiunta di una terapia non statinica, ezetimibe prima e inibitore del PCSK9 poi. Entrambe le linee guida europee e statunitensi concordano sugli obiettivi chiave: colesterolo LDL e colesterolo non HDL. Sebbene la terminologia possa differire, entrambi hanno una strategia coerente per considerare la terapia aggiuntiva alle statine nei pazienti a rischio alto e molto alto. Inoltre, entrambe concordano sul fatto che non ci sono problemi di sicurezza per quanto riguarda i livelli di c-LDL molto bassi. Le linee guida europee, tuttavia, hanno abbassato ulteriormente l'obiettivo del c-LDL nei pazienti a rischio molto alto, in particolare quelli con eventi cardiovascolari ricorrenti.

LIB003, nuovo farmaco anti-PCSK9: risultati dell'estensione del trial di fase 2

Il nuovo composto anti-PCSK9 LIB003 riduce sostanzialmente i livelli di c-LDL nell'arco di 52 settimane in pazienti che già assumono statine alla massima dose tollerata, come dimostrano i risultati dell'estensione di uno studio in aperto. LIB003, che combina un dominio legante la proteina convertasi subtilisina/kexina di tipo 9 (PCSK9) con l'albumina sierica umana in un agente terapeutico di fusione ricombinante, ha un'elevata affinità di legame

per PCSK9 e agisce in modo simile agli anticorpi monoclonali per bloccare l'interazione tra PCSK9 e il recettore LDL.

I dati presentati lo scorso anno all'EAS 2019 hanno mostrato che la dose di 300 mg somministrata ogni 4 settimane a pazienti già trattati con statine alla massima dose tollerata ha ridotto i livelli di c-LDL di oltre il 70% e i livelli di PCSK9 di oltre l'80% rispetto al placebo. Lo studio di fase 2 randomizzato di 12 settimane, che ha confrontato tre dosaggi del composto, ha anche mostrato che non c'erano ulteriori guadagni con 350 mg di LIB003, e quindi la dose di 300 mg è stata portata avanti in un'estensione in aperto. Lo studio ha coinvolto 32 pazienti dell'analisi precedente e ha dimostrato che, a 52 settimane, LIB003 era associato a riduzioni rilevanti dei livelli di c-LDL del 64% e dei livelli di PCSK9 di oltre l'80%. Ci sono state anche riduzioni sostanziali di altri lipidi, tra cui la lipoproteina(a) e l'apolipoproteina B. LIB003 era ben tollerato e non ha mostrato segni clinici o di laboratorio avversi inaspettati o significativi, con lievi reazioni nel sito di iniezione e anticorpi antifarmaco solo in due pazienti. Sono in corso studi di fase 3 più ampi e più lunghi con LIB003 300 mg iniettati ogni 4 settimane per valutare appieno la sicurezza e l'efficacia di questo nuovo approccio terapeutico.

Evinacumab nei soggetti con FH omozigote: il trial ELIPSE

Evinacumab sembra avere un effetto notevole sui livelli di c-LDL nei pazienti con ipercolesterolemia familiare omozigote (HoFH) con poca o nessuna attività del recettore LDL, come suggerisce un'analisi post hoc dei dati dello studio di fase 3. Lo studio di fase 3 ELIPSE ha dimostrato che evinacumab, un anticorpo monoclonale umano inibitore dell'Angiopoietin-Like 3

(ANGPTL3), somministrato per via endovenosa ogni 4 settimane, riduce i livelli di c-LDL nei pazienti con HoFH in media del 47%. Il trattamento, generalmente ben tollerato, è risultato efficace in circa un terzo dei pazienti con attività recettoriale LDL residua minima. In un'analisi post hoc, 10 pazienti con meno del 2% di attività funzionale del recettore LDL hanno sperimentato una riduzione ancora maggiore, del 72% rispetto al placebo. Evinacumab può quindi fornire un'opzione di trattamento efficace per i pazienti con HoFH che non sono in grado di raggiungere gli obiettivi lipidici nonostante le molteplici terapie ipolipemizzanti disponibili, con o senza aferesi.

Efficacia di inclisiran in soggetti ad alto rischio: sottostudi dai trial ORION-9 e ORION-II

Inclisiran riduce in modo consistente i livelli di c-LDL in tutti i genotipi nell'ipercolesterolemia familiare eterozigote (HeFH) e nei pazienti ad alto rischio in prevenzione primaria, secondo quanto emerso dagli ultimi dati del programma di sperimentazione clinica denominato ORION.

In un sottostudio di ORION-9, 293 pazienti con HeFH randomizzati a inclisiran, un nuovo siRNA (small-interfering RNA), o a placebo sono stati stratificati in base al numero di varianti associate a FH e quindi suddivisi in otto genotipi. Il grado di riduzione del c-LDL con inclisiran era simile in tutti i sottogruppi, variando dal 37% al 56%, e tra il 72% e l'82% dei pazienti ha raggiunto il proprio obiettivo di c-LDL con il farmaco.

ORION-11 ha confrontato l'impatto di inclisiran e placebo sui livelli di c-LDL in pazienti ad alto rischio di eventi cardiovascolari, nonostante fossero in terapia con la massima dose tollerata di statine. I dati su 203 pazienti in prevenzione primaria

hanno mostrato che inclisiran riduceva i livelli di c-LDL del 47% entro 510 giorni. Questi erano in linea con i risultati complessivi dello studio, presentati in precedenza, che mostravano una riduzione del 50% del c-LDL.

Il rapporto trigliceridi/apoB predice il rischio di pancreatite nei soggetti ipertrigliceridemici

Calcolare il rapporto tra i livelli sierici di trigliceridi e apolipoproteina B può aiutare a individuare i pazienti con ipertrigliceridemia a basso rischio di sviluppare pancreatite ipertrigliceridemica (HTGP), e quindi a migliorare la gestione di questi soggetti, favorendo il monitoraggio di quelli a rischio più elevato. L'ipertriglyceridemia è una causa comune di pancreatite, con livelli di trigliceridi superiori a 2000 mg/dL fortemente correlati con lo sviluppo di questa complicanza. Inoltre, studi recenti hanno dimostrato che anche moderati aumenti dei livelli di trigliceridi possono incrementare il rischio di pancreatite. Perciò, l'identificazione tempestiva dei pazienti più a rischio può consentire un intervento precoce e strategie preventive.

In una revisione delle cartelle cliniche dei pazienti presso la Mayo Clinic in un orizzonte temporale di 13 anni, il team di ricercatori ha identificato 58 soggetti che avevano livelli di trigliceridi superiore a 500 mg/dL al basale, di cui 20 avevano avuto un episodio di HTGP. Il rapporto trigliceridi/apolipoproteina B era un predittore indipendente di HTGP, con una sensibilità del 90% e una specificità di quasi il 74% con l'utilizzo del *cut off* di 10,6: valori inferiori corrispondevano a una probabilità di sviluppare HTGP di solo l'1,5%. Inoltre, sono state ulteriormente esaminate le cartelle di ogni singolo paziente per verificare che

i pazienti avessero avuto almeno un episodio documentato di pancreatite acuta per la quale erano stati ricoverati. I pazienti con HTGP avevano maggiori probabilità di essere donne (70% vs 39%; p=0,027), ed erano più giovani, con un'età media di 36,5 contro 51,0 anni (p<0,001). I livelli di trigliceridi erano nettamente più alti in quelli con HTGP (2332,0 vs 978 mg/dL, p<0,001). Tuttavia, avevano livelli più bassi di c-LDL (65,5 vs 90,0 mg/dL; p=0,002), di c-HDL (19,0 vs 30,0 mg/dL; p=0,003) e di apoB (104,5 vs 127,0 mg/dL; p=0,022).

Differenze di genere nel trattamento dell'FH eterozigote

I dati provenienti da un ampio registro multinazionale suggeriscono differenze di genere tra i pazienti con ipercolesterolemia familiare eterozigote (HeFH) in termini di quando viene diagnosticata la malattia e di come viene trattata, così come in termini di livelli di c-LDL raggiunti.

L'analisi dei dati del registro globale Familial Hypercholesterolemia Studies Collaboration (FHSC) dell'EAS, che include quasi 17.000 uomini e 20.000 donne con HeFH probabile o confermata, mostrano infatti differenze nelle caratteristiche dell'FH e nella gestione in base al sesso. Le donne vengono identificate leggermente più tardi degli uomini, e meno frequentemente raggiungono l'obiettivo terapeutico. Le donne hanno meno probabilità degli uomini di assumere farmaci ipolipemizzanti al basale (58,4% vs 61,1%; p<0,01), e meno probabilità di essere in terapia di combinazione (19,9% vs 22,7%; p<0,01).

Acido bempedoico in FH eterozigote

Questo studio ha riunito i dati di due studi di fase 3 controllati con placebo sull'acido bempedoico (180 mg) in 3009 pa-

zienti con malattia cardiovascolare aterosclerotica e/o ipercolesterolemia familiare eterozigote (FH) in terapia con statine alla massima dose tollerata, con o senza altra terapia. La durata del trattamento è stata di 52 settimane e l'*end point* primario di efficacia era la variazione percentuale del c-LDL dal basale alla settimana 12. Le riduzioni medie del c-LDL dal basale alla settimana 12 erano significativamente maggiori con acido bempedoico rispetto al placebo nei pazienti con FH eterozigote (corretto per placebo, 22,3%) e senza FH (18,3%), p<0,001 per entrambe le analisi. Questi risultati suggeriscono che l'acido bempedoico, in aggiunta alle statine, può essere un'altra opzione terapeutica in questo gruppo di pazienti.

Nuovi approcci di medicina personalizzata

La biologia dei sistemi offre un quadro meccanicistico per la malattia coronarica e la malattia cardiometabolica, con un potenziale per la diagnostica personalizzata e l'identificazione di nuovi bersagli. La biologia dei sistemi e le -omics forniscono una mappa delle interazioni molecolari, così come reti di associazione funzionale e di malattia, che si traducono in parentela biologica. L'uso di una *network platform* di realtà virtuale consente ai ricercatori di immergersi nelle reti molecolari. L'applicazione dell'intelligenza artificiale guiderà l'innovazione nella medicina cardiovascolare e possibilmente il miglioramento della gestione clinica in futuro. La medicina personalizzata offre anche il potenziale per una migliore cura dei pazienti più anziani. La prevenzione personalizzata per estendere l'aspettativa di vita in buona salute mira a rallentare l'invecchiamento biologico e ridurre il rischio di malattie cro-

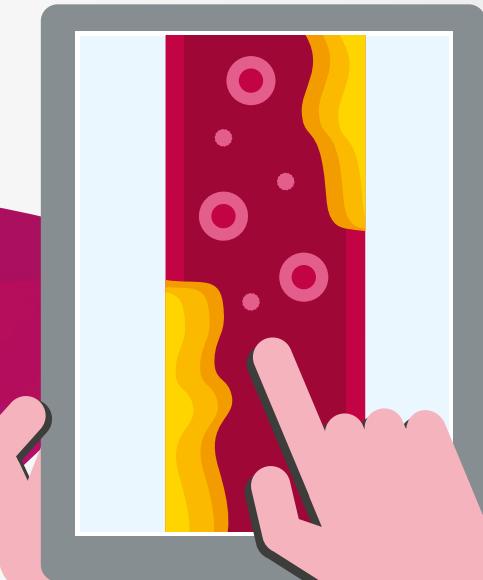
niche legate all'età. Far tornare indietro l'orologio dell'età biologica con diversi piccoli cambiamenti personalizzati per l'individuo, come l'aumento dell'attività fisica, l'adozione di una dieta in stile mediterraneo e l'integrazione della vitamina D, avrà un impatto importante sul peso delle malattie croniche legate all'età e della fragilità.

Il 2020 rappresenta un crocevia per il c-LDL, con la disponibilità di terapie di combinazione altamente efficaci. Tuttavia, non è solo "lower is better" ma anche "earlier is better", come ben esemplificato dal caso dell'ipercolesterolemia familia-

re. L'abbassamento aggressivo del c-LDL oltre gli obiettivi attuali non ha mostrato alcuna soglia minima in termini di riduzione degli eventi cardiovascolari avversi maggiori (MACE) ed è sicuro. Nuove modalità come siRNA, mRNA e anticorpi monoclonali offrono strategie di dosaggio migliorate. Ad esempio, il siRNA inclisiran consente l'iniezione due volte all'anno, con una riduzione durevole del c-LDL di oltre il 50% nel tempo, il che indubbiamente gioverà all'aderenza. Sono stati nel contempo indicati anche nuovi *target* come la lipoproteina (a), l'apolipoproteina C-III, ANGPTL3.

34° CONGRESSO NAZIONALE S.I.S.A. VIRTUAL EDITION

**22-23-24 Novembre 2020
FAD SINCRONA IN LIVE STREAMING
22 Novembre 2020 > 22 Febbraio 2021
FAD ON DEMAND - PERCORSI 1 / 2**





Il 34° Congresso Nazionale della Società Italiana per lo Studio dell'Aterosclerosi (SISA) quest'anno si svolgerà dal 22 novembre in modalità Virtuale durante la quale si alterneranno sessioni live streaming ed altre on demand. Come consuetudine, il Congresso affronterà diversi argomenti di interesse nell'ambito della cura delle patologie cardiovascolari aterosclerotiche.

Per rimanere nella attualità del momento, si prevede di organizzare una Tavola Rotonda che affronterà la gestione del rischio cardiovascolare in un momento di pandemia infettiva prendendo in considerazione sia gli aspetti clinici sia soprattutto quelli organizzativi.

Altre tematiche saranno legate ai rapporti tra metabolismo lipidico e decadimento cognitivo che si configura come una grande emergenza epidemiologica. Inoltre, una specifica sessione live streaming sarà dedicata ad esaminare i vantaggi e i limiti degli interventi terapeutici nella prevenzione delle malattie cardiovascolari nel paziente anziano. Infine, saranno affrontati, grazie alla presenza live di esperti, anche alcuni temi controversi relativi alle scelte nutrizionali orientate alla prevenzione cardiometabolica, come quelle inerenti alla riduzione del consumo di sale, al controllo dell'uso dell'alcool o degli zuccheri.

Altre sessioni live saranno dedicate all'esame delle evidenze che la ricerca cellulare e molecolare sta offrendo per l'individuazione di futuri possibili bersagli terapeutici della aterosclerosi e delle sue complicanze d'organo (miRNA, metaboloma, vesicole extracellulari etc.).

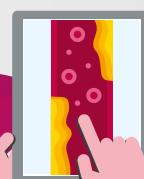
Ampio spazio sarà inoltre dedicato a discutere i risultati più recenti dell'uso degli inibitori della proteina PCSK9 nella prevenzione delle complicanze ischemiche e ad esaminare quali nuove strategie farmacologiche PRESENTAZIONE si stanno affacciando all'orizzonte della terapia dell'ipercolesterolemia (acido bempedoico, inclisiran, inibitori ANGPTL3).

Attraverso sessioni on demand, ampio spazio sarà riservato alla descrizione di due importanti dislipidemie rare, l'ipercolesterolemia familiare omozigote (HoFH) e la sindrome iperchilomicronemica familiare (FCS), per le quali finalmente abbiamo la disponibilità di farmaci efficaci. Il capitolo delle malattie rare del metabolismo sarà ulteriormente approfondito attraverso un minicorso che si svolgerà in formato on demand, nel quale saranno esaminate le patologie del metabolismo intermedio (lipodistrofie, glicogenosi, Niemann-Pick etc.). Un secondo minicorso sarà anche dedicato a fare il punto sulla ricerca che la SISA sta dedicando all'ipercolesterolemia familiare (Progetto LIPIGEN).

Un'altra sessione on demand affronterà temi emergenti nelle strategie di prevenzione della aterosclerosi, quali l'uso dei test genetici, l'imaging cardiovascolare o l'impiego in nuove formulazioni o indicazioni dei farmaci convenzionali (ad esempio l'impiego degli SLGT2 inibitori nella prevenzione dello scompenso). Infine, il Congresso vuole gettare uno sguardo nel futuro affrontando le potenzialità e prospettive dell'impiego dell'Intelligenza Artificiale nello studio delle malattie cardiovascolari.

Il Congresso sarà inoltre la vetrina per l'attività dei ricercatori italiani più giovani che studiano i numerosi aspetti della fisiopatologia del danno vascolare che anche quest'anno si realizzerà attraverso lo svolgimento live degli Spazio Giovani e delle Comunicazioni Oralì e dei Poster alle quali abbiamo potuto garantire ampi spazi di interattività on demand.

Prof. Marcello Arca
Presidente SISA



RIASSUNTO DELLE COMUNICAZIONI PRESENTATE AL 34° CONGRESSO NAZIONALE S.I.S.A.

HORMONE TREATMENT IMPACTS ON HIGH DENSITY LIPOPROTEIN FUNCTION IN TRANSGENDER PEOPLE

M.P. Adorni¹, D.M. van Velzen², F. Zimmetti³, M. Palumbo³, F. Bernini³, S. Simsek², C.R. Sirtori⁴, M. den Heijer², M. Ruscica⁵
¹Dipartimento di Medicina e Chirurgia, Unità di Neuroscienze, Università di Parma; ²Department of Internal Medicine, Division of Endocrinology, Amsterdam University Medical Center, Amsterdam, the Netherlands; ³Department of Food and Drug, Università di Parma; ⁴Center for Dyslipidemias, A.S.S.T. Grande Ospedale Metropolitano Niguarda, Milan; ⁵Department of Pharmacology and Biomolecular Sciences, Università degli Studi di Milano

E-mail: mariapia.adorni@unipr.it

Introduction. Previous studies have shown a decrease in HDL cholesterol concentration during transgender hormone therapy. However, the ability of HDL to remove cholesterol from macrophages, termed cholesterol efflux capacity (CEC), has proven to be a better predictor of cardiovascular disease. As transgender individuals are exposed to lifelong exogenous hormone administration, it becomes of interest to study whether HDL-CEC is affected by hormone therapy.

Aim. To evaluate HDL-CEC in 15 trans men and 15 trans women at baseline and after one year of hormone therapy. Methods. Trans men were treated with testosterone gel in a daily dose of 50 mg or a mix of testosterone esters in 250 mg injections once per three weeks or 1000 mg injections of testosterone undecanoate once per twelve weeks. Trans women were treated with twice daily oral estradiol valerate 2 mg tablets or a transdermal preparation in a twice weekly dose of 100 µg/day. Cyproterone acetate (daily dose of 50 mg), was prescribed to all transwomen. HDL CEC was evaluated by using a cell-based radioisotopic technique. We evaluated total HDL-CEC from macrophages and its major contributors, the ATP-binding cassette transporters (ABC) A1 and ABCG1 HDL-CEC and HDL-CEC by aqueous diffusion.

Results. In trans women, total HDL-CEC decreased by 10.8% ($p<0.001$), ABCA1 HDL-CEC decreased by 23.8% ($p<0.001$) and aqueous diffusion HDL-CEC by 4.8% ($p<0.01$). In trans men, non-significant changes were found in total and ABCA1 HDL-CEC: -6.7% and -0.7%, respectively. Conversely, aqueous diffusion HDL-CEC significantly decreased, with a 9.8% ($p<0.01$) reduction. No differences in ABCG1 HDL-CEC were observed in both groups.

Conclusion. Total HDL-CEC decreased during hormone therapy in trans women, through a specific reduction in ABCA1 HDL-CEC. This finding might contribute to a higher cardiovascular disease risk observed in these subjects, despite its lowering effect on other risk factors.

SIZE AND CONTENT CHARACTERIZATION OF DIFFERENT EV POPULATIONS HARVESTED FROM TUMOR CELL LINES FOR A NOVEL PHARMACOLOGICAL APPROACH IN TREATING PROLIFERATIVE DISEASES

L. Arnaboldi¹, F.M. Accattatis¹, A. Granata¹, S. Mazza¹, E. Vergani², M. Rodolfo³, A. Corsini⁴

¹Università degli Studi di Milano; ²IRCCS Istituto Nazionale Tumori Milano; ³IRCCS Istituto Nazionale Tumori,

⁴Università degli Studi di Milano; IRCCS Multimedica, Milano
E-mail: lorenzo.arnaboldi@unimi.it

Introduction. Extracellular vesicles (EVs) are physiologically secreted by cells (particularly during inflammation and in cancer), which deliver nucleic acids, bioactive lipids, proteins and enzymes to recipient distant cells. Latest guidelines classify EVs as small (50-80 nm), large- (80-120 nm) exosomes, microvesicles (120-1000 nm). A new interesting population of nanoparticles with unknown functions (exosomes; <50 nm) also emerged. Aims Since lack of characterization and separation methods impairs the comprehension of EVs origins and functions, we:

- a) set up a method to separate, quantify and characterize (dimensions, composition) the abovementioned EVs subpopulations.
- b) pharmacologically modulate EVs synthesis/secretion, by interfering with parental cell lipid metabolism.

Materials and Methods. EVs harvested from lymph-node melanoma- and prostatic metastatic cell lines are then separated by differential ultracentrifugation and dimensionally analyzed by Transmission Electron Microscopy, Z-sizer, nanocyte. The content in total fatty acids is calculated after GLC.

Results. Differences in size of the five EV populations previously assessed by nanocyte have been further confirmed both by TEM and Z-sizer. Moreover, from a lipidomic point of view, a strong correlation exists between decrease in EVs size and increase in saturated fatty acids, ranging from microvesicles (35.9%), whose fatty acids profile resembles that of parental cells, to exosomes (65.3%). We also found differences in cholesterol and phospholipid mass in each fraction but lipidomics is now undergoing. On the same specimens we also run detailed proteomics. Preliminary data suggest the existence of various unique proteins in each fraction (of among >4000 found in EVs), that we are validating as potential biomarkers. Based on these findings we are running gene ontology to unravel the function(s) of each fraction, based on their gene and protein content. We also started the pharmacological modulations of parental cells with simvastatin and KT182, respectively involved in cholesterol and phospholipid metabolism.

Future Aims. The goal will be to administer different EVs populations harvested from naïve- or pharmacologically-treated cells to prove their effects in functional tests (e.g. proliferation, apoptosis, migration, invasion), to shed light on their pathophysiological roles, for a possible new pharmacological approach or for the discovery of novel tumor biomarkers.

ALTERATION IN GUT MICROBIOTA COMPOSITION AND FUNCTIONAL RELEVANCE IN SUBCLINICAL CAROTID ATHEROSCLEROSIS

A. Baragetti¹, M. Severgnini², E. Olmastroni³, G. Caredda¹, C. Conca Dioguardi⁴, A. Angius⁵, L. Rotta⁶, J. Cibella⁷, C. Consolandi², V. Zampoleri¹, L. Grigore⁸, F. Pellegratta⁸, F. Giavarini¹, D. Caruso¹, G.D. Norata¹, A.L. Catapano⁹, C. Peano¹⁰
¹Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano; ²Institute of Biomedical Technologies, National Research Council, Segrate, Milan;
³Centro di Epidemiologia e Farmacologia Preventiva (SEFAP), Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano; ⁴Institute of Genetic and Biomedical Research, UoS Milan, National Research Council, Rozzano, Milan; ⁵Department of Experimental Oncology, IEO, European Institute of Oncology, IRCCS, Milan; ⁶Institute of Genetic and Biomedical Research, National Research Council, Cagliari; ⁷Genomic Unit, IRCCS, Humanitas Clinical and Research Center, Rozzano, Milan; ⁸Multimedica IRCCS, Milano; ⁹Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano, Multimedica IRCCS, Milano; ¹⁰Genomic Unit, IRCCS, Humanitas Clinical and Research Center, Rozzano, Milan, Institute of Genetic and Biomedical Research, UoS Milan, National Research Council, Rozzano, Milan
E-mail: andrea.baragetti@unimi.it

Aims. Variations in Gut Microbiota (GM) composition and function associate with advanced cardiovascular diseases (CVDs); whether this also holds true at early stages of CVD is not known. We profiled GM in subjects without diabetes, metabolic syndrome and in primary prevention for CVD, to investigate the association between GM profile and markers of Subclinical Carotid Atherosclerosis (SCA).

Methods. Fecal GM composition was assessed (16S rRNA) in 345 subjects from the PLIC population-based study, already analyzed for personal clinical, history, biochemical profile, lifestyle and alimentary habits. Gut Metagenome shotgun sequencing was performed on 23 subjects with advanced ultrasound-based SCA vs 23 age- and gender-matched subjects without SCA.

Results. In presence of SCA, the relative abundance of Bacteroides was reduced, while Escherichia, Coriobacteriaceae and Streptococcaceae were increased. Specifically, Escherichia coli was the metagenomic most abundant marker in samples from subjects with advanced SCA vs those without. At the species level, we observed increased abundance of *Fecalibacterium prausnitzii* in subjects without SCA, in which pathways related to the synthesis of anti-inflammatory short chain fatty acids (like starch degradation for the synthesis of butyrate) were overrepresented. Vice versa, in presence of advanced SCA, *E.Coli* was the hit metagenomic marker and pathways involved in virulent activation (alcohols and sugars degradation, palmitate biosynthesis and amino acids metabolism) and in the metabolism of choline, carnitines and substrates of pro-atherogenic molecules (including Trimethylamine N-oxide) were overrepresented. No association between GM and ongoing pharmacological treatments while interaction with lifestyle and alimentary habits was outlined in presence of SCA.

Conclusions. We have identified a unique signature of GM dysbiosis in subjects with SCA among the general population and we have focused attention on bacterial species related to specific metabolic pathways to be considered in primary CVD prevention setting.

THE PROGNOSTIC VALUE OF ULTRASOUND-BASED EVALUATION OF ACHILLES TENDON XANTHOMAS IN FAMILIAL HYPERCHOLESTEROLEMIA: RESULTS FROM THE ACTUS-FH SUB-STUDY OF THE LIPIGEN NETWORK

A. Baragetti¹, M. Casula², P. Scarinzi³, M. Biolò³, F. Ristè⁴, M. Dall'Agata⁴, G.B. Vigna⁴, E. Olmastroni², M. Gazzotti², R. Scicali⁵, S. Lugari⁶, A. Cavicchioli⁶, F. Carubbi⁶, F. Nascimbeni⁶

¹Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano; ²Centro di Epidemiologia e Farmacologia Preventiva (SEFAP), Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano;

³U.O. Clinica Medica 1, Centro Dislipidemie e Aterosclerosi, Azienda Ospedaliera, Padova; ⁴U.O Medicina Interna Universitaria, Centro per lo Studio delle dislipidemie e dell'Aterosclerosi, Azienda Ospedaliero-Universitaria di Ferrara;

⁵Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Università di Catania; ⁶Unit of Internal and Metabolic Medicine, Civil Hospital, A.O.U. of Modena and University of Modena and Reggio Emilia
E-mail: andrea.baragetti@unimi.it

Introduction. Achilles tendon xanthomas (ATX) are a pathognomonic feature of familial hypercholesterolemia (FH), included in the Dutch Lipid Clinic Network (DLCN) diagnostic algorithm. We aim to evaluate the value of ATX by ultrasound (US-ATX) as a prognostic tool, in addition to physical examination (PE-ATX), in the management of FH.

Methods. The ACTUS-FH (Achilles Tendon UltraSonography in Familial Hypercholesterolemia) Group was built up within the LIPIGEN network. Beyond the clinical, biochemical, and genetic data collected in the LIPIGEN database, each Center provided information on PE-ATX and US-ATX (focal hypoechoic lesions) and measurement of the maximum thickness bilaterally on each tendon.

Results. A total of 769 adult clinical FH patients (49.5% males, mean age[SD] 47.4[14.8] years, 578 [75.2%] positive at genetic test) were included in this analysis. As compared to PE-ATX, US-ATX improved the detection of ATX, from 9.75% to 33.16%, and increased the proportion of patients classified as definite FH according to DLCN, from 32.5% to 43.2%. Patients with US-ATX were more likely to be mutation-positive than patients without ATX (94.9% vs. 65.4%). Of note, maximum tendon thickness correlated with untreated LDL-C levels only in mutation-positive patients ($\rho=0.39$, $p<0.001$), and it was not able to discriminate between genetically positive or negative patients (ROC curve: sensitivity 0.34, specificity 0.87). By dividing the ACTUS-FH cohort according to absence of any xanthomas vs. presence of only US-ATX vs. presence of both, we found a gradient of increased severity across the three groups for age (45.5[15.3] vs. 50.2[12.7] vs. 53.5[13.2] years; $p<.0001$), untreated LDL-C (254.4[63.4] vs. 300.5[78.5] vs. 347.6[85.3] mg/dl; $p<.0001$), and prevalence of cardiovascular disease (9.53% vs. 16.67% vs. 29.33%; $p<.0001$).

Conclusions. The ACTUS-FH sub-study showed that the ultrasound-based detection of tendon xanthomas might serve as a tool to improve the recognition of the most severe FH phenotypes.

A REDUCED ACTIVITY OF PLASMA SUPEROXIDE DISMUTASE IS ASSOCIATED WITH HIGH ON-ASPIRIN PLATELET REACTIVITY IN TYPE 2 DIABETES MELLITUS AND PRIMARY HYPERCHOLESTEROLEMIA

C. Barale¹, F. Cavalot², C. Frascaloli², K. Bonomo², A. Morotti¹, I. Russo¹

¹Department of Clinic and Biological Sciences, University of Turin; ²Metabolic Disease and Diabetes Unit, San Luigi Gonzaga Hospital, Orbassano, Turin
E-mail: isabella.russo@unito.it

Several lines of evidence suggest a strong correlation between metabolic disorders and cardiovascular diseases (CVD). Oxidative stress may be considered a "common soil" able to create a feed-forward cycle that can deeply influence the development of a pro-thrombotic tendency also due to platelet hyperreactivity. Aspirin, a suppressor of thromboxane (TX)A2 synthesis by irreversibly inhibiting cyclooxygenase-1 (COX-1), is extensively used as medication in CVD prevention. However, some patients on aspirin show a higher than expected platelet reactivity. Aim of this study was to investigate platelet function in type 2 diabetes mellitus (T2DM) or primary hypercholesterolemia (HC) and its relationships between a pattern of pro- and anti-oxidant, inflammation and endothelial dysfunction biomarkers. To this end, in T2DM (n=103) and HC (n=61) patients treated with 100 mg/die aspirin we evaluated:

- 1) light transmission aggregometry (LTA) to arachidonic acid (AA), collagen and ADP; response to platelet function analyser (PFA)-100 with collagen/epinephrine (CEPI) cartridges; serum TXB2 and urinary 11-dehydro-(11-dh)TXB2;
- 2) plasma superoxide dismutase (SOD) activity, and urinary 8-iso-prostaglandin F2alpha (8-iso-PGF2alpha) as markers of redox status and a pattern of markers of inflammation, endothelial dysfunction and platelet activation.

As results, in T2DM and HC subjects, respectively, a comparable prevalence of high on-aspirin platelet reactivity (HPR) was found for LTA-AA (12% and 11%, p=ns), LTA-collagen (9% and 13%, p=ns), 11-dhTXB2 (26% vs 25%, p=ns) or CEPI PFA-100 assays (23% vs 25%, p=ns). Based on response to CEPI PFA-100, in comparison with HPR-, HPR+ showed lower SOD activity in both T2DM (p<0.0001) and HC (p=0.02) subjects. In a stepwise linear regression, SOD was the only predictor of platelet reactivity. To conclude, in T2DM and HC, similarly, the impairment of redox equilibrium associated with a decrease of SOD activity could contribute to a suboptimal response to aspirin.

ANTIPLATELETS EFFECT OF ALBUMIN INFUSION IN PATIENTS WITH CONGENITAL ANALBUMINEMIA

F. Baratta, D. Pastori, V. Cammisotto, S. Bartimoccia, L. Stefanini, R. Carnevale, F. Angelico, M. Del Ben
Sapienza, University of Rome
E-mail: francesco.baratta@uniroma1.it

Background. Congenital analbuminemia is a rare autosomic recessive inherited disorder characterized by strongly decreased concentration, or complete absence, of serum albumin (SA). Several lines of evidence indicate that SA has an anti-coagulant and anti-thrombotic effect as supported by inhibitory effect of albumin on platelet aggregation. However, in vivo platelet function and the role of oxidative stress as mechanism promoting platelet activation have never been studied in analbuminaemic patients.

Methods. We report two cases of congenital analbuminemia (1.0 g/dL) in a 29-year-old male and in a 67-year-old woman. Human albumin (40 g) was infused over a period of 30 min'. Blood was collected immediately before infusion (T0) and 2 hours later (T2h) to evaluate platelet function by aggregation, sCD40L and surface α IIb β 3 integrin and P-selectin expression. Platelet oxidative stress was evaluated by NOX2-derived peptide (sNOX2-dp) and 8-iso-PG-F2 α -III. In the male subject, using flow cytometry, we measured the integrin activation and the α -granule secretion, before and 2h after albumin infusion in naïve platelets and in platelets treated with a P2Y12 inhibitor or with aspirin and stimulated with or without PAR1p, or ADP or convulxin.

Results. On admission (T0), patients displayed higher platelet aggregation and plasma levels of sCD40L and increased level of sNOX2dp, and 8-iso-PGF2 α compared to healthy subjects. A significant and positive association was found between platelet aggregation and 8-iso-PGF2 α ($p=0.01$, $r^2=0.972$), platelet aggregation and sNOX2dp ($p=0.02$, $r^2=0.953$), sCD40L and 8-iso-PGF2 α ($p=0.02$, $r^2=0.919$), sCD40L and sNOX2dp ($p=0.03$, $r^2=0.939$). Two hours after infusion (T2), serum albumin levels rose from 20 to 26 g/dL coincidentally with a significant reduction of platelet aggregation, sCD40L levels and of oxidative stress biomarkers. Moreover, we found a decreased expression of markers of platelet activation and platelet-leukocyte aggregates after albumin infusion compared to T0. Finally, treatment with either aspirin or a P2Y12 inhibitor reduced integrin activation, but not α -granule secretion, more effectively after infusion with albumin.

Conclusion. Analbuminaemic patients show higher platelet activation and oxidative stress. Infusion of albumin reduces platelet activation by decreasing oxidative stress. Albumin could also help reduce the high prothrombotic tendency of these patients by increasing the anti-thrombotic effect of antiplatelet drugs.

EFFECT OF STATINS ON LIVER FUNCTION TESTS IN PATIENTS WITH NON-ALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE. A SYSTEMATIC REVIEW AND METANALYSIS

F. Baratta¹, D. Pastori¹, A. Pani², A. Di Rocco³, A. Farcomeni⁴, L. D'Erasmo⁵, F. Angelico³, M. Del Ben⁶

¹Department of Clinical, Internal, Anesthesiologic and Cardiovascular Sciences, Sapienza University of Rome;

²Clinical Pharmacology Unit, ASST Grande Ospedale Metropolitano Niguarda, Milan; ³Department of Public Health and Infectious Diseases, Sapienza University of Rome; ⁴Department of Economics and Finance, University of Rome Tor Vergata, Rome; ⁵Department of Translational and Precision Medicin, Sapienza University of Rome; ⁶Department of Clinical, Internal, Anesthesiologic and Cardiovascular Sciences, Sapienza University of Rome

E-mail: francesco.baratta@uniroma1.it

Background. Patients with non alcoholic fatty liver disease have increase chance to develop cardiovascular disease due to coexistence of cardiometabolic disorders. In particular, the presence of an atherogenic dyslipidemia is a strong risk factor for cardiovascular events. For this reason, NAFLD patients are often prescribed on statins. However, statin liver safety in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) patients is not well defined. Aim of the study is to summarize data from studies reporting differences in liver function tests (LFTs) in patients treated or not with statins.

Methods. We performed a systematic review of MEDLINE via PubMed and Cochrane (CENTRAL) databases and metanalysis of clinical studies investigating levels of aspartate transaminase (AST), alanine transaminase aminotransferase (ALT) and gamma-glutamyl transpeptidase (GGT) in NAFLD patients treated or not with statins.

Results. We included 22 studies with 3,473 NAFLD patients. The mean age of patients ranged from 43 to 73 years, and the proportion of women ranged from 20.5% to 60%. All patients included in the interventional studies had raised LFTs at baseline. The mean difference between patients treated and untreated patients was -20.33 U/l (95% Confidence Interval (CI) -28.26/-12.39) for ALT, -13.17 U/l (95%CI -19.55/-6.79) for AST and -15.15 U/l (95%CI -22.62/-7.69) for GGT. These differences were most evident in interventional studies (ALT -27.48 U/l [95%CI -36.89/-18.08]; AST -17.56 U/l 95%CI -25.18/-9.94; GGT -20.48 U/l [95%CI -28.02/-12.94]).

Conclusion. In interventional studies with statins, ALT, AST and GGT were reduced by 34.8%, 30.6% and 26.1%, respectively, while observational studies showed a null effect suggesting a favorable liver safety in NAFLD patients.

HYPERCHOLESTEROLAEMIA IMPACTS GLYCANS PROFILE ON CIRCULATING IMMUNE CELLS

R. Bellini¹, F. Bonacina¹, M. Svecla¹, F. Pellegatta²,

A.L. Catapano³, G.D. Norata⁴

¹Department of Pharmacological and Biomolecular Sciences, University of Milan; ²S.I.S.A. Center for the Study of Atherosclerosis, Bassini Hospital, Cinisello Balsamo, Milan, IRCCS MultiMedica Hospital, Sesto S. Giovanni, Milan; ³Department of Pharmacological and Biomolecular Sciences, University of Milan, IRCCS MultiMedica Hospital, Sesto S. Giovanni, Milan;

⁴Department of Pharmacological and Biomolecular Sciences, University of Milan, Milan, S.I.S.A. Center for the Study of Atherosclerosis, Bassini Hospital, Cinisello Balsamo, Milan

E-mail: rossella.bellini1@gmail.com

Aim. Leukocytes infiltration and cellular extravasation in the vessel wall result from the interaction of endothelial cells with specific receptors on immune cells surface. Most of these receptors present several glycans on their surface, among which Sialic acid (Sia) normally represents the last glycan of the chain. Changes in the composition of glycan branches on immune cells surface impact their function and therefore the immune response. Aim of our study was to profile terminal N-glycan signature on immune cells in hypercholesterolemic conditions.

Methods. Glycan residues expression on circulating T cells and monocytes was investigated by flow cytometry in LDL-R KO mice fed with standard or high cholesterol diet (WTD) for 8 weeks and in patients with heterozygous familial hypercholesterolemia (HeFH). The glycosylation landscape of immune cells was profiled by specific lectins staining, including MAL and SNA to detect α 2,3-linked and α 2,6-linked Sia respectively, RCA for Galactose (Gal) and WGA for both Sia and N-acetylglucosamine (GlcNAc).

Results. Overall, the total amount of Sia and GlcNAc expressed on circulating immune cells was similar between WTD-fed LDL-R KO mice and control animals; however a significant decrease in α 2,3-linked Sia expression was observed in T cells ($0,68 \pm 0,040$ fold* for CD4+, $0,49 \pm 0,02$ fold* for CD8+) whereas a significant increase in α 2,6-linked Sia was observed in monocytes ($2,12 \pm 0,15$ fold*) of hypercholesterolemic LDL-R KO mice compared to their control counterparts. Moreover, Gal expression increases significantly only on circulating monocytes ($1,27 \pm 0,05$ fold*) and, particularly, in Ly6C-high monocytes ($1,27 \pm 0,06$ fold*). (*p<0.05). In line with these observations, T lymphocytes from FH patients presented decreased expression of α 2,3 sialylation ($0,75 \pm 0,03$ fold** for CD4+, $0,87 \pm 0,04$ fold* for CD8+) and the same was true for CD16+ neutrophils ($0,68 \pm 0,11$ fold*) compared to age- and sex-matched controls. (**p<0.05; **p<0.01).

Conclusions. These results highlight that hypercholesterolaemia affects glycans signature of immune cells both in humans and in experimental models. Whether the impact of increased α 2,6/ α 2,3-linked Sia and Gal/Sia ratios, observed in hypercholesterolemic conditions, impact the function of immune cells during atherosclerosis development remains to be addressed.

MODIFICATIONS OF THE CONCENTRATIONS OF PCSK9 IN SERUM AND CEREBROSPINAL FLUID IN PATIENTS WITH COGNITIVE DISORDERS

M. Bertolotti¹, F. Zimetti², A. Chiari³, R. Bedin¹, M.G. Lupo⁴, M. Palumbo², M.P. Adorni², E. Baldelli¹, G. Lancellotti¹, C. Mussi¹, N. Ferri⁴

¹University of Modena and Reggio Emilia; ²University of Parma; ³Modena City Hospital; ⁴University of Padova

E-mail: marco.bertolotti@unimore.it

Background and Aim. The relationships between alterations in cholesterol metabolism and neurodegenerative disorders/dementia are poorly defined. Interest is growing on Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9), and on PCSK9 inhibitors as cholesterol-lowering drugs. Preliminary data have shown increased cerebrospinal fluid (CSF) concentrations of PCSK9 in Alzheimer's disease (AD) compared to control subjects. This study is aimed to investigate the relationships between sterol metabolism and AD by analysis of PCSK9 in serum and CSF.

Patients and Methods. We recruited subjects followed by the Neurology Unit of Modena City Hospital, with a diagnosis of: mild cognitive impairment with a stable clinical behavior at follow up (MCI); - MCI and a subsequent diagnosis of AD (MCI-AD); - AD upon initial evaluation (AD). Analysis on serum and CSF included PCSK9 determination, performed by ELISA.

Results. We studied 28 patients with MCI, 24 MCI-AD and 28 patients with overt AD. No difference was observed in CSF levels of PCSK9 among all groups; serum PCSK9 concentrations were lower in AD patients, compared with MCI and MCI-AD subjects (respectively, $p<0.01$ and $p<0.05$, one-way ANOVA). In AD patients, apoE4 allele carriers presented lower CSF PCSK9 levels compared to non-carriers (-38%; $p=0.04$). No correlation was detected between plasma and CSF concentrations of PCSK9 in the whole cohort ($r=0.110$; $p=0.331$). However, a correlation was present in AD subjects ($r=0.521$; $p=0.004$).

Discussion. No significant differences in CSF levels of PCSK9 were detected among the different groups; however, CSF concentrations of PCSK9 might be influenced by apoE4 isoform, as recognized. Plasma PCSK9 was lower in AD patients. Interestingly, we found a significant correlation between CSF and plasma PCSK9 in AD patients. We speculate that PCSK9 may reach the SNC in AD due to increased permeability of the blood-brain barrier.

GENDER DIFFERENCES IN LIPOPROTEIN(A) CONCENTRATION AS PREDICTORS OF CORONARY REVASCULARIZATION IN PATIENTS WITH CORONARY ARTERY DISEASE

F. Bigazzi¹, T. Sampietro¹, C. Sirtori², A. Corsini², F. Sbrana¹, B. Dal Pino¹, M. Ruscica²

¹Fondazione Toscana Gabriele Monasterio;

²Università degli Studi di Milano

E-mail: massimiliano.ruscica@unimi.it

Background and Aims. The use of Lp(a) levels as a screening determinant in secondary prevention, particularly in coronary patients, have been receiving increasing attention, although discordant findings are reported with limited evidence on women. Thus, in a follow-up study of 2 years, we evaluated the association between Lp(a) levels and the occurrence of major adverse coronary events in a large series of coronary patients (32% of women).

Methods. This single Center prospective cohort study investigated 3,034 consecutive patients admitted to the Coronary Care Unit with a diagnosis of coronary ischemia. According to the inclusion criteria, 2,374 patients were monitored every 3-6 months. The endpoints were non-fatal myocardial infarction, revascularization and coronary deaths.

Results. Lp(a) levels associate only with revascularization. According to Lp(a) stratification (<30 mg/dL, >30-50 mg/dL and ≥ 50 mg/dL) there was a significant rise of revascularization events in the whole sample of participants with a trend hazard ratio (HR) of 1.23 and a 6% rise for every 10 mg/dL increment in Lp(a) levels. This effect was mainly driven by women (HR 4.15) who showed a 14% incremental risk for every 10 mg/dL rise in Lp(a) levels.

Conclusions. In an Italian cohort of patients with coronary artery disease, these findings support the predictivity of Lp(a) levels on coronary revascularizations, especially in female patients.

EFFECTS OF BARIATRIC SURGERY ON PLASMA LEVELS OF ANGPTL3 AND ANGPTL4: ASSOCIATION WITH PARAMETERS OF GLUCOSE AND LIPID METABOLISM

S. Bini¹, S. Camasta², L. D'Erasmo¹, M. Palumbo², L. Polito¹, E. Ferrannini², M. Arca¹

¹Department of Translational and Precision Medicine, Sapienza University of Rome; ²Department of Clinical and Experimental Medicine, University of Pisa

E-mail: simone.bini@uniroma1.it

Introduction. ANGPTL3 and ANGPTL4 are main regulators of lipid metabolism due to their main action on LPL inhibition. Adipose tissue metabolism as well as insulin sensitivity might be also affected by ANGPTLs function. Aim of this research is to identify relations between changes of ANGPTLs levels in obese patients undergoing bariatric surgery and their relations with parameters of glucose and lipid metabolism.

Methods. Baseline and 1-year after bariatric surgery serum levels of ANGPTL3 and ANGPTL4 were measured in 42 patients submitted to Roux-en-Y gastric bypass (RYGB n=27) or bilio-pancreatic diversion (BPD n=15). Patients were analysed according to type of surgery and clinical condition (obese normal glucose tolerant (Ob NGT) vs Ob with type 2 diabetes (Ob T2D) in the RYGB group vs non-obese T2DM in the BPD group. Routine laboratory tests, markers of adipose tissue metabolic inflammation and dynamic insulin resistance tests were also determined.

Results. All patients achieved significant weight loss at 1-year after surgery [$p<0,001$]. Total Cholesterol (TC) did not show a significant reduction after surgery in RYGB group, while important TC reduction was achieved in BPD group [$p=0,009$]. However, HDL-C raised significantly in T2DM treated by RYGB [$p=0,02$]. All patients showed a significant improvement in insulin sensitivity by euglycemic clamp after surgery. Adiponectin levels, measured in RYGB patients only, nearly doubled 1-year after surgery either in NGT and T2DM patients. ANGPTL3 levels in non-obese patients submitted to BPD showed, surprisingly, a significant rise 1-year after surgery [from 225 ± 20 to 300 ± 15 ; $p=0,003$]. No change was observed in both ObNGT and ObT2D after RYGB. In the all data set. As expected, serum levels of ANGPTL3 were found to be associated with insulin sensitivity and, in T2D-BPD, with NEFA reduction and bile acid increase ($p<0,02$). ANGPTL4 levels, on the other hand, were reduced in all groups after surgery [$p<0,05$]. ANGPTL4 was inversely related to adiponectin and insulin sensitivity.

Discussion. ANGPTL3 increase was not expected in study design and may relate to chronic nutrient loss typical of BPD, which led to enhanced cholesterol synthesis. On the other hand, a drop in circulating ANGPTL4 levels was indeed expected. ANGPTL4 might exert a function in regulating adipokine production in adipose tissue and therefore may be crucial in indirect regulation of lipid metabolism and insulin resistance.

SUBCUTANEOUS ADIPOSE TISSUE ELASTOSONOGRAPHY IN OBESE PATIENTS: A PRELIMINARY REPORT

A. Boccatonda¹, M. Montagano¹, D. Caniglia¹, D. D'Ardes¹, G. Cocco², R. Liani³, R. Tripaldi³, M. Allegra¹, F. Santilli¹, M.T. Guagnano¹, C. Schiavone², M. Bucci¹, F. Cipollone¹

¹Clinica Medica Institute, European Center of Excellence on Atherosclerosis, Hypertension and Dyslipidemia, "G. D'Annunzio" University of Chieti-Pescara, Chieti;

²Unit of Ultrasound in Internal Medicine, Department of Medicine and Science of Aging, "G. D'Annunzio" University, Chieti;

³Department of Medicine and Aging, Center of Aging Science and Translational Medicine (CESI-Met), Chieti

E-mail: andrea.boccatonda@gmail.com

Introduction. Elastosonography is a diagnostic method measuring the rigidity or "stiffness" of the tissues. Its main application has been primarily the measurement of hepatic stiffness in patients with chronic liver disease. Recently, the use of new software and technologies has allowed its application to several organs (thyroid, muscle, prostate). The main objective of our study was to test the application of elastosonography to subcutaneous adipose tissue.

Materials and Methods. we recruited 12 obese non-diabetic subjects referred to the obesity clinic of the SS. Annunziata Hospital of Chieti. A clinical evaluation was performed with measurement of anthropometric parameters and laboratory tests (blood count, creatinine, uric acid, AST, ALT, GGT); then the patients underwent abdominal ultrasound with measurement of SAT, preperitoneal and visceral fat (VAT), hepatic elastosonography and SAT. The elastosonography of the SAT was performed by centering the roi in the subcutaneous adipose tissue, positioning the probe 2 cm above the navel along the xiphoumbilical line, between the external surface of the rectus abdomen and the skin; the final value was derived from an average of 10 measurements.

Results. The average age of the subjects examined was 54 years; median BMI was 40, waist circumference 117.5 cm and hip circumference 125.5 cm. The median hepatic stiffness was 4.65 kPa. The median stiffness value of the SAT was 9.9 kPa. On statistical analysis, E-SAT correlated with preperitoneal fat thickness ($p=0,001$; $\rho=0,786$), with VAT thickness ($p=0,011$; $\rho=0,676$), with body weight ($p=0,039$; $\rho=0,601$) and with the waist circumference ($p=0,034$; $\rho=0,613$). E-SAT did not correlate with the thickness of the SAT itself ($p=0,448$; $\rho=0,231$), did not correlate with E-liver ($p=0,183$; $\rho=0,413$) and did not correlate with age of the patients ($p=0,795$).

Conclusions. The elastosonography of the SAT seems to be a feasible and repeatable method. Comparative studies and with a larger sample size are needed to create a standardized method. The fact that the stiffness value does not correlate with the size of the SAT itself, but with the weight and waist circumference, suggests that the stiffness of the tissue is linked to a histological-tissue remodeling due to obesity itself, rather than to its actual measurable size.

METABOLIC REGULATION OF CD8+ T LYMPHOCYTES ACTIVATION BY THE LOW-DENSITY LIPOPROTEIN RECEPTOR (LDLR)

F. Bonacina¹, A. Moregola¹, M. Svecla¹, D. Coe², S. Beretta¹, G. Beretta³, F. Pellegatta⁴, A.L. Catapano¹, F. Marelli-Berg², G.D. Norata¹

¹Department of Pharmacological and Biomolecular Sciences, University of Milan; ²William Harvey Research Institute, Barts and The London School of Medicine & Dentistry, Queen Mary University (London, UK); ³Department of Environmental Science and Policy, University of Milan;

⁴IRCCS Multimedica, Milan

E-mail: fabrizia.bonacina@unimi.it

Aim. Activation of T lymphocytes combines functional to metabolic rewiring of cell machinery, including cholesterol homeostasis. Here, we evaluated the role cellular cholesterol acquired via the LDLR pathway on Tcell biology.

Methods. Immunophenotypic characterization of T cells from WT and LDLR KO mice was performed in vitro (anti-CD3/CD28) and in vivo (vaccination, homeostatic proliferation in Rag2 KO mice adoptively transferred with Tcells from LDL-R KO and WT mice) coupled to proteomic and seahorse analysis on isolated T cells. In parallel, T cells from FH (familial hypercholesterolemia) patients, carrying mutations in the LDLR gene, were tested.

Results. LDLR mRNA and protein expression increased after in vitro activation of CD8, suggesting a peculiar regulation of cholesterol homeostasis in CD8 T cell subset. Functionally, LDLR deficiency mainly damped CD8+ proliferation (-35%, p<0.01) paralleled by a reduction in INF γ production (-39.6%, p<0.01). In vivo antigen-specific activation by ovalbumin vaccination, but not homeostatic proliferation, resulted in a decreased proliferation and cytokines production (\downarrow IFN γ p<0.001, \downarrow IL13 p<0.01, \downarrow perforin p<0.05) in CD8+ of KO mice. In addition, markers of rapid activation, such as CD69 (-32%, p<0.01), and AKT phosphorylation, a downstream molecule of the TCR, were decreased in KO CD8+ compared to WT. Finally, proteomic and seahorse analysis pointed out metabolic defects with reduction of both glycolytic and OXPHOS metabolism and impaired lysosomal-derived mTORC1 activation, thus linking functional to metabolic alteration in CD8+ T cells from LDLR KO compared to WT mice. When tested in humans, CD8+ T cells from FH patients proliferated less (-36%, p>0.05) compared to sex- and age-matched controls; in addition, when CD8+T cells from FH vaccinated for seasonal influenza were tested in vitro with virus-derived peptides, presented a decreased granzyme production (-60.3%, p<0.01) compared to CD8+T cells from vaccinated controls, indicating a reduced CD8 effector response to virus infection.

Conclusions. LDLR plays a critical role in regulating the immunometabolic responses in CD8+ Tcells, and thus might represent a checkpoint linking cellular cholesterol metabolism to adaptive immune response.

ATTAINMENT OF 2019 ESC/EAS LIPID TARGETS IN A COHORT OF VERY-HIGH RISK SUBJECTS IDENTIFIED THROUGH CARDIOLOGY AND LABORATORY DATABASES

E. Bonelli¹, S. Canovi¹, M. Foracchia², C. Trenti³, E.A. Negri³, I. Colaiori⁴, V. Guiducci⁴, S. Bertolini⁵, T. Fasano¹

¹Laboratorio Analisi Chimico-Cliniche e di Endocrinologia AUSL-IRCCS Reggio Emilia; ²Servizio Tecnologie Informatiche e Telematiche AUSL-IRCCS Reggio Emilia; ³Alta Intensità Medica AUSL-IRCCS Reggio Emilia; ⁴Emodinamica-Cardiologia AUSL-IRCCS Reggio Emilia; ⁵Dipartimento di Medicina Interna, Università di Genova

E-mail: tommaso.fasano@ausl.re.it

Introduction. In 2019, ESC/EAS released new guideline for the management of dyslipidemias, further reducing LDL-C targets as compared to 2016 guideline. The new LDL-C targets appear to be particularly challenging and literature data suggest that their attainment is largely suboptimal in clinical practice. We evaluated lipid goal attainment in a cohort of very-high risk patients.

Methods. Data of patients (\leq 65 years) subjected to percutaneous transluminal coronary angioplasty (PTCA) in 2014 and 2015 were extracted from interventional cardiology database (657) and those of subjects with LDL-C \geq 250 mg/dl in the same period were extracted from clinical laboratory database (284). Dutch Score (DS) was calculated on the basis of pre-treatment LDL-C values, family and clinical history of pCAD. Three groups were identified:

- 1) PTCA with DS<3 (PTCA_<3, 462);
- 2) PTCA with DS \geq 3 (PTCA_ \geq 3, 195);
- 3) LDL-C subjects all having DS \geq 5 (LDL_ \geq 5, 284).

Lipid profiles of all subjects were retrieved until March 2019 and comparison among 3 groups was performed.

Results. During the follow up period LDL-C values were significantly different among three groups: LDL-C median (IQR) mg/dl were 81(68-97) for PTCA_<3, 94(78-122) for PTCA_ \geq 3 and 186(143-220) for LDL_ \geq 5. Percentage of patients reaching the LDL-C goals recommended by 2016 and 2019 guidelines (\leq 70 mg/dl, \leq 55 mg/dl and 50% reduction) were 29%, 11% and 19% for PTCA_<3 and 15%, 3% and 35% for PTCA_ \geq 3. In the LDL_ \geq 5 group, 20% of subjects achieved 50% LDL-C reduction. Among PTCA patients, pre-treatment LDL-C values were significantly inversely associated with the probability to reach LDL-C \leq 55 mg/dl target and directly associated with the attainment of the 50% reduction goal.

Conclusions. Our study demonstrated that achievement of lipid goals was far to be reached in our cohort patients. Among PTCA patients pre-treatment LDL-C values significantly influence the response to the established lipid lowering therapy and the percentage of patients reaching the recommended targets.

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF PATIENTS WITH AND WITHOUT CORONARY ARTERY DISEASE WITH "EXTREME" LEVELS OF APOC-III AND TRIGLYCERIDES

F. Brucato¹, N. Martinelli², R. Spina¹, F. Busti², V. Ingrassia¹, C. Scrimali¹, G.I. Altieri¹, M. Gueli Alletti¹, D. Noto¹, G. Misiano¹, A. Giannamico¹, C.M. Barbagallo¹, F. Fayer¹, A.B. Cefalù¹, O. Olivieri², D. Girelli², M.R. Averna¹

¹Department of Health Promotion, Mother and Child Care, Internal Medicine and Medical Specialties (PROMISE), University of Palermo; ²Department of Medicine, University of Verona

E-mail: federicabrucato21@gmail.com

Introduction. Epidemiological and GWAS studies suggest a correlation between plasma triglyceride (TG) levels and coronary artery disease (CAD). Among genetic determinants involved in the metabolism of TG-rich lipoproteins, variants of genes encoding for ApoC-III and ApoA-V, seem to play a major role. Heterozygous carriers of loss of function (LOF) variants APOC3 gene have lower plasma levels of TG and apoC-III and a 40% risk reduction of developing CAD. More, rare loss of function variants of the APOA5 gene contribute to higher plasma TG levels and an increased risk of developing CAD. The NGS analysis allows to identify rare variants in candidate genes and their association to risk of developing CAD.

Materials and Methods. The study sample includes patients of Verona Heart Study (VHS) with angiographically documented CAD (positive CAD) and subjects without CAD who underwent coronary angiography for other clinical indication (negative CAD). We selected patients with extreme ApoC-III phenotype (<5° percentile - 6.1 mg/dl and >95° percentile - 17.3 mg/dl) and with TG <2° percentile (57 mg/dl) and >98° percentile (298 mg/dl). For genetic analysis, a large-scale sequencing system based on Ion Torrent technology has been developed. For each patient we selected variants in candidate genes known to be associated to regulate TG levels.

Results. Among the patients with ApoC-III levels <5° percentile, the NGS analysis revealed the presence of a pathogenetic mutation in APOC3 gene in one CAD negative subject. No other pathogenic variants have been identified in patients with low/high levels of TG. We analyzed shared variants among these patients and classified them as rare, polymorphism or unknown using the minor allele frequency (MAF). Although most of these variants are classified as polymorphism and individually cannot explain the phenotype, the presence of multiple variants in different genes could contribute to determine the clinical and biochemical phenotype.

ABNORMAL ANKLE-BRACHIAL INDEX IN A COHORT OF HIGH CV RISK PATIENTS WITH OR WITHOUT TYPE 2 DIABETES: DATA FROM THE MULTICENTER RELIVE STUDY

M. Bucci¹, F. Franzoni², R. Ieva³, F. Manetti⁴, M. Pirro⁵, G. Sartore⁶, A. Cicero⁷

¹University of Chieti; ²University of Pisa; ³University of Foggia;

⁴Santa Maria Annunziata Hospital, Bagno a Ripoli;

⁵University of Perugia; ⁶University of Padua; ⁷University of Bologna

E-mail: arrigo.cicero@unibo.it

Background. Ankle-brachial index (ABI) is a known risk factor for cardiovascular disease in general population and a reproducible tool for the early detection of peripheral artery disease (PAD). Our study aim was to evaluate the ABI distribution in high CV risk patients visited by Lipid clinics and Diabetological centers in Italy and its association with other CV risk factors and patients characteristics.

Methods. For this multicenter study, we consecutively enrolled 768 patients (F: 47.4%), with age included between 40 and 80 years old, high CV risk patients (Lipid clinics) and/or diabetics (Diabetological centers) at their first visit, without known PAD.

Results. The 30% (N. 198) of the enrolled patients with valid measurement had an abnormal ABI. Lipid-lowering therapies were equally distributed among subjects with normal and abnormal ABI. Abnormal ABI was significantly more prevalent in patients in secondary prevention than in those in primary prevention (41.4% vs. 25.5%, p<0.001). ABI distribution was similar in men and women, in smokers and non-smokers, hypertensives and normotensives, diabetics and non-diabetics.

Conclusion. The main result of this multicenter transversal investigation is that abnormal ABI is highly represented in high CV risk patients with or without type 2 diabetes. Further investigation are needed to understand if the implementation of ABI measurement could help to identify subjects with a worse CV risk profile, even in a high risk setting.

THE DIAGNOSTIC PERFORMANCE OF THE ITALIAN SOCIETY FOR THE STUDY OF ATHEROSCLEROSIS (SISA)-MODIFIED DUTCH LIPID CLINIC NETWORK (DLCN) CRITERIA IN A PEDIATRIC COHORT FROM LIPIGEN STUDY POPULATION: PRELIMINARY DATA

B. Bucciarelli¹, N. Cocomello², F. Bianco³, D. D'Ardes¹, F. Baratta², I. Rossi¹, F.M. Perla⁴, F. Angelico⁵, F. Cipollone¹, M. Del Ben², M. Bucci¹

¹Clinica Medica Division, Medicina e Scienze dell'Invecchiamento Department (LIPIGEN Study Group), G. d'Annunzio University of Chieti-Pescara, Chieti; ²Internal Medicine and Medical Specialties Department (LIPIGEN Study Group), Sapienza University of Rome; ³Pediatric and Congenital Cardiology Unit, Azienda Ospedaliero Universitaria di Ancona; ⁴Materno Infantile e Scienze Urologiche Department, Sapienza University of Rome; ⁵Public Health and Infectious Diseases Department (LIPIGEN Study Group), Sapienza University of Rome
E-mail: benedetta.bucciarelli@yahoo.com

Background. Familial hypercholesterolemia (FH) is a common and under-diagnosed autosomal dominant disorder associated with premature atherosclerotic cardiovascular disease (ASCVD). A strong association exists between elevated LDL-c levels and atherosclerosis, even in children. Early diagnosis and optimal FH-treatment is essential. The first step for FH diagnosis is the clinical valuation, although no international recommended clinical criteria exist yet. One of the main diagnostic tools includes the Dutch Lipid Clinic Network (DLCN) criteria. However, it is not validated in the pediatric population. Recently, the Italian Society for the Study of Atherosclerosis (SISA) proposed modified DLCN criteria adapted for patients younger than 18 years. Our aim was to compare the diagnostic performance of SISA-modified DLCN criteria with the European Society of Cardiology (ESC)-validated DLCNs in a pediatric cohort of patients derived from the LIPIGEN study.

Methods. We enrolled 82 consecutive children and adolescents [mean age 11±3 years old, 58% of male (n=48)], referred to the Lipigen Center of Chieti and Rome, for clinical suspicion of FH. All the patients enrolled underwent the FH DNA-test. SISA-modified and ESC-validated DLCNs criteria were assessed prior the genetic analysis. The diagnostic performance of both scores was assessed and compared utilizing the receiver operating characteristics (ROC) curves.

Results. The 65% of patients (n=53) were positive at the FH DNA-test for genetic mutations. The SISA-modified DLCNs showed better sensitivity than the ESC-validated DLCNs (53% vs. 21%, respectively), but less specificity (73% vs. 93%, respectively). When compared, no-statistical significance ($P=0.68$) was found between the two methods [AUC 0.65, 95% CI (0.52, 0.77) and AUC 0.63, 95% CI (0.52, 0.75), respectively].

Conclusions. The modified pediatric cut-offs proposed by SISA did not improve the diagnostic performance of DLCNs when compared with the ESC-validated DLCNs. Even if the SISA-modified DLCNs showed better sensitivity, the DLCNs by ESC showed higher specificity.

EZETIMIBE TREATMENT IN THREE PEDIATRIC PATIENTS WITH CHOLESTEROL ESTER STORAGE DISORDER (CESD)

R. Buganza¹, G. Massini², E. Bonino², A. Nyffenegger², L. de Sanctis¹, O. Guardamagna²

¹Department of Public Health and Pediatric Sciences, University of Turin, Pediatric Endocrinology Unit, Regina Margherita Children's Hospital, Turin; ²Department of Public Health and Pediatric Sciences, University of Turin
E-mail: buganzaraffaele@gmail.com

Introduction. Lysosomal Acid Lipase deficiency (LAL-D) is a rare metabolic storage disease characterized by cholestry esters and triglycerides accumulation in lysosomes. The variant cholesterol ester storage disorder (CESD) usually presents with dyslipidemia and liver involvement. No formal treatment guidelines exist so far and therapeutic options are still questionable. The aim of the study was to evaluate the ezetimibe therapy effects.

Methods. LAL-D was confirmed by analysis of LIPA gene in 3 children (SA, SF and PR, diagnosed at age 3, 4 and 7 years) showing dyslipidemia and slight elevation of transaminases. Liver ultrasonography, magnetic resonance (MR) and elastosonography by FibroScan were performed and lipid profile and transaminases monitored by classical methods, before and after 2 years of Ezetimibe 10 mg/day treatment.

Results. Molecular analysis of LIPA gene found in SA and SR the homozygosity for the classic mutation c.894G>A in exon 8 and in PR compound heterozygosity for c.894G>A and c.883C>T(p. H295Y) in exon 8. Liver ultrasonography and MR showed very mild steatosis and elastosonography were normal. Baseline lipid profile mean values in patient SA-SF-PR were: TC 241-223-340 mg/dl, LDL-C 176-159-269 mg/dl, HDL-C 29-34-37 mg/dl, TG 152-145-176 mg/dl. Ezetimibe treatment led to a TC reduction of 17-19-15% and LDL-C reduction of 22-27-18%, while HDL-C and TG showed mild discordant modifications. Baseline transaminases mean values were: ALT 84-79-55 UI/l, AST 75-59-44 UI/l. During Ezetimibe, ALT decreased by 32 and 29% in SA and SF, while increased by 2.5% in PR. AST decreased by 44 and 22% in SA and SF, while increased by 3% in PR.

Conclusions. Short- and medium-term ezetimibe therapy improved significantly TC and LDL-C in three children CESD affected, while the transaminase effect was variable. In LAL-D pediatric patients with mild phenotype Ezetimibe should be considered before enzyme replacement therapy, under a mandatory strict control.

ATORVASTATIN IN PEDIATRIC FAMILIAL HYPERCHOLESTEROLEMIA: TOWARDS A PERSONALIZED APPROACH

P.S. Buonuomo¹, I. Rana¹, B. Goffredo¹, G. Mastrogiovio¹, G. Pontrelli¹, M. Tarchi¹, D. Coccidiifero¹, E. Agolini¹, R. Simeoli¹, A. Bartuli²

¹Bambino Gesù Children's Hospital, Rome; ²Bambino Gesù Children's Hospital Rome

E-mail: psabrina.buonuomo@opbg.net

Familial Hypercholesterolemia (FH) is the most common inherited cholesterol disorder. People with FH usually develop early signs of atherosclerosis (artery thickening and blockage) by school age and have a higher likelihood of a heart attack before they reach middle age. If detected in childhood, treatment is available to delay or perhaps even prevent premature cardiovascular disease (CVD). Atorvastatin (ATV) is a lipid-lowering agent, approved in Italy for treatment of FH once daily at 10-20 mg doses in children aged 10 years or older. Although ATV is suggested as lipid-lowering therapy in children, the pharmacokinetics (PK) of ATV has not been clearly characterized in pediatric patients. Statins are highly effective prophylactics against arteriosclerosis. Nevertheless, a significant proportion of children consuming statins are not able to reduce LDL-C to a protective level for preventing cardiovascular disease. These outcomes suggest that genetic factors may influence patient responses to treatment with statins. It may be argued that a combination of data on Therapeutic Drug Monitoring (TDM) and pharmacogenetics for each patient are useful to personalize the therapeutic approach. The study was approved by the local Ethical Committee and is ongoing to date. We are enrolling and collecting data on 21 pediatric patients, divided into 3 subgroups: Naïve (N, they have just begun therapy), Low dose responders (LD-R, they assume therapy at the lowest dose, 10 mg/day, since 6 months or more), Low dose non-responders (LD-NR, they increased atorvastatin up to 20 mg/die because unresponsive). These findings, if confirmed, may have an impact on modulating and personalizing therapies selected for each patient.

CHANGES IN MARKERS OF SUBCLINICAL ATHEROSCLEROSIS IN PATIENTS WITH FAMILIAL HYPERCHOLESTEROLEMIA TREATED WITH EVOLOUCUMAB: A PROSPECTIVE COHORT STUDY

I. Calcaterra¹, A. Di Minno², M. Gentile¹, M. Tripaldella¹, A. Buonaiuto¹, F. Forte¹, M.D. Di Taranto³, C. Giacobbe³, G. Iannuzzo¹, P. Rubba¹, M.N.D. Di Minno⁴

¹Department of Clinical Medicine and Surgery, University Federico II, Naples; ²Department of Pharmacy, University Federico II, Naples; ³Department of Molecular Medicine and Medical Biotechnologies, University Federico II, Naples; ⁴Department of Translational Medical Sciences, University Federico II, Naples
E-mail: ileniacalcaterra@hotmail.it

Background. PCSK9 inhibitors demonstrated efficacy in cholesterol reduction and in the prevention of cardiovascular events. We evaluated changes in lipid profile, oxidation markers and markers of subclinical atherosclerosis in patients with familial hypercholesterolemia (FH) during 12 weeks of treatment with a PCSK9 inhibitor, Evolocumab.

Methods. Patients with FH starting a treatment with Evolocumab were included. Total cholesterol (TC), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), lipoprotein(a) (Lp(a)), small dense LDL (assessed by LDL score), 11-dehydro-thromboxane (11-TXB2), 8-iso-prostaglandin-2alpha (8-iso-PGF2α), flow-mediated dilation (FMD), reactive hyperaemia index (RHI) and carotid stiffness were evaluated before starting treatment and after 12 weeks of treatment.

Results. Twenty-five subjects were enrolled (52% males, mean age 51.5 years). At 12-week assessment, the median reduction was 38% for TC, 52% for LDL-C, 7% for Lp(a) and 46% for LDL score. In parallel, 11-TXB2 and 8-iso-PGF2α were reduced of 18% and 17%, respectively. FMD changed from 4.78%±2.27 at baseline to 10.6%±5.89 ($p<0.001$) at 12 weeks, with RHI changing from 2.37±1.23 to 3.76±1.36 ($p<0.001$). Carotid stiffness changed from 8.8 (IQR: 7.0-10.4) m/sec to 6.6 (IQR: 5.4-7.5) m/sec, corresponding to a change of 21.4% ($p<0.001$), with a significant increase in carotid distensibility (from 12.1, IQR: 8.73-19.3 kPA-1×10-3 at T0 to 21.8, IQR: 16.6-31.8 kPA-1×10-3 at T12w) corresponding to a median change of 62.8% ($p<0.001$). Change in LDL score was an independent predictor of changes in FMD ($\beta=-0.846$, $p=0.015$), carotid stiffness ($\beta=0.429$, $p=0.041$), and in 8-iso-PGF2α ($\beta = 0.778$, $p = 0.012$).

Conclusions. Small dense LDL reduction is related to changes in oxidation markers, endothelial function and carotid stiffness in patients with FH treated with Evolocumab.

IMPROVEMENT OF QUALITY OF LIFE IN A PATIENT WITH FAMILIAL CHYLOMICRONEMIA SYNDROME TREATED WITH VOLANESORSEN

I. Calcaterra¹, N. Vitelli¹, F. Forte¹, A. Buonaiuto¹, G. Iannuzzo¹, M.N.D. Di Minno²

¹Department of Clinical Medicine and Surgery, Federico II University, Naples; ²Department of Translational Medical Sciences, Federico II University, Naples

E-mail: ileniacalcaterra@hotmail.it

Background. Familial chylomicronemia syndrome (FCS) is a rare autosomal recessive disease due to alteration in clearance of chylomicrons, large lipoprotein rich in triglycerides (TG). This clinical condition is characterized by the presence of very high levels of TG (>885 mg/dl), multiple recurrent acute pancreatitis, abdominal pain, eruptive xanthomas, hepatosplenomegaly, lipemia retinalis, neurologic symptoms. FCS patient are usually refractory to standard therapies. Symptoms related to high TG levels and consequences of recurrent pancreatitis have a strong impact on patients' quality of life (QoL). The antisense oligonucleotide against APOC3 mRNA volanesorsen showed efficacy in treatment of FCS patients.

Case report. A 42-years old man with FCS and severely high TGs and history of necrotizing pancreatitis (2017) was admitted to our dyslipidemia-center to treat hypertriglyceridemia. The patient reported constant abdominal pain, fatigue and anxiety related to the disease burden. An initial management included a very restricted low caloric diet (reduced intake of carbohydrates, fats, no alcohol) and therapy with fenofibrate 145 mg, maximum doses of omega-3 fatty acids, atorvastatin 20 mg, medium chain TG oil. Despite full adherence to therapy and diet for 18 month fasting TG value was 1763 mg/dl associated to symptoms persistence. In June 2020, we added Volanesorsen 300 mg subcutaneously once a week to background lipid lowering therapy. After 12 weeks of treatment TG value was 472 mg/dl. The marked reduction of TG was associated to total disappearance of abdominal pain, fatigue and in turn of anxiety. No adverse events or blood test abnormalities were reported during treatment. In our patient, treatment with volanesorsen lead to significant TG and symptoms reduction having a positive impact on QoL improving patient activities of daily living.

TREATMENT WITH EVOLOCUMAB IN A PATIENT WITH PREVIOUS STATIN-INDUCED NECROTIZING MYOPATHY: A CASE REPORT

I.A. Calcaterra¹, M. Tripaldella¹, F. Forte¹, A. Buonaiuto¹, G. Iannuzzo¹, M.N.D. Di Minno²

¹Department of Clinical Medicine and Surgery, Federico II University, Naples; ²Department of Translational Medical Sciences, Federico II University, Naples

E-mail: ileniacalcaterra@hotmail.it

Background. Immune-mediated necrotizing myopathy (IMNM) is a rare and dangerous side effect due to statin therapy. IMNM is related to antibodies against the catalytic domain of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase (anti-HMG-CoA). Clinical picture of IMNM is characterized by myalgia with symmetrical and proximal weakness and severe elevation of creatinine kinase (CK) levels. PCSK9 inhibitors demonstrated efficacy and safety in patients with statin intolerance.

Case Report. A 56-years-old woman with polygenic hypercholesterolemia was treated for 10 years with simvastatin 10 mg. In 2017, her general practitioner increased the dose of simvastatin from 10 to 20 mg to reach therapeutic target. After two weeks patient reported muscle pain, weakness and elevation of CK value (14,000 U/L). She was admitted to emergency department with diagnosis of rhabdomyolysis. Subsequently, because of symptoms persistence in the frame of a second level diagnostic workflow she was diagnosed with "IMNM with high titer anti-HMGCoAR antibodies". Corticosteroid and immunosuppressive therapy was set up, with a recovery of muscle function, and anti-HMGCoAR antibodies negativization. In 2018 the patient was admitted to our dyslipidemia center to treat hypercholesterolemia. Her LDL-C was 183 mg/dl. CK was 180 U/L. We suggested life style changes and evaluated the patient after six months. Lipid parameters were unchanged. We started treatment with Evolocumab 140 mg biweekly. After 12 weeks LDL-C value was 94 mg/dl and no adverse events were reported. During follow up, patient reported worsening asthenia associated with CPK elevation (maximum of 730 U/L). Thus, we decided to stop therapy with Evolocumab. A musculoskeletal RM was performed and confirmed an exacerbation of IMNM that lead to a strengthening of immunosuppressive therapy. In our experience, PCSK9 inhibitors should be considered with great caution in patients with IMNM. Dedicated studies are needed to address this issue.

EFFECT OF ANTI-PCSK9 MONOCLONAL ANTIBODY THERAPY ON PLATELET ACTIVATION IN PATIENTS WITH FAMILIAL HYPERCHOLESTEROLEMIA

V. Cammisotto¹, R. Carnevale², C. Nocella³, C. Barale⁴, R. Scicali⁵, L. D'Erasmo⁶, D. Pastori⁷, I. Russo⁸, F. Purrello⁹, M. Arca¹⁰, F. Violì¹¹, P. Pignatelli¹¹

¹Sapienza University of Rome, Department of General Surgery and Surgical Speciality Paride Stefanini, Roma; ²Department of Medical-Surgical Sciences and Biotechnologies, Latina; ³Sapienza University of Rome; ⁴Department of Clinical, Internal Medicine, Anesthesiological and Cardiovascular Sciences, Roma; ⁴Department of Clinical and Biological Sciences, Turin; ⁵University of Catania, Department of Clinical and Experimental Medicine, Internal Medicine, Catania; ⁶Sapienza University of Rome, Department of Translational and Precision Medicine, Roma; ⁷Sapienza University of Rome, Department of Clinical, Internal Medicine, Anesthesiological and Cardiovascular Sciences; ⁸Turin University, Department of Clinical and Biological Sciences; ⁹University of Catania, Department of Clinical and Experimental Medicine; ¹⁰Sapienza University of Rome, Department of Translational and Precision Medicine; ¹¹Sapienza University of Rome, Clinical, Internal Medicine, Anesthesiological and Cardiovascular Sciences
E-mail: vittoria.cammisotto@uniroma1.it

Background. High circulating levels of proprotein convertase subtilisin/kexin 9 (PCSK9) are associated with an increased risk of cardiovascular events (CVEs) and with platelet activation. Furthermore, hypercholesterolemia (HC), a risk factor for CV disease, is characterized by platelet overactivity. Thus, the aim of this study is to demonstrate that PCSK9 inhibitors can influence directly platelet activation (PA) and elucidate the underlying mechanism.

Methods. We conducted a prospective, multi-center cohort study of 80 patients with confirmed genetic diagnosis of familial HC undergone treatment with anti-PCSK9 mAbs. We selected and balanced patient for age, sex and cardiovascular risk factors and evaluate platelet function at baseline and after 6 months of treatments. PA was assessed by evaluation of plasma TxB2 formation. Nox2 activation as assessed by soluble NOX2-derived peptide (sNox2-dp), plasma H2O2 and oxLDL and isoprostanes were used as markers of oxidative stress (OS).

Results. The results showed that treatment with anti-PCSK9 mAbs, induce an improvement of platelet function and oxidative stress parameters. In particular, we found that patients after 6 months of treatment with anti-PCSK9 mAbs showed lower levels of serum TxB2 compared to baseline. Similarly, OS parameters like sNox2-dp release, plasma H2O2 productio, oxLDL formation and isoprostanes levels were significantly decreased after 6 months of treatment.

Conclusions. In this study, we provide evidence that PCSK9 inhibitor could play a role in the reduction of CV risk in HC patients by acting on PA and involving the mechanisms of oxidative stress.

PROPROTEIN CONVERTASE SUBTILISIN-KEXIN TYPE 9 BINDING TO SERUM LIPOPROTEINS: A METODOLOGICAL COMPARISON

L. Canclini¹, A.M. Malvandi², V. Zampoleri³, A. Baragetti³, L. Grigore⁴, A.L. Catapano¹

¹Laboratory of Genetic Dyslipidemia and Atherosclerosis, IRCCS MultiMedica, Milan, Department of Pharmacological and Biomolecular Sciences, University of Milan; ²Laboratory of Genetic Dyslipidemia and Atherosclerosis, IRCCS MultiMedica, Milan;

³Department of Pharmacological and Biomolecular Sciences, University of Milan, Center for the Study of Atherosclerosis, Bassini Hospital, Cinisello Balsamo, Milan; ⁴Center for the Study of Atherosclerosis, Bassini Hospital, Cinisello Balsamo; Milan
E-mail: laura.canclini@unimi.it

Introduction. Elevated low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) is a well-established cardiovascular risk factor. Proprotein convertase subtilisin-kexin type 9 (PCSK9) increases LDL-C levels in plasma by enhancing the degradation of hepatic LDL receptor. PCSK9 seems to travel in circulation associated to lipoproteins (LPs), but data in literature are discordant. By comparing different protocols for LPs isolation, we aimed at finding the best one for confirming the existence of this association and building up future clinical studies.

Material and Methods. Fresh serum was collected from healthy volunteers and lipoproteins were obtained using different methods, including precipitation with phosphotungstic acid, fast protein liquid chromatography (FPLC), ultracentrifugation using KBr or iodixanol gradient (IGr). The PCSK9 content of the lipoprotein fractions obtained was quantified with ELISA, while lipoprotein(a), apolipoprotein B, apolipoprotein A1 and cholesterol were measured using clinical-grade reactives.

Results and Conclusions. The precipitation-mediated assay resulted in more than 80% of PCSK9 found associated with the apoB precipitate; conversely, negligible amount of PCSK9 was detectable in lipoprotein fractions isolated by KBr ultracentrifugation. With FPLC, around 10% of recovered PCSK9 co-eluted with LDL, whereas around 20% of PCSK9 was found in the LDL fractions obtained with the IGr ultracentrifugation. Our results suggest that the association of PCSK9 and LDL is sensitive to high salt concentrations and the extent of the estimated association depends on the methodology used. IGr ultracentrifugation and FPLC appear to be both suitable for further biological and clinical studies.

LPA VARIANTS ARE ASSOCIATED WITH INCREASED LIPOPROTEIN(A) CONCENTRATIONS AND ATHEROSCLEROTIC CARDIOVASCULAR DISEASE IN FAMILIAL HYPERCHOLESTEROLEMIA

A. Cavicchioli, S. Lugari, A. Pontara, G. Onfiani, E. Zardi, A. Mondelli, P. Vita, E. Pellegrini, P. Andreone, F. Carubbi, F. Nascimbeni
Internal and Metabolic Medicine, Civil Hospital, A.O.U. of Modena and University of Modena and Reggio Emilia
 E-mail: alessia.cavicchioli.1990@gmail.com

Introduction and Aims. The rs10455872 and rs3798220 variants in LPA gene are associated with increased plasma concentrations of lipoprotein(a) [Lp(a)] and atherosclerotic cardiovascular disease (ASCVD) in the general population. We aimed to determine if this holds true also in familial hypercholesterolemia (FH).

Methods. 148 consecutive patients (men/women 75/73, age 48[12-82] years) with clinical suspicion of FH from the Lipid Clinic in Modena underwent comprehensive evaluation, including Lp(a) measurement and genotyping of rs10455872 and rs3798220 LPA variants, within the LIPIGEN Project. HyperLp(a) was defined as Lp(a) concentrations higher than 50 mg/dl.

Results. Median Lp(a) levels were 23.8[1.3-340] mg/dl; 43 patients (29.1%) presented hyperLp(a). 23 patients (15.5%) had a history of ASCVD. A mutation in FH-causing genes and at least one LPA variant were found in 105 (70.9%) and 15 (10.1%) patients, respectively. 10 patients were heterozygous for the rs10455872 LPA variant; 3 patients were heterozygous and 2 were homozygous for the rs3798220 LPA variant. Carriers of at least one LPA variant had significantly higher Lp(a) levels (130.3[3.9-340] vs. 19.3[1.3-226.9] mg/dl, p<.001) and were more likely to have hyperLp(a) (80% vs. 23.3%, p<.001) than non-carriers. Patients without mutations in FH-causing genes more frequently presented hyperLp(a) (41.9% vs. 23.8%, p=.028) and at least one LPA variant (18.6% vs. 6.7%, p=.029) than FH mutation-positive patients. FH patients with a history of ASCVD showed significantly higher levels of Lp(a) (p=.031) and were more likely to be carriers of at least one LPA variant (26.1% vs. 7.2%, p=.006) than patients in primary CV prevention. Of note, carrying at least one LPA variant was significantly associated with a history of ASCVD independently of age, gender, FH mutational status and presence of hyperLp(a) (adjusted OR:4.7, 95%CI:1.1-19.6;p=0.035).

Conclusions. Our study confirms that rs10455872 and rs3798220 LPA variants are associated with increased Lp(a) concentrations and ASCVD also in FH patients.

EFFICACY AND SAFETY OF INCLISIRAN: A SYSTEMATIC REVIEW AND POOLED ANALYSIS OF PHASE 2 AND PHASE 3 CLINICAL STUDIES

A.F.G. Cicero¹, F. Fogacci¹, A. Zambon², P.P. Toth³, C. Borghi¹

¹Hypertension and Cardiovascular Risk Factors Research Group, Medical and Surgical Sciences Department, Sant'Orsola-Malpighi University Hospital, Bologna; ²IRCCS MultiMedica, S. Giovanni Milano, Department of Medicine-DIMED, University of Padua;

³CGH Medical Center, Sterling, Illinois, and Cicarrone Center for the Prevention of Cardiovascular Disease, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, MD, USA
 E-mail: federicafogacci@gmail.com

Aim. To assess the efficacy and safety of inclisiran treatment with a systematic review of the literature and a meta-analysis of the available clinical studies.

Methods. A systematic literature search in several databases was conducted up to August 13th, 2020, in order to identify clinical trials assessing the effect on lipoproteins and the safety profile of inclisiran. The magnitude of the effect for lipid changes was expressed as percentage mean differences (MD) and 95% confidence intervals (CI). For the safety analysis, odd ratios (OR) and 95% CI were calculated using the Mantel-Haenszel method.

Results. Data were pooled from 4 clinical studies comprising 24 arms, which included 4226 subjects overall, with 2254 in the active-treated arm and 1972 in the control arm. Meta-analyses of data suggested that the multiple-dose regimen of inclisiran yielded a significant reduction in serum levels of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (MD=-78.23, 95%CI: -86.74,-69.71) and low-density lipoprotein cholesterol (MD=-45.48%, 95%CI: -50.36%,-40.61%) throughout the studies. Furthermore, treatment with inclisiran significantly affected total cholesterol (MD=-13.67%, 95%CI: -20.78%,-6.57%), high-density cholesterol (MD= 8.29%, 95%CI: 4.66%,11.93%), non-HDL cholesterol (MD= -39.45%, 95%CI: -43.6%,-35.31%), apolipoprotein B (MD=-34.58%, 95%CI: -38.78%,-30.78%) and lipoprotein(a) (MD=20.9%, 95%CI: -25.8%, -15.99%). Multiple-dose regimens of inclisiran were associated with increased risk of injection-site reactions (any reaction: OR=5.86, 95%CI: 3.44,9.98; mild reactions: OR=5.19, 95%CI: 1.68,16.07; moderate reactions: OR=13.37, 95%CI: 3.17,56.46), and bronchitis (OR=1.58, 95%CI: 1.10,2.26), while the incidence of the pre-specified exploratory CV endpoint significantly decreased at 18 months (OR=0.74, 95%CI: 0.58,0.94).

Conclusions. Inclisiran has favourable effects on lipids serum levels and an acceptable safety profile. Further well-designed studies are needed to explore its longer-term safety.

PREVALENT COOKING FATS, HAEMODYNAMIC AND METABOLIC FEATURES IN A RURAL POPULATION SAMPLE: DATA FROM THE BRISIGHELLA HEART STUDY

A.F.G. Cicero, F. Fogacci, E. Grandi, E. Rizzoli, M. Bove, S. D'Addato, C. Borghi

*Hypertension and Atherosclerosis Research Group, Medical and Surgical Sciences Department, University of Bologna
E-mail: arrigo.cicero@unibo.it*

Background. Dietary fats have been variably associated with cardiovascular risk factors levels. Our study aim was to evaluate the association of different prevalent everyday use of cooking fats with a large number of parameters.

Methods. For this study, we selected from the Brisighella Heart Study cohort subjects not assuming antihypertensive drugs and who reported their mean daily use of cooking fats. Based on the prevalent cooking fat source the subjects were classified as prevalent extra-virgin olive oil (EVO) users, prevalent corn oil users, prevalent users of different vegetable oils, and prevalent animal fat users, and we compared their characteristics.

Results. Overall everyday consumption of EVO as a main cooking fat source was associated to the healthier anthropometric, metabolic and haemodynamic profile, especially when compared with animal fats as main cooking fat sources. In particular, in an age and SBP adjusted model, cfPVW value was significantly predicted by the prevalent use of EVO (RR=0.84, 95%CI 0.67-0.94 vs. other prevalent fat sources), LDL-C (RR=1.12, 95% CI 1.02-1.42), SUA (RR=1.21, 95%CI 1.09-1.54) and eGFR (RR=0.77, 95%CI 0.59-0.99).

Conclusion. Prevalent EVO use as everyday cooking fat is associated with an overall healthier metabolic and haemodynamic pattern in a large rural population sample.

COMPARISON BETWEEN DUTCH LIPID CLINIC NETWORK (DLCN) CRITERIA, SIMON BROOME REGISTER GROUP (SB) AND US MEDPED PROGRAM DIAGNOSTIC PERFORMANCE IN A PEDIATRIC COHORT FROM LIPIGEN STUDY POPULATION: PRELIMINARY DATA

N. Cocomello¹, B. Bucciarelli², F. Bianco³, D. D'Ardes², F. Baratta¹, I. Rossi¹, A. Boccatonda², F.M. Perla⁴, F. Angelico⁵, F. Cipollone², M. Del Ben¹, M. Bucci²

¹*Internal Medicine and Medical Specialties Department (LIPIGEN Study Group), Sapienza University of Rome;* ²*Clinica Medica Division, Medicina e Scienze dell'Invecchiamento Department (LIPIGEN Study Group), G. d'Annunzio University of Chieti-Pescara, Chieti;* ³*Pediatric and Congenital Cardiology Unit, Azienda Ospedaliero Universitaria of Ancona;* ⁴*Materno Infantile e Scienze Urologiche Department, Sapienza University of Rome;* ⁵*Public Health and Infectious Diseases Department (LIPIGEN Study Group), Sapienza University of Rome
E-mail: benedetta.bucciarelli@yahoo.com*

Background. Familial hypercholesterolemia (FH) is a common, under-diagnosed, genetic cause of premature atherosclerotic cardiovascular disease (ASCVD). So far, no international recommended clinical criteria for FH exist and the Dutch Lipid Clinic Network (DLCN) criteria are not validated in pediatric population. On the other hand, both UK Simon Broome Register Group (SB) and US MedPed Program criteria have specific LDL-c levels cut-off for pediatrics. Our aim was to compare the diagnostic performance of DLCN criteria to the SB and the US MedPed Program ones, in a pediatric cohort derived from the LIPIGEN study.

Methods. We enrolled 52 consecutive children and adolescents [mean age 10.8±3.2 years old, 65% of male (n=34)], referred to the LIPIGEN Centers of Chieti and Rome, for clinical suspicion of FH. All the patients enrolled underwent the FH DNA-testing. As DLCNs is a point score, the clinical diagnosis of FH was considered “likely” for patients who achieved a DLCN score ≥6 and “unlikely” for who achieved a DLCN score <6. Participants with FH-like diagnosis as for DLCNs were compared to the ones who showed a high probability of carrying a FH mutation with SB and MedPed criteria. The diagnostic performance of the three scores was assessed and compared utilizing the receiver operating characteristics (ROC) curves.

Results. The 63% of patients (n=33) were positive at the FH DNA-test for genetic mutations. The SB score showed the best diagnostic performance [sensitivity 51.51%, specificity 94.74%; AUC 0.73, 95% CI (0.63, 0.83), p=0.0017] as compared to both DLCN [sensitivity 24.24%, specificity 94.74%, AUC 0.59, 95% CI (0.50, 0.68)] and MedPed scores [sensitivity 48.48%, specificity 89.47%, AUC 0.69, 95% CI (0.57, 0.80)].

Conclusions. In our cohort, the SB criteria demonstrated the best performance for FH diagnosis; however, no one of the three scores showed to improve the clinical detection of FH in pediatrics.

DEVELOPMENT OF LIPUTILS, A MODULE TO EXTRACT FATTY ACID MOIETIES FROM LIPIDOMIC ANALYTES

A. Colombo¹, M. Busnelli¹, M. Kiamehr², G. Chiesa¹, S. Manzini¹
¹Department of Pharmacological and Biomolecular Sciences,
 University of Milan; ²Faculty of Medicine and Health Technology,
 Tampere University, Tampere, Finland
 E-mail: alice.colombo10@gmail.com

Lipidomic analyses address the problem of characterizing the lipid components of given cells, tissues and organisms by means of chromatographic separations coupled to high-resolution, tandem mass spectrometry analyses. A number of software tools have been developed to help in the daunting task of mass spectrometry signal processing and cleaning, peak analysis and compound identification, and a typical finished lipidomic dataset contains hundreds to thousands of individual molecular lipid species. To provide researchers without a specific technical expertise in mass spectrometry the possibility of broadening the exploration of lipidomic datasets, we have developed liputils, a Python module that specializes in the extraction of fatty acid moieties from individual molecular lipids. There is no prerequisite data format, as liputils extracts residues from RefMet-compliant textual identifiers and from annotations of other commercially available services. We provide an overview of liputils capabilities and three examples of real-world data processing with this newly developed module.

CARDIOMETABOLIC PROFILE IN PLIC-MI AND PLIC-CHIESA COHORTS: COMPARISON OF TWO DIFFERENT GEOGRAPHIC SETTINGS

O. Colpani^{1,2}, E. Tragni¹, M. Casula^{1,3}, E. Olmastroni¹,
 A.L. Catapano^{1,3}, P. Magni^{3,4}

¹Epidemiology and Preventive Pharmacology Service (SEFAP),
 Department of Pharmacological and Biomolecular Sciences (DiSFeB), University of Milan; ²Fondazione Bruno Kessler, Trento;

³IRCCS MultiMedica, Sesto S. Giovanni, Milan;

⁴SISA Centro per lo Studio della Aterosclerosi, Bassini Hospital, Cinisello Balsamo, Milan
 E-mail: ornella.colpani@unimi.it

Background. It is widely recognised that environmental factors and exercise affect cardiovascular health. We characterised two cohorts of subjects enrolled in two projects: the PLIC-MI study (conducted in the urban area of Milan) and the PLIC-CHIESA study (performed in Chiesa in Valmalenco [Sondrio], a clustered village in the Italian Alps). Because of their distinct geographical localisation, these two populations have different nutritional and socio-cultural habits, and lifestyles. Considering these differences, we aimed at comparing the cardiometabolic profiles between these two cohorts.

Methods. PLIC-MI and PLIC-CHIESA volunteers underwent fasting blood sampling, clinical examination, and carotid ultrasonography. For this analysis, subjects of the two cohorts were matched 1:1 by gender and age. Clinical and biochemical parameters and history of cardiovascular events were compared. To compare lifestyle behaviours, we calculated a score based on physical activity, alcohol consumption, smoke, and adherence to Mediterranean diet (ranging 0-4; score ≥3 was considered as 'healthy lifestyle').

Results. A total of 406 subjects (42.8% males; mean age 55 years) from each cohort were selected. PLIC-MI subjects exhibited higher mean values of weight (72.1 vs 68.5 kg, p<0.001), body mass index (26.5 vs 25.8 Kg/m², p<0.05), and waist circumference (91.0 vs 88.2 cm, p=0.001), and were more prone to metabolic syndrome (25.1 vs 19.3%, p<0.05), despite no differences in lipid parameters were observed. They showed also greater prevalence of sub-clinical atherosclerosis (31.0% vs 24.9%, p<0.05) and cardiovascular disease (5.8% vs 3.4%, p<0.01). The PLIC-CHIESA individuals were less adherent to Mediterranean diet (mean PREDIMED score 7.38 vs 8.22, p<0.001), but had higher prevalence of physical activity (35.4% vs 22.2%, p<0.001) and 'healthy lifestyle' (61.6% vs 53.5%, p<0.05).

Conclusions. Despite a lower adherence to Mediterranean diet, PLIC-CHIESA subjects showed an overall healthier cardiometabolic profile. The identification of the determinants of such differences deserves further insights.

PREVALENCE OF VASCULAR INVOLVEMENT AND LIVER FIBROSIS IN A COHORT OF NON-INSULIN RESISTANT MIXED HYPERLIPIDEMIC PATIENTS

D. Costantino¹, M. Cinquegrani¹, F. Savarino¹, M. Scuruchi², D. Sinicropi¹, V. Nassisi¹, G. Squadrato¹, A. Saitta¹, G. Mandruffino¹

¹University of Messina, Lipid Center, Unit of Internal Medicine;

²University of Messina, Molecular and biochemical Lab

E-mail: daniela_costantino@hotmail.it

Aim. Familial combined hyperlipidemia (FCHL) is the most prevalent primary dyslipidemia. Frequently it remains undiagnosed. It is characterized by fluctuations in serum lipid concentrations and may present as mixed hyperlipidemia, isolated hypercholesterolemia, hypertriglyceridemia, or as a normal serum lipid profile in combination with abnormally elevated levels of apolipoprotein B. An increased risk of hepatic steatosis has been observed in FCHL, with consistent associations for both NAFLD and non-alcoholic steatohepatitis (NASH) and up to 20-37% of the variability in intrahepatic fat content attributable to genetic factors in FCHL. The aim of our study was to evaluate the prevalence and incidence of NAFLD and/or NASH in FCHL patients.

Methods. In collaboration with general practitioners, we enrolled 69 patients (mean age 53 years; 35 male, 34 female) whose satisfied inclusion and exclusion criteria (HOMA-IR <2.4; ApoB >124 mg/dl and LDL-C >160 mg/dl, or HDL-C <50M and <60F mg/dl or Tg >180 mg/dl). Clinical and instrumental examination consisted of carotid ecocolorDoppler with PWV estimation, liver ultrasonography with Fibroscan.

Results. At baseline we found a mean CT level of 247.94±30.24, HDL-C level 56.26±16.29 in men and ± in women, Tg 124.14±65.91 mg/dl. ApoB was 131.38±29.53 on the average. HOMA-IR was 1.53±0.49. We found a carotid artery involvement, as cIMT >0.9 mm, in 28 pts (38%), and pts 24 (33%) had already carotid plaque. Any grade of liver steatosis was found in pts 35 (50%). Mean liver stiffness value was 5.38±1.76. We found a significant correlation between PWV and LS: r=0.83, p<0.001.

Conclusions. We found that about one third of included patients presented with carotid atherosclerosis already at diagnosis; moreover, mean LS was; PWV was also higher than age-related expected values. Moreover, we found a strong correlation between PWV and LS as measured by Fibroscan, also in our cohort of insulin-sensitive subjects.

ROLE OF PROPROTEIN CONVERTASE SUBTILISIN/KEXIN TYPE 9 (PCSK9) IN HEART METABOLISM

L. Da Dalt¹, L. Castiglioni¹, A. Baragetti¹, M. Audano¹, M. Svecla¹, F. Pellegatta², L. Sironi¹, N. Mitro¹, A.L. Catapano^{1,3}, G.D. Norata¹

¹Department of Pharmacological and Biomolecular Sciences, University of Milan; ²Centro SISA, Ospedale Bassini, Cinisello Balsamo, Milan; ³IRCCS MultiMedica, Sesto S. Giovanni, Milan

E-mail: lorenzo.dadalt@unimi.it

Background and Aim. Patients with diabetes are more prone to develop congestive heart failure which could also be the direct consequence of underlying dyslipidemia which could drive cellular lipotoxicity and cardiac damage independently of ischemic cardiomyopathy. Plasma lipoproteins contribute to delivering cholesterol to cardiomyocytes by interacting with specific cell surface receptors including the low-density lipoprotein receptor and CD36. Under diabetic conditions, increased expression of lipoprotein receptors in the heart has been associated with lipid accumulation in cardiomyocytes through augmented uptake of cholesterol esters in the heart. Lipid overload in diabetic cardiomyocytes, in turn, associates with impaired mitochondrial function, decreased ATP and energy production, thus supporting heart failure in animal models and humans under dysmetabolic and diabetic conditions. This study aimed was to test the impact of PCSK9 deficiency which regulates lipoprotein and Fatty acids receptors on cardiac lipotoxicity and heart metabolic rewiring.

Methods. 2-months old WT and PCSK9 KO male mice were fed for 20 weeks with SFD (Standard Fat Diet - 10% Kcal fat). Echocardiographic analysis has been performed on these mice and the hearts have been collected. Mitochondrial respiration was investigated under resting conditions and following maximal coupling and uncoupling conditions in all mice models. A metabolomic analysis has been performed and changes in the profile of mitochondrial proteins were tested by western blotting, metabolomic and proteomic analysis.

Results. PCSK9 deficiency result in morphological alteration in the heart of PCSK9 KO mice that has an increased thickness of the left ventricular wall with preserved Ejection Fraction compare to WT. PCSK9 KO mice show a reduced running distance and time compared to WT while no difference was observed in muscular strength. The lack of PCSK9 is further associated with reduced Oxygen consumption in the heart and WB analysis of electron transport chain subunits displayed a reduced expression of key proteins of complex 1, 2 and 3 in PCSK9 KO mice compared to controls. The lack of PCSK9 in the heart is affecting the expression of the major receptor involved in fatty acids and cholesterol uptake leading to intracardiac cholesterol accumulation. The accumulation of intermediates of fatty acid oxidation, including carnitine-conjugated fatty acid (C8; 0,066±0,047 Vs0,195±0,035 and C12; 0,021±0,018Vs0,11±0,069 pg/ug of prot, p<0,05) which was paralleled by a reduction of glucose-6-P, ribose-5P and erythrose-4P levels in the heart, suggesting a shift from fatty acid oxidation toward glycolysis. As a net effect, intermediates of Krebs cycle were reduced in PCSK9 KO hearts compared to WT samples suggesting an impaired activity.

Conclusion and Discussion. PCSK9 deficiency results in a morphological and metabolic alteration in the heart that develops Heart Failure with preserved ejection Fraction.

PROGNOSTIC MEANING OF CORONARY FLOW RESERVE ON THE LEFT ANTERIOR DESCENDING ARTERY IN HOMOZYGOUS FAMILIAL HYPERCHOLESTEROLEMIA: A CASE REPORT

B. Dal Pino, E. Pasanisi, F. Sbrana, F. Bigazzi, T. Sampietro
Fondazione Toscana "Gabriele Monasterio, Pisa"
 E-mail: francesco.sbrana@ftgm.it

Aim. Homozygous familial hypercholesterolemia (HoFH) is a rare disease that complicates with severe cardiovascular disease since childhood. HoFH patients need to be followed by cardiovascular imaging through their entire life span facing the risk of excessive radiological/ nuclear exposure.

Case description. In a 36-years old female, compound heterozygote for LDL-Receptor gene mutations, coronary flow reserve (CFR) was evaluated on left descending artery (LAD) during transthoracic dipyridamole stress echocardiography (DSE), before and after two years of lipid lowering therapy. The patient was asymptomatic for angina and, during two years treatment obtained a satisfactory lipid profile control by adding evolocumab to high-intensity statin therapy (LDL-C from 320 to 75 mg/dl). At baseline, besides normal wall motion, CFR was slightly reduced, sign compatible with coronary microvascular disease. After 2 years the DSE revealed inverted coronary flow on LAD (compatible with vessel occlusion or sub-occlusion) and a severe CFR reduction in absence of wall motion alterations. At coronary angiography chronic LAD occlusion in presence of valid (Rentrop 3) intracoronary collateral flow was confirmed and treated with percutaneous coronary revascularization (PTCA/stenting). Seriate carotid artery Doppler examination revealed stable intimal medial thickness <1 mm in presence of <30% stenosis at the carotid bulb bilaterally.

Conclusion. DSE with measure of flow velocity in HoFH patients, even with negative wall motion, is a valid tool to evaluate the inducible ischemia and to assess microvascular function so avoiding radiation and nuclear exposure.

EFFECTS OF NEXT-GENERATION TOBACCO AND NICOTINE PRODUCTS ON PHENOTYPIC MODULATION AND INFLAMMATORY RESPONSE OF AORTIC VASCULAR SMOOTH MUSCLE CELLS

I. Damiani, S. Castiglioni, P. Brambilla, M. Molaschi, A. Corsini, S. Bellosta

*Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari,
 Università degli Studi di Milano*
 E-mail: isabella.damiani@unimi.it

Background and Aims. Hypercholesterolemia and cigarette smoke (CS) are the main risk factors for cardiovascular disease. Whole CS is made up of over 7000 chemical components distributed between two phases: particulate and gas. Alternative next-generation tobacco products (such as E-cigarettes (E-cig) and tobacco heating products (THP)) are being developed as less toxic cigarettes. Cholesterol-loading of smooth muscle cells (SMCs) causes a phenotypic switch (less-differentiated cells that lack SMC markers but have an increased inflammatory profile), by downregulating the myocardin axis in a Kruppel-like factor 4 (Klf4)-dependent manner. To characterize the role of CS on SMC behavior, we studied the effects of CSC (lipophilic components of particulate) and AEs (CS aqueous extract containing water-soluble components present in both phases), obtained from a conventional cigarette, E-cig, and THP, on SMC phenotypic modulation and inflammatory pathways.

Methods. Human aortic SMCs (HSMCs) were incubated for 48 hours with both CSC and AEs and gene/protein expression analyzed by real-time PCR, western blot analysis, and confocal microscopy.

Results. CSC incubation promoted SMC phenotypic switch (reduced α -actin and calponin and increased Mac-2 and CD68 expression). On the contrary, all the AEs showed an opposite effect by inducing the expression of contractile genes (α -actin, calponin, and SM22). Unlike CSC, AEs treatment increased the expression of myocardin and reduced KLF4 expression, both at gene and protein levels. Interestingly, the expression of pro-inflammatory markers such as IL-1 β , IL-8, and IL-6 were increased by AE from the conventional cigarette (2-fold) and halved by the E-cig and THP AEs. Similar effects were observed on matrix metalloproteinases expression.

Conclusions. Our data suggest that, differently from CSC and cholesterol, AEs promote a contractile state in HSMC. Interestingly, the expression of pro-inflammatory markers is upregulated by the AE of a conventional cigarette and reduced by the E-cigarette and THP AEs. Based on these results, next-generation tobacco products have a different effect on HSMC behavior. New studies are needed to ascertain if this will lead to a reduced toxicity.

SANGER SEQUENCING DATA VS HIGH QUALITY NGS DATA: A COMPARISON OF RELIABILITY

R. De Cario¹, A. Kura¹, S. Suraci¹, A. Magi², A. Volta¹, A.M. Gori¹, R. Marcucci¹, G. Pepe³, B. Giusti¹, E. Sticchi¹

¹Department of Experimental and Clinical Medicine, Section of Critical Medical Care and Medical Specialities, University of Florence; ²Department of Information Engineering, University of Florence; ³Marfan Syndrome and Related Disorders Regional (Tuscany) Referral Center, Careggi Hospital, Florence

E-mail: decariorosy@hotmail.it

Background. Next-generation sequencing(NGS) has a crucial role in genetic diagnosis of polygenic diseases (familial hypercholesterolemia and other cardiovascular disorders with atherosclerosis as dominant cause). Their wide application led to Guidelines for Diagnostic NGS by the European Society of Human Genetics. Potential false-positive/-negative NGS data and paucity of internationally accepted guidelines providing quality metrics for diagnostics, made Sanger validation (costly, time consuming, error-susceptible) mandatory. We reported the analysis of 3 cases of discrepancy between NGS and Sanger validation in 218 patients admitted to the Advanced Molecular Genetics Laboratory, University of Florence.

Methods. NGS was performed by Illumina MiSeq and Haloplex/SureSelect protocols targeting 97 connectivopathies and 55 familial hypercholesterolemia genes. Variants called following Broad Institute guidelines and identified according to MAF<0.01 and allele balance >0.2 were Sanger validated.

Results. 3 out of 945 variants showed a discrepancy between NGS and Sanger: n=2 in LTBP2, n=1 in TGFB1. The first LTBP2 was Sanger validated with new primers as the previous were designed in a DNA sequence carrying polymorphisms, confirming the NGS datum. Concerning the other LTBP2 variant, the second primers pair in a region not interested by the presence of polymorphisms, didn't solve the discrepancy. Only the choice of a third further primer combination confirmed the NGS call. Regarding TGFB1, the discrepancy was solved by PCR followed by restriction fragment length polymorphism approach (Alul enzyme), demonstrating the problem was Sanger exclusively.

Conclusions. Our data suggest the urgent need to reconsider Sanger validation of NGS as mandatory in genetic diagnostics. High quality NGS data could not benefit from Sanger validation for its susceptibility to failures. Sanger's criticisms reduce its utility determining higher costs, delayed analysis conclusion, potential misdiagnosis. Our data indicate the necessity to determine standardized quality thresholds for different platforms and aims as object of International Consensus and Guidelines for clinical genetic testing limiting Sanger confirmation to variants with quality parameters under optimal cutoffs.

RISCHIO CARDIOVASCOLARE NEL SOGGETTO ANZIANO ULTRASESSANTENNE CON CARENZA DI GLUCOSIO-6-FOSFATO DEIDROGENASI

A. Errigo, C. Marche, G. Pes, M.P. Dore

Università di Sassari

E-mail: alessandra.errig@tiscali.it

Obiettivo. Studi recenti sembrano suggerire che la carenza dell'enzima glucosio-6-fosfato deidrogenasi (G6PD), condizione ereditaria legata al sesso che può causare crisi emolitiche in seguito all'ingestione di certi farmaci o vegetali, costituisce un fattore di rischio cardiovascolare. Per testare tale associazione è stato effettuato uno studio retrospettivo caso-controllo esaminando le cartelle cliniche di pazienti con attività G6PD nota.

Pazienti e Metodi. Sono stati reclutati 9.604 pazienti sottoposti ad esofagogastro-duodenoscopia tra il 2002 e il 2017 nell'Istituto di Clinica Medica di Sassari. È stata determinata l'attività G6PD nel sangue ed è stata raccolta un'anamnesi clinica completa, che includeva anche la presenza di eventuali episodi di cardiopatia ischemica nonché i principali fattori di rischio cardiovascolare, tra cui l'infezione da Helicobacter pylori.

Risultati. L'analisi multivariata ha confermato un aumento del rischio cardiovascolare nei pazienti con carenza di G6PD (OR: 3,24; intervallo di confidenza al 95% 2,44-4,30) dopo correzione per potenziali fattori confondenti e modificatori di effetto, inclusa l'infezione da Helicobacter pylori. Prima dei 60 anni il rischio cardiovascolare è risultato simile nei soggetti con e senza deficit di G6PD (OR, 1,26; IC 95% 0,78-2,04, P<0,562), mentre risultava aumentato dopo i 60 anni nel primo gruppo (OR, 3,05; 95% CI 2,22-4,19, P<0,0001) soprattutto nel sesso maschile (OR 3,67; 95% CI 2,19-6,14) rispetto a quello femminile (OR, 2,96; 95% CI 1,89-4,64) mediante analisi di regressione logistica specifica per sesso.

Conclusione. Il rischio di episodi cardiovascolari era significativamente superiore nei pazienti con carenza di G6PD dopo i 60 anni, sia nei maschi che nelle femmine, rispetto a quelli con attività enzimatica normale, dopo correzione per fattori di rischio CVD convenzionali e infezione da Helicobacter pylori. La disfunzione di importanti meccanismi protettivi contro lo stress ossidativo nei pazienti anziani potrebbe spiegare i risultati ottenuti nello studio.

RS629301 CELSR2 POLYMORPHISM CONFERS A TEN YEARS EQUIVALENT RISK OF CRITICAL STENOSIS ASSESSED BY CORONARY ANGIOGRAPHY

F. Fayer¹, G.I. Altieri¹, R. Spina¹, N. Martinelli², A. Giannanco¹, C.M. Barbagallo¹, M. Caruso¹, S. Novo¹, F. Sarullo³, V. Pernice⁴, C. Scrimali¹, V. Ingrassia¹, F. Brucato¹, D. Girelli², D. Noto¹, M. Averna¹

¹Università degli Studi di Palermo; ²Università degli Studi di Verona; ³Ospedale "Bucceri La Ferla" Palermo;

⁴Ospedale "Villa Maria Eleonora" Palermo

E-mail: notoddd@gmail.com

Background and Aims. Novel genetic determinants associated with coronary artery disease (CAD) have been discovered by genome wide association studies. Variants encompassing the CELSR2, PSRC1 and SORT1 genes have been associated with CAD. This study is aimed to investigate the rs629301 polymorphism association with the extent of CAD evaluated by coronary angiography (CAG), and to evaluate its effects on an extensive panel of lipid and lipoprotein measurements in a large Italian cohort of 2429 patients.

Methods and Results. The patients were collected by four Intensive Care Units located in Palermo and Verona. Clinical Records were filed, blood samples were collected, lipids and apolipoproteins (apo) were measured in separate laboratories. CAD was defined by the presence of stenotic arteries (>50% lumen diameter) by CAG. The presence of CAD was associated with the rs629301 genotype. Patients with CAD were 78% and 73% ($p=0.007$) of the T/T vs. T/G+G/G genotype carriers respectively. T/T genotype was also correlated with the number of stenotic arteries, with a 1.29 (1.04-1.61) risk to have a three-arteries disease. T/T genotype correlated with higher levels of LDL, non-HDL cholesterol, apoB, apoE and apoCIII, and lower HDL-cholesterol. Logistic Regression confirmed that rs629301 was associated with CAD independently from the common risk factors, with a risk similar to that conferred by ten years of age [odds ratios were 1.43 (1.04-1.96) and 1.39 (1.22-1.58) respectively].

Conclusions. rs629301 risk allele was independently associated with the extension and severity of CAD and positively with apoE and apoB containing lipoproteins.

BERGAMOT CITRUS AND CYNARA CARDUNCULUS IMPROVES ENDOTHELIAL FUNCTION IN NON-DIABETIC INDIVIDUALS WITH LIVER STEATOSIS

Y. Ferro, E. Mazza, R. Pujia, S. Paone, M. Gliozi, S. Nucera, V. Musolino, V. Mollace, A. Pujia, T. Montalcini
University Magna Grecia, Catanzaro

Background. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is the most common chronic liver disease in the world. Evidences suggest that NAFLD is associated with endothelial dysfunction and increases the risk of cardiovascular events. Endothelial dysfunction marks an early stage of atherosclerosis and is an important prognostic marker for cardiovascular disease (CVD). Reactive hyperemia peripheral arterial tonometry (RH-PAT) is a non-invasive, quantitative method useful to measure endothelial dysfunction. This method offers a digital measurement of hyperemic response (reactive hyperemia index, RHI). RHI score is inversely correlated with CVD. In a recent randomized clinical trial, we found that bergamot polyphenolic fraction (BPF) in combination with Cynara cardunculus (CyC) is able to reduce hepatic fat content in non-diabetic patients with NAFLD. The purpose of this study was to evaluate the effect of this nutraceutical on endothelial function in individuals with NAFLD.

Materials and Methods. We examined the data from 32 non-diabetic patients with NAFLD and endothelial dysfunction (RHI score ≤ 1.67) enrolled in a clinical trial (ID ISRCTN12833814) carried out at the University of Catanzaro from February to June 2019. Sixteen individuals received one capsules daily of a nutraceutical containing 150 mg of BPF, 150 mg of CyC and 300 mg of albedo fibers micronized for 12 weeks. The intervention group was matched for age, gender and body weight to 16 individuals that received one capsule daily of placebo (600 mg maltodextrin). RHI score, by EndoPAT 2000 technique, liver fat content, by transient elastography, serum transaminases, lipids, glucose and insulin were measured at the baseline and the end of the study.

Results. A total of 69% were male. The mean age was 52 ± 9 years, mean BMI was 29.3 ± 3 kg/m² and RHI score was 1.15 ± 0.4 . The overall frequency of dyslipidemia was 44% and hypertension was 34%. After 12 weeks, we found a greater RHI score increase in the participants taking the nutraceutical rather than placebo (0.58 ± 0.5 vs 0.13 ± 0.5 ; $p=0.02$; +95% vs +30%). In intervention group, we also found a greater reduction in liver fat content than placebo group (69% vs 31%, $p=0.03$). There were no significant differences in the change of body weight, blood pressure, glucose, insulin, lipids and serum transaminases values between two groups after 12 weeks. A relationship between the liver steatosis reduction and improvement of endothelial function was not found.

Conclusions. Current data show that a nutraceutical containing BPF and CyC, in addition to reducing hepatic fat content, improves endothelial function in non-diabetic subjects with NAFLD and, thus, could become an effective strategy for the prevention of CVD risk in subjects with liver steatosis.

EVOLOCUMAB IMPROVES VASCULAR OXIDATIVE STRESS AND ARTERIAL STIFFNESS OF HYPERCHOLESTEROLEMIC SUBJECTS WITH HIGH CARDIOVASCULAR RISK

F. Fogacci¹, C. Caliceti², A. Punzo³, D. Calabria³, M. Guardigli³, A.F.G. Cicero¹

¹Department of Medical and Surgical Sciences, DIMEC, University of Bologna; ²Department of Biomedical and Neuromotor Sciences, DIBINEM, University of Bologna; ³Department of Chemistry "Giacomo Ciamician", University of Bologna
E-mail: federicafogacci@gmail.com

Background and Aim. Cardiovascular diseases (CVD) are the main causes of death worldwide with several conditions being affected by oxidative stress. Atherosclerosis and other correlated disorders such as coronary heart disease are characterized by high serum levels of low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) that can promote the generation of reactive oxygen species (ROS). To answer the need of a better LDL-C control in subjects at high and very high risk for CVD, new injectable lipid-lowering drugs with the innovative protein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) inhibition as mechanisms of action have been developed. However, the effect of these drugs on vascular function, such as ROS generation and arterial stiffness, has not been extensively described yet.

Methods. In this study, we enrolled 15 male subjects at high or very high risk for cardiovascular disease. Patients were evaluated at baseline and after two months of treatment with 140 mg Evolocumab every 2 weeks.

Results. Enrolled patients experienced, after 2-month treatment with Evolocumab, an improvement in blood pressure-adjusted carotid-femoral pulse wave velocity (cfPWV) (P-value =0.044), which was significantly associated with a decrease of H₂O₂ production in freshly isolated leukocytes (PBMCS) (P-value=0.007).

Conclusions. Our data support the view of systemic oxidative stress involvement in hypercholesterolemic subjects and give further rationale for using Evolocumab independently of its lipid-lowering effect.

SAFETY EVALUATION OF α -LIPOIC ACID SUPPLEMENTATION VERSUS PLACEBO: A SYSTEMATIC REVIEW AND META-ANALYSIS

F. Fogacci¹, M. Rizzo², T. Knežević³, E.F.E. Wenstedt⁴, C. Georges⁵, E. Liberopoulos⁶, P. Perez⁷, M. Vrablik⁸, C. Krogager⁹, A. Vallée¹⁰, A. Šatrauskienė¹¹, C. Kennedy¹², A.F.G. Cicero¹

¹Hypertension and Cardiovascular Risk Factors Research Group, Medical and Surgical Sciences Department, Sant'Orsola-Malpighi University Hospital, Bologna; ²Department of Health Promotion Sciences Maternal and Infantile Care, Internal Medicine and Medical Specialities (PROMISE), School of Medicine, University of Palermo; ³Department of Nephrology, Hypertension, Dialysis and Transplantation, Zagreb University Hospital, Zagreb, Croatia; ⁴Amsterdam UMC, University of Amsterdam, Netherlands; ⁵Institut de Recherche Expérimentale et Clinique, Université Catholique de Louvain, UCLouvain, Louvain-la-Neuve, Belgium; ⁶Faculty of Medicine, School of Health Sciences, University of Ioannina, Ioannina, Greece; ⁷Lipids and Atherosclerosis Unit, Department of Medicine, IMIBIC/Hospital Universitario Reina Sofía/Universidad de Córdoba, Córdoba, Spain; CIBER Fisiopatología Obesidad y Nutrición (CIBEROBN), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain; ⁸Third Department of Internal Medicine, Department of Endocrinology, Metabolism, First Medical Faculty, Charles University, General Faculty Hospital, Prague, Czech Republic; ⁹Medicinsk Endokrinologisk Afdeling, Aarhus Universitetshospital, Nørrebrogade 44, 8000 Aarhus C, Denmark; ¹⁰Diagnosis and Therapeutic Center, Hôtel-Dieu, Paris, France; ¹¹Vilnius University Hospital Santariskė, Klinikos, Vilnius, Lithuania; ¹²Trinity College Dublin, Irland
E-mail: federicafogacci@gmail.com

Alipoic acid (ALA) is a natural short-chain fatty acid that attracted great attention in the last years as antioxidant molecule. However, some concerns have been recently raised regarding its safety profile. To address the issue, we aimed to assess ALA safety profile through a systematic review of the literature and a meta-analysis of the available randomized placebo-controlled clinical studies. Literature search included PubMed, Medline, SCOPUS, Google Scholar and ISI Web of Science by Clarivate databases up to August 15th 2020. Data were pooled from 70 clinical studies, comprising 153 treatment arms, which included 4679 subjects, with 2523 treated with ALA and 2259 subjects assigned to placebo. Meta-analysis of extracted data suggested that supplementation with ALA was not associated with an increased risk of developing adverse events (AEs), including hypoglycaemic episodes, gastrointestinal AEs (e.g. heartburn, gastric complaints, nausea, gastrointestinal complications, duodenitis and abdominal bloating), neurological AEs (e.g. headache, foggy thinking, drowsiness, leg weakness, legs periodic numbness and tingling, tingling in toe and fingers and intermittent bilateral toe numbness), psychiatric disorders (e.g. bipolar disorders), musculoskeletal AEs (e.g. neck pain, lower back pain and spasms), skin AEs (e.g. skin rash, disseminated maculopapular rash, itching sensation and urticaria), infections (e.g. laryngitis, pneumonia and yeast infections), cardiovascular system AEs (e.g. increase in arterial blood pressure, palpitations, myocardial infarction, heart rate and rhythm disorders and heart valve disorders), hospitalization and death.

EVALUATION OF ENDOCAN LEVELS IN CLINICAL SUBSETS CHARACTERIZED BY CHRONIC INFLAMMATORY STATUS: A POSSIBLE LINK TO HIGH CARDIOVASCULAR RISK

M.S. Franzè¹, F. Savarino¹, M.E. Scuruchi², D. Sincropi¹, M. Cinquegrani¹, G. Squadrato¹, A. Saitta¹, G. Mandraffino¹
¹University of Messina, Lipid Center, Unit of Internal Medicine;
²University of Messina, Molecular and Biochemical Lab
E-mail: stella91f@libero.it

Background and Aim. Endocan is a proteoglycan secreted by several cell type, including endothelial cells, involved in the onset and progression of atherosclerosis. Recent researches suggest a role of Endocan in inflammation and neovascularization; thus, it has been proposed as a marker of vascular stress. It was found elevated in multiple conditions, including sepsis, oncology, autoimmune or infectious diseases. In the light of these findings, we aimed to assess Endocan levels in other clinical settings: Familial Hypercholesterolemia (FH), Systemic Sclerosis (SSc), IBD.

Materials and Methods. We tested adult patients affected by FH (30), IBD (28) or SCL (37). All patients and healthy controls (18) underwent blood sampling on which we tested an Elisa immunoassay to assess circulating Endocan levels. FH and IBD patients underwent bloody sampling and the Elisa assay both when on conventional treatment either after the therapy with biologics (i-PCSK9 or anti-TNF α Ab, respectively).

Results. Highest levels of Endocan were detected in patients affected by SSc (2.1 fold, p<0.001 vs controls) vs controls). IBD patients refractory to conventional therapy showed higher Endocan levels when compared with control group (1.66 fold, p=0.02 vs controls), however the same patients showed a reduction of Endocan levels after the induction treatment with Biologics (1.18 fold, p=0.50 vs controls). FH population on conventional therapy (statin plus Ezetimibe) showed Endocan levels lower than healthy controls (0.7 fold, p<0.001). i-PCSK9 therapy seemed to slightly but not significantly reduce Endocan plasma levels (0.55 fold, p=0.32).

Conclusions. High circulating levels of Endocan were detected in high cardiovascular risk conditions as FH, IBD, SSc. Our data on FH seem to show that statin treatment could improve endothelial function even better if taken in association with i-PCSK9. Poor controlled IBD correlates with higher Endocan levels, while optimizing therapy could reduce Endocan plasma levels.

ASSOCIATION BETWEEN ADIPOSITY-RELATED TRAITS AND CORONARY ARTERY DISEASE: A MENDELIAN RANDOMIZATION ANALYSIS

F. Galimberti¹, E. Olmastroni¹, A.L. Catapano², B.A. Ference³
¹Epidemiology and Preventive Pharmacology Service (SEFAP), Department of Pharmacological and Biomolecular Sciences, University of Milan, MRC/BHF Cardiovascular Epidemiology Unit, Department of Public Health and Primary Care, University of Cambridge, Cambridge, United Kingdom; ²Epidemiology and Preventive Pharmacology Service (SEFAP), Department of Pharmacological and Biomolecular Sciences, University of Milan, Milan, Italy; IRCCS MultiMedica, Sesto S. Giovanni, Milano; ³MRC/BHF Cardiovascular Epidemiology Unit, Department of Public Health and Primary Care, University of Cambridge, Cambridge, United Kingdom
E-mail: federica.galimberti@unimi.it

The causal role of adiposity in coronary artery disease (CAD) is still unclear. Therefore, we applied a Mendelian randomization (MR) approach to estimate the effect of body mass index (BMI), as a measure of adiposity, on CAD. As instrumental variables we used a polygenic score made by 97 single-nucleotide polymorphisms (SNPs) associated with BMI. The study included individual participant data from subjects enrolled in the UK Biobank study (N=459,322), and summary-level data from participants enrolled in observational cohorts included in the CARDIoGRAMplusC4D Consortium. We explored causal associations with a two-sample MR method. The 97-point estimates derived from the individual participant data (beta-coefficients for the SNP-BMI association, with variants aligned to higher BMI) and the summary data (beta-coefficients for the SNP-outcome association) were then combined across studies in a fixed-effect inverse variance-weighted meta-analysis to produce an overall summary point estimate. We also assessed what proportion of the association between BMI and CAD was mediated by systolic blood pressure (SBP), lipids and glycated haemoglobin using a regression-based multivariable MR model. Genetic predisposition to higher BMI was significantly associated with CAD. The odds ratio (OR) per 1kg/m² increase in BMI was 1.10 (95% confidence interval (95%CI) 1.08-1.12), confirmed in a sensitivity analysis where beta-coefficients for the SNP-BMI association were adjusted for waist-to-hip ratio (OR 1.12, 95%CI 1.09-1.15). The effect of BMI on CAD was slightly attenuated in the multivariable MR analysis (OR 1.064, p-value <0.001), when the association was evaluated net of the effect of increasing adiposity on SBP, glycated haemoglobin, and lipids. These results suggest a causal association between lifetime exposure to high BMI and higher CAD risk. However, further analyses are necessary, to understand if losing weight will be useful to reduce cardiovascular risk in addition to the clinical benefit achieved by monitoring well-established cardiovascular risk factors.

HOW TO IMPLEMENT CLINICAL DIAGNOSIS OF FH IN CHILDREN AND ADOLESCENTS? PRELIMINARY EVIDENCE FROM THE LIPIGEN PAEDIATRIC GROUP

M. Gazzotti¹, E. Olmastro¹, C. Pederiva², M.E. Capra³, A.L. Catapano⁴, M. Casula⁴, on behalf of the LIPIGEN paediatric group*

¹Epidemiology and Preventive Pharmacology Service (SEFAP), Department of Pharmacological and Biomolecular Sciences, University of Milan; ²U.O. Clinica Pediatrica, Servizio Clinico Dislipidemie per Lo Studio e La Prevenzione Dell'Aterosclerosi in Età Pediatrica, Ospedale San Paolo, Milan; ³Centro Dislipidemie in Età Evolutiva U.O. Pediatria e Neonatologia, Ospedale G. da Saliceto, Piacenza; ⁴Epidemiology and Preventive Pharmacology Service (SEFAP), Department of Pharmacological and Biomolecular Sciences, University of Milan, IRCCS MultiMedica, Sesto S. Giovanni, Milan
E-mail: marta.gazzotti@unimi.it

Background. The early identification of familial hypercholesterolemia (FH) in childhood is made challenging by the lack of validated diagnostic criteria and by the usually less severe phenotype in first decades of life. We aimed to compare the Dutch Lipid Clinic Network (DLCN) criteria in genetically-confirmed FH adult and paediatric patients.

Methods. From the LIPIGEN study, an observational study collecting data about FH patients in Italy, we selected 1204 (≥ 18 years) and 798 (< 18 years) FH patients with a positive genetic test. DLCN parameters and proportion of missing data were compared between the two groups. Based on the percentile distribution of LDL-c classes among adults, we identified specific LDL-c cut-off for children/adolescents, and collected data about premature CHD also in second-degree family members.

Results. Among these genetically-confirmed FH patients, according to the original DLCN score, probable/definite FH (score ≥ 6) was found in 67.1% of adults, but only in 26.9% of children/adolescents. In this latter group, the percentage increased to 52.1% using the new LDL-c classes (142-162, 163-214, 215-261, ≥ 262 mg/dL). The lower prevalence of typical FH features in children/adolescents vs adults was confirmed: tendon xanthoma 2.9% vs 17.5%, arcus cornea lis 1.7% vs 17.5%, respectively. No children presented clinical history of premature CHD or cerebral/peripheral vascular disease (in adults 12.9% and 4.5%, respectively). Data about premature CHD in first-degree family members were missing for 4.7% of adults and 14.2% of children/adolescents. On valid data, this prevalence was 43.9% in adults and only 22.0% in children, increasing to more than half of subjects (51.8%) when considered also second-degree relatives (data available for 229 individuals < 18 years), but without relevant changes in the proportion of probable/definite FH.

Conclusion. In children the DLCN score is clearly less informative than in adults. A re-modulation and validation of new score for children/adolescents is necessary to improve the detection rate.

*Heads of centers of LIPIGEN paediatric group: F. Angelico (Roma), M. Arca (Roma), M. Averna (Palermo), G. Biasucci (Piacenza), C. Borghi (Bologna), P.S. Buonuomo (Roma), P. Calabro (Caserta), F. Carubbi (Modena), F. Cipollone (Chieti), N. Citroni (Trento), G. Fortunato (Napoli), O. Guardamagna (Torino), A. Ianuzzi (Napoli), L. Iughetti (Modena), G. Lupattelli (Perugia), G. Mandralfino (Messina), L. Maroni (Varese), G. Mombelli (Milano), S. Muntoni (Cagliari), C. Pederiva (Milano), F. Pellegratta (Sesto San Giovanni (MI)), L. Pisciotta (Genova), A. Pujia (Catanzaro), F. Purrello (Catania), P. Rubba (Napoli), C. Sabbà (Bari), R. Sarzani (Ancona), G.B. Vigna (Ferrara), J.P. Werba (Milano), S. Zambon (Padova), M.G. Zenti (Verona) LIPIGEN Steering Committee: M. Arca (Roma), M. Averna (Palermo), S. Bertolini (Genova), S. Calandra (Modena), A.L. Catapano (Milano), P. Tarugi (Modena) Centralized laboratory: V. Zampoleri (Cinisello Balsamo, (MI)

APPLYING TARGETED NEXT-GENERATION-SEQUENCING TO DRIED BLOOD SPOT SPECIMENS FOR UNIVERSAL MOLECULAR SCREENING OF FAMILIAL HYPERCHOLESTEROLEMIA IN PEDIATRIC PATIENTS

C. Giacobbe, D. Palma, M.D. Di Taranto, G. Maione, G. Caridero, G. Fortunato

Dipartimento di Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche, Università degli Studi di Napoli Federico II and CEINGE S.C.a r.l. Biotecnologie Avanzate, Napoli
E-mail: giacobbe@ceinge.unina.it

Introduction. Familial Hypercholesterolemia (FH) is the most common genetic dyslipidemia, with an estimated frequency of 1/200- 250 at heterozygous state, associated to premature cardiovascular disease. FH remains mainly underdiagnosed and undertreated globally. We evaluated the use of a dried blood spot (DBS) sample as a simple method to obtain a DNA sample from children to be used for next-generation-sequencing, to encourage the genetic diagnosis of FH since young age.

Materials and Methods. An NGS panel targeting the entire coding sequence of the six genes mainly involved in FH were used to analyze DNA extracted from venous blood (VB) and from DBS, from 46 patients with suspicious of FH. The sequencing was performed using Illumina MiSeq Reagent Micro Kit V2 and data analysis was performed by Amplicon Suite software. Identified pathogenic or uncertain significant single nucleotide variants (SNVs) were confirmed by Sanger Sequencing, while the pathogenic copy number variations (CNVs) were confirmed by MLPA analysis.

Results. A depth sequencing of 30X was considered as our minimum threshold; coverage of different amplicon highly fluctuated; an average read depth of 30X were obtained in 100% of the amplicons of genes in VB sample (80X-4838X), while in 3/46 DBS sample at least one amplicon was below 30X (3X-6046X). We also evaluated the concordance of variant calling between sequencing from VB DNA and DBS DNA, which was 100% for the SNVs. No concordance was observed for CNVs, which were not always identified in the DBS-samples.

Conclusions. Targeted NGS can be performed on DBS-samples to reliably detect SNVs which represent 80-90% of FH-causative variants. Identification of CNVs should be performed separately. This genetic screening could be used as a workflow useful also to set-up an universal screening for FH in children.

EFFECTIVENESS AND SAFETY OF LOMITAPIDE IN A PATIENT WITH FAMILIAL CHYLOMICRONEMIA SYNDROME

A. Giannamico, A.B. Cefalù, D. Noto, R. Spina, D. Cabibi, C.M. Barbagallo, M. Averna

Dipartimento di Promozione della Salute, Materno Infantile, Medicina Interna e Specialistica di Eccellenza "G. D'Alessandro" (PROMISE), Università degli Studi di Palermo
E-mail: agiamman@gmail.com

Background. Familial chylomicronemia syndrome (FCS) is characterized by severe fasting hypertriglyceridemia, abdominal pain and recurrent acute pancreatitis. Available triglyceride-lowering drugs are insufficient to avoid pancreatitis. Therefore, there is a significant unmet medical need for effective triglyceride-lowering drugs for patients with FCS.

Materials and Methods. We report the second case of a patient with FCS and recurrent pancreatitis treated with lomitapide. Results: Lomitapide treatment resulted in a reduction of fasting TG levels from 2897 mg/dl (32.71 mmol/l) to an average of 954 mg/dl (10.77 mmol/L) on the 30 mg lomitapide equating to a 67% reduction from baseline. After 26 months of lomitapide treatment, histological activity score for hepatic fibrosis was stable although liver biopsy showed a marked increase of liver steatosis and mild perivenular and perisinusoidal fibrosis.

Conclusion. Lomitapide is effective in reducing triglycerides in FCS and preventing the recurrence of acute pancreatitis. A longer follow-up is necessary to evaluate long term risk of progression towards severe stages of liver fibrosis. A prospective clinical trial may identify which subgroup of FCS patients would benefit from lomitapide treatment in the absence of significant liver adverse effects.

THE METABOLIC SYNDROME IN A MEDITERRANEAN POPULATION: RESULTS OF A 25-YEARS FOLLOW-UP OF THE "VENTIMIGLIA HEART STUDY"

A. Giannamico, A. Ganci, D. Noto, C. Scrimali, R. Spina, F. Brucato, G.I. Altieri, F. Fayer, V. Ingrassia, C.M. Barbagallo, A.B. Cefalù, M. Averna

Dipartimento di Promozione della Salute, Materno Infantile, Medicina Interna e Specialistica di Eccellenza "G. D'Alessandro" (PROMISE), Università degli Studi di Palermo
E-mail: agiamman@gmail.com

Introduction. Metabolic syndrome consists of a cluster of conditions that increase the risk of cardiovascular disease, diabetes and stroke. The "Ventimiglia Heart Study" is an epidemiological study started in 1989 in a rural Mediterranean community and is currently in progress to evaluate the cardiovascular (CV) risk factors and their role on prediction of CV events and mortality. The aim of this study was to evaluate the metabolic features changes of this community after 25-years follow-up.

Materials and Methods. Among the subjects enrolled in the "Ventimiglia Heart Study" project in the years 1989 and 2014, we selected, respectively, 841 subjects (M=378, F=463) and 589 subjects (M=257, F=332) between 25 and 75 years of age. Anthropometric measures, clinical and biochemical parameters, life style and CV outcomes were evaluated. The metabolic syndrome was defined according to the 2004 Adult Treatment Panel III (ATPIII)/NCEP criteria.

Results. Metabolic syndrome prevalence was not significantly changed in 25-years follow-up, although in 2014 it was increased in males (30.4% vs 16.9%, p<.0001) while in females it was slightly decreased (27.1% vs 32.4%, NS). A high prevalence of visceral obesity, already highlighted in 1989, was confirmed, with a marked worsening of metabolic parameters in males and a partial improvement in females. Compared to 1989, an improvement in blood pressure, triglyceridemia and glucose plasma levels was observed in 2014, probably due to the increased pharmacological interventions in the population.

Conclusions. The 25-years follow-up "Ventimiglia Heart Study" highlights the great importance of metabolic syndrome as a public health issue in a rural population and indicates that the metabolic parameters have profoundly changed due to the socio-economic and cultural modifications of this rural community.

STATINS THERAPY AND SARS-CoV-2 INFECTION: WHAT'S UP WITH THIS?

E. Giorgini¹, S. Greco¹, M. Lopreato¹, V. Fortunato¹, A. Scopa¹, G. Vestita¹, F. Luciani¹, A. Passaro²

¹Department of Medical Science, University of Ferrara;

²Department of Morphology, Surgery ed Experimental Medicine, University of Ferrara

E-mail: grgnrc@unife.it

Background. Some studies put their attention on the antimicrobial activity by statins, trying to understand if such drugs could effectively be valuable in COVID-19 therapy. The aim of this study is to understand whether a relation between statin therapy and SARS-CoV-2 infection exists and whether this therapy could be useful in COVID-19 management. Secondary goal was to deepen the relations of statin therapy with the main disease outcomes: the need for an intensification of care, inhospital mortality, 30-days mortality.

Patients and Methods. We enrolled 502 patients, admitted to our Internal Medicine Department from the 15th of March to the 15th of June, 2020. All patients got a laboratory diagnosis of SARS-CoV-2 infection. Clinical, demographic and laboratory data were collected from the informatics' system of our Hospital. Anamnestic informations were collected from patients and/or from their relatives. Of these 502 patients, 60 had a clinical reason to a statin home therapy prescription. Following current guidelines we did not interrupt statin therapy while treating them for SARS-CoV-2 infection, according to their clinical needs. Statistical analysis were performed using SPSS software, v.26.0 with the execution of univariate and multivariate analysis.

Results. We searched for statistical relations between statin therapy and patients' need for an intensification of care, with the inhospital mortality rate and with 30-days mortality rate. At the time of writing we missed clinical data of 15 out of 60 patients: preliminary data did not show any significant relation between the chosen variables. We also tried to understand whether a co-administration of statins and the other administered therapies could improve patients' immune response to SARS-CoV-2 infection, finding no preliminary differences in the three disease outcomes chosen.

Conclusions. Compatibly with the missing data, we found no statistically significant relation between patients with a statin therapy and patients without.

ATHEROSCLEROSIS, PCSK9 AND EXTRACELLULAR VESICLES - EVIDENCE FROM IN VITRO MODELS

M.F. Greco¹, C. Macchi¹, L. Cantone², T. Sampietro³, C.R. Sirtori⁴, A. Corsini⁴, V. Bollati⁵, N. Ferri⁶, M. Ruscica⁴

¹Department of Pharmacological and Biomolecular Sciences, Università degli Studi di Milano; ²EPIGET Department of Clinical Sciences and Community Health, University of Milan; ³U.O. Lipoapheresis and Center for Inherited Dyslipidemias, Fondazione Toscana Gabriele Monasterio, Pisa; ⁴Department of Pharmacological and Biomolecular Sciences, Università degli Studi di Milano; ⁵EPIGET Department of Clinical Sciences and Community Health, University of Milan; ⁶Department of Pharmaceutical and Pharmacological Sciences, Università degli Studi di Padova

E-mail: mariafrancesca.greco@unimi.it

Background. The function of extracellular vesicles (EVs) is being investigated in the context of several pathological conditions, including cardiovascular disease (CVD). EVs have been proposed to contribute to the pathogenesis of atherosclerotic cardiovascular diseases (ASCVD) by promoting inflammation and thrombosis via different mechanisms. Endothelial injury, a key step in the development of atherosclerotic lesions, triggers the release of EVs that may play a role in regulating endothelial dysfunction and vascular wall inflammation by increasing the expression of surface adhesion molecules (VCAM-1, ICAM-1), promoting smooth muscle cells differentiation and determining the release of pro-inflammatory cytokines (Deng 2019). In line with these findings, circulating levels of EVs associate with the occurrence of major adverse events and are raised in patients with CV risk factors, such as hypercholesterolemia, hypertension or metabolic syndrome (Jansen 2017). EVs are extracellular structures enclosed by a lipid bilayer and are secreted by all known cell types. EVs carry proteins, RNAs and/or microRNAs among other molecules and act as vehicles in cell-to-cell communication. AIM: To unravel the impact of EVs derived from human smooth muscle cells (hSMC) overexpressing or not PCSK9 on inflammation, migratory capacity and mitochondrial activity of human monocytes THP-1, human derived-THP-1 macrophages and hSMC.

Methods

- cell lines: hSMC overexpressing or not PCSK9, human THP-1 monocytes and human THP-1 derived macrophages;
- EVs isolation (by ultracentrifugation) and characterization (by nanoparticle tracking analysis);
- gene and protein expression (qPCR and Western blot);
- cell migration (by using a Transwell chamber with polycarbonate membrane).

Overall, cells have been treated for 24 hours with EVs.

Results. Compared to EVs derived from hSMC, over expression of PCSK9 led to a reduction in concentrations (17.1×10^9 EVs/ml vs 6.2×10^9 EVs/ml, respectively). Conversely, no size differences were detected (202 nm vs 210 nm, respectively). In THP-1 monocytes and THP-1 derived macrophages, 24-h exposure to EVs derived from hSMC overexpressing PCSK9 activated the gene expression of MCP-1/chemokine (C-C motif) ligand 2 (+27 fold), interleukin (IL)-1 α (+28 fold), IL1beta (+25 fold), IL-6 (+94 fold), and IL-8 (+4 fold). In accordance to changes in mRNA levels, in all cell models, protein expression of inflammatory pathways of signal transducer and activator of transcript 3 (STAT3) and suppressor of cytokine signaling (SOCS3) were also raised upon exposure to EVs isolated from hSMC overexpressing PCSK9. Conversely, no differences have been found when the inflamasome (NLRP3)

cascade was evaluated. EVs isolated from hSMC overexpressing PCSK9 negatively affected monocyte migration. Out of 400,000 THP-1 cells per well seeded, 2.83% migrated when exposed to EVs isolated from hSMC and 0.21% when exposed to EVs isolated from hSMC overexpressing PCSK9. The mitochondrial OXPHOS protein expression (complex -I, -II, -III, -IV and -V) was not altered in any of the cell lines evaluated.

Conclusions. In the context of atheroma formation, these findings are in line with our previous evidence reporting a feed-forward inflammatory loop exerted by PCSK9.(Ruscica 2016, Ricci 2018, Macchi 2020).

References

1. Deng W, et al. Clinica Chimica Acta. 2019; 495: 109-117.
2. Jansen F, et al. Circ Res. 2017;120: 1649-1657.
3. Ruscica M, et al. J Biol Chem. 2016; 291: 3508-3519.
4. Ricci C, et al. Sci Rep. 2018; 8: 2267.
5. Macchi C, et al. Am J Pathol. 2020; S0002-9440(20)30375-8.

MANAGEMENT OF HOMOZYGOUS FAMILIAL HYPERCHOLESTEROLEMIA: GENOTYPING AS DRIVER OF APPROPRIATE THERAPEUTIC APPROACH

M. Gueli Alletti, C. Scrimali, R. Spina, V. Ingrassia, G.I. Altieri, D. Noto, F. Brucato, G. Misiano, A. Giannamico, F. Fayer, C.M. Barbagallo, A. Ganci, A.B. Cefalù, M.R. Averna
Department of Health Promotion, Mother and Child Care, Internal Medicine and Medical Specialties (PROMISE), University of Palermo
E-mail: mariagrazia.guelialletti@gmail.com

Introduction. Homozygous Familial Hypercholesterolemia (HoFH) is a rare genetic disorder characterized by very high levels of LDL-C and premature atherosclerotic cardiovascular disease (ASCVD). HoFH due to LDLR gene mutations are classified into two groups based on the residual functional activity of LDL-R: patients < 5% of normal LDLR activity are classified as receptor negative and patients with 5 to 25% of normal LDLR activity as receptor-defective. We describe the clinical and molecular characterization of a subject with severe hypercholesterolemia.

Materials and Methods. The proband is a 52-year-old man. Severe hypercholesterolemia (about 400 mg/dL) was first noted when he was 23 and treatment with simvastatin was prescribed. He suffered an episode of acute coronary syndrome at 38 years of age and he underwent to PTCA procedure. The coronary angiography revealed a diffuse non stenotic atherosclerosis of the coronary tree beside the treated culprit lesion. Treatment with high efficacy statin at the maximum tolerated dose (rosuvastatin 20 mg/d) in association to ezetimibe did not allow to reach the suggested LDL-C goal (LDL-C 150 mg/dl). Genetic analysis was performed by Next Generation Sequencing (NGS) using Ion Torrent PGM in order to analyze candidate genes involved in FH.

Results. We identified an homozygous LDLR gene mutation (c.2359G/A; p.Val797Met) previously described and classified as receptor-defective. We decide to start PCSK9 monoclonal antibody therapy. Administration of evolocumab 420 mg monthly, on top of standard care, effectively reduced LDL-c levels (from 150 mg/dL to 22 mg/dL). Residual LDLR expression in HoFH is a major determinant of LDL-C levels and it drives the individual response to anti PCSK9 MAbs evolocumab.

BIOHUMORAL MARKERS OF ACUTE ISCHEMIC STROKE: THE RISK STUDY

A. Kura¹, A. Sodero², E. Sticchi¹, A. Magi³, S. Suraci¹, R. De Cario¹, A. Consoli⁴, A. Rosi⁴, S. Nappini⁴, L. Renieri⁴, N. Limbucci⁴, B. Piccardi², F. Arba², C. Sarti², D. Inzitari², S. Mangiafico⁴, R. Marcucci⁵, B. Giusti¹, A.M. Gori¹

¹Department of Experimental and Clinical Medicine, University of Florence; ²Stroke Unit, Careggi Hospital, Florence;

³Department of Information Engineering, University of Florence;

⁴Interventional Neuroradiology Unit, Careggi Hospital, Florence;

⁵Atherothrombotic Diseases Center, Careggi Hospital, Florence

E-mail: ada-kura@hotmail.it

Background. Ischemic stroke is a heterogeneous disorder and a biomarker panel may be able to better reflect the diverse pathophysiology involved in stroke. Literature data suggested the important role of MMP: in particular, MMP9 correlates with Hemorrhagic Transformation and Death, as well as some inflammatory molecules are associated with three-month functional outcome. The reperfusion therapies for acute ischaemic stroke are represented by the rapid restoration of cerebral blood supply by intravenous thrombolysis (IVT) with recombinant tissue plasminogen activator (rt-PA) and by mechanical thrombectomy. This study has been conducted in a consecutive series of patients with AIS candidates to IVT and/or to endovascular treatment with the purposes of: 1) to evaluate the role of circulating biomarkers, namely metalloproteinase, interleukins, adhesion molecules and growth factor in relation to clinical outcomes.

Methods. We investigated 110 AIS patients treated with systemic or endovascular t-PA thrombolysis, enrolled between October 2015 and October 2018. A blood withdrawal for assessment of MMPs, was also performed at baseline and at 24 hours. Circulating biomarkers were determined in serum by using a multiplex assays.

Results. In this large series of patients we found that:

- 1) pre-tPA EMMPRIN and MMP-2 circulating levels were associated with death;
- 2) pre-tPA VCAM-1 and CXCL-10 circulating levels were associated with worse clinical outcome (mRS>2);
- 3) ICH occurred more frequently in patients with high levels of pre-tPA, IL-6 and CXCL-8;
- 4) the occurrence of edema at 24 hours after thrombolysis was slightly associated with low EMMPRIN and VCAM-1 pre-tPA levels, whereas pre-/post-tPA-variations of MMP-3, VCAM-1 and EMMPRIN were positively and significantly associated with edema at 24 hours.

Conclusions. Our results obtained in ischaemic stroke patients provided interesting insights into the mechanisms underlying the ischaemic stroke and the response to thrombolysis and discover new biohumoral markers.

TALMUD POLYGENIC SCORE: CONTRIBUTION OF COMMON GENETIC VARIANTS IN THE MOLECULAR CHARACTERIZATION OF FAMILIAL HYPERCHOLESTEROLEMIA

A. Kura¹, E. Sticchi¹, A. Volta¹, R. De Cario¹, A. Murri¹, A. Rogolino², B. Bandinelli², A. Magi³, S. Suraci¹, A.M. Gori¹, R. Marcucci², B. Giusti¹

¹Department of Experimental and Clinical Medicine, University of Florence; ²Atherothrombotic Diseases Center, Careggi Hospital, Florence; ³Department of Information Engineering, University of Florence

E-mail: ada-kura@hotmail.it

Background. Familial Hypercholesterolemia (FH) represents an autosomal disorder due to pathogenic variants in LDLR or APOB or PCSK9 (dominant form), and in LDLRAP1 (recessive form). Previous data showed that in about 60% of patients who are mutation-negative the clinical phenotype can be associated with an accumulation of common small-effect LDL-C-raising alleles using a 12-Single nucleotide polymorphisms (SNPs) score. Aim of this study was to evaluate Talmud (2013) genetic score in patients with FH with and without variants in LDLR gene.

Method. We analysed 47 patients with clinically possible/probable or definite FH using the most common diagnostic algorithm, Dutch Lipid Clinic Network Score. SNPs included in Talmud score were detected through high-throughput (HTS) or Sanger sequencing. HTS was performed using Illumina MiSeq Reagent Kit. Sequencing results were analyzed using a pipeline optimized by the Florentine bioinformatics group. The possible pathogenicity of variants was evaluated using five different *in silico* tools. For statistical analysis we used SPSS v.25 software.

Results. Among 47 patients analyzed, 20 had a pathogenetic variant in LDLR and 27 did not carry mutations in this gene. Significantly higher Talmud score mean value in patients without LDLR mutation with respect to those with LDLR variant was observed [mean±SD: 1.031±0.146 vs 0.894±0.196, p=0.008]. Mean Talmud score value found in LDLR mutation negative group relates to a risk ratio (95% CI) of LDL-C>4.9 mmol/L 2.73 (1.93-3.17) (8th LDL-C gene score decile). Conversely, in patients carrying LDLR mutations mean score value relates to a risk ratio (95% CI) 2.21 (1.55-3.17) (5th LDL-C gene score decile). Accordingly, a higher percentage of patients within a LDL-C gene score decile ≥ 8th was present in the LDLR mutation negative group (48%) in comparison to that observed in the LDLR mutation positive group (30%). As concerns Dutch score, significantly higher values were observed in the LDLR positive group than in patients negative for LDLR pathogenetic variant [median (IQR): 7.0 (5.8-8.0) vs 5.0 (4.0-6.0), p=0.002].

Conclusion. The results suggest a possible contribution of common variants in modulating the lipid profile in FH patients. Further expansion of present data will allow to confirm the hypothesis that FH can also be caused by an accumulation of common small-effect LDL-C-raising alleles. At present, the relationship between Talmud score and both pharmacological response to statins treatment and cardiovascular events is also under evaluation.

TRANSCRIPTOMICS STUDY IN CEREBRAL THROMBI AND PERIPHERAL VENOUS BLOOD OF ACUTE ISCHEMIC STROKE PATIENTS

A. Kura¹, A. Sodero², E. Sticchi¹, A. Magi³, S. Suraci¹, R. De Cario¹, A. Consoli⁴, A. Rosi⁴, S. Nappini⁴, L. Renieri⁴, N. Limbucci⁴, B. Piccardi², F. Arba², C. Sarti², D. Inzitari², S. Mangiafico⁴, A.M. Gori¹, R. Marcucci⁵, B. Giusti¹

¹Department of Experimental and Clinical Medicine, University of Florence; ²Stroke Unit, Careggi Hospital, Florence; ³Department of Information Engineering, University of Florence; ⁴Interventional Neuroradiology Unit, Careggi Hospital, Florence; ⁵Atherothrombotic Diseases Center, Careggi Hospital, Florence
E-mail: ada-kura@hotmail.it

Background. Acute ischemic stroke (AIS) therapies consist of cerebral blood restoration by i.v. rt-PA thrombolysis and/or mechanical thrombectomy (MT). MT has created the opportunity to evaluate morphology and biomolecular characteristics of cerebral thrombi (CT). Few previous studies showed that thrombus composition can correlate with both AIS pathophysiology and outcomes.

Aims of the study were:

- 1) to investigate the global gene expression profile of CT and venous peripheral blood (PB) in order to identify markers of different pathophysiological mechanisms of AIS;
- 2) to investigate whether information obtained by studying gene expression profiles in CT are different from those of PB.

Methods. We performed gene expression profile of 52 AIS patients. CT obtained during MT were collected in RNA later. Blood samples were collected before and 24 hours after MT. RNA was extracted by PAX gene blood miRNA kit. The global gene expression was assessed by Affymetrix technology using GeneChip Human Transcriptome Array 2.0. Data analysis was performed in R environment with dedicated pipelines.

Results. After data processing, the average of analyzable probe sets numbered 440,085 in CT and 602,874 in PB samples. The Gene Ontology enrichment analysis in CT and PB indicating that peripheral and local mechanisms of damage and response to damage are present in CT and PB. In particular, in CT, we observed 221 significant biological processes associated with poor outcome according to mRS, and in PB, we observed 27 terms associated with 24 h edema. Among significant terms in CT, those associated with regulation of neutrophil mediated immunity and activation play a crucial role.

Conclusions. Our data provided interesting insights into the mechanisms underlying the AIS and the response to thrombolysis. Transcriptomics analysis according to stroke outcomes, confirmed and extended several known pathophysiological mechanisms and suggested novel pathways to be explored to enlarge knowledge on AIS.

INDEPENDENT PREDICTORS OF CHOLESTEROL REVERSE EFFLUX IN PATIENTS WITH HETEROZYGOUS FAMILIAL HYPERCHOLESTEROLEMIA

F. Luciani¹, J.M. Sanz¹, F. Zimmetti², G. Vigna³, E. Dalla Nora³, G. Lo Coco¹, S. Greco¹, G. Zuliani¹, A. Passaro¹

¹Department of Morphology, Surgery and Experimental Medicine, University of Ferrara; ²Department of Food and Drug Sciences, University of Parma; ³Department of Medicine, Azienda Ospedaliera Universitaria di Ferrara
E-mail: lcnfnc@unife.it

Introduction. Reverse cholesterol transport (RCT) is a process in which excess of cholesterol accumulated in peripheral tissues, is removed and transported by HDL to the liver and successively, excreted into the feces via the bile. Cholesterol efflux capacity (CEC) from peripheral cells is thought to be a critical metric of HDL functionality. The evaluation of serum cholesterol efflux capacity (CEC) may be a predictor of atherosclerosis extent and is considered to be better target for the prevention of CVD. Many studies showed that CEC could be inversely associated with incident CVD. Nevertheless, few studies have analyzed CEC in patients with familial hypercholesterolemia, the most common autosomal dominant genetic disease, caused by mutations in the genes associated to LDL clearance. Familial hypercholesterolemia (FH) is a genetic disease associated with a high cardiovascular risk, despite lipid-lowering therapy, compared to controls.

Scope. The aim of this study is to evaluate differences of CEC between FH patients and no-FH subjects and analyze its independent predictors.

Patients and Methods. A total of 183 patients (31-80 years old) were enrolled: 61 heterozygous FH patients and 122 no-FH (matched by gender, age and BMI). The three most important RCT pathways were measured by using specific cell models: total CEC, Basal-CEC and ATPbinding cassette A1 (ABCA1)-mediated CEC. Briefly, cells were labeled with [1,2-3H]-cholesterol and exposed to HDL, isolated from subjects serum by polyethylene glycol. Serum HDL CEC was expressed as a percentage of the radioactivity released to the medium in 4 h (6 h for ABCG1-CEC) after over the total radioactivity incorporated by cells. LDL and HDL subfraction serum were separated and quantified using the Lipoprint System in large-buoyant LDL (lbLDL) and small-dense LDL (sdLDL) and large, medium and small HDL, respectively. VLDL, LDL and HDL were isolated from serum by Ultracentrifugation.

Results. Results showed higher CEC levels in FH patients compared to controls. There were not significant differences of CEC between FH patients with and without CVD and ever lipid-lowering treatment did not provoke significant variations. CEC levels were not correlated with age; instead, it had a positive correlation with total cholesterol, HDL-cholesterol, triglycerides, VLDL-cholesterol, lbLDL-cholesterol sdLDL-cholesterol and LDL size. Linear regression analysis showed that independent predictors of CEC were to have the familial hypercholesterolemia, VLDL-cholesterol concentration, levels of medium HDL-cholesterol, HDL-cholesterol concentration and total cholesterol.

Conclusion. Higher incidence of CVD does not seem to be associated with lower CEC levels. Lipid-lowering therapy not influence CEC levels. Independent predictors of CEC levels are cholesterol levels included in different lipoproteins.

LIVER STEATOSIS AND FIBROSIS ARE ASSOCIATED WITH METABOLIC COMORBIDITIES BUT ARE NOT INDEPENDENTLY ASSOCIATED WITH ATHEROSCLEROTIC CARDIOVASCULAR DISEASE IN FAMILIAL HYPERCHOLESTEROLEMIA

S. Lugari, A. Pontara, A. Cavicchioli, G. Onfiani, P. Vita, E. Zardi, A. Mondelli, E. Pellegrini, P. Andreone, F. Carubbi, F. Nascimbeni
Internal and Metabolic Medicine, Civil Hospital, A.O.U. of Modena and University of Modena and Reggio Emilia
 E-mail: simonetta.lugari@libero.it

Introduction and Aims. Atherosclerotic cardiovascular disease (ASCVD) risk stratification in familial hypercholesterolemia (FH) is challenging due to high heterogeneity. Liver steatosis and fibrosis are associated with an increased ASCVD risk. We aim at determining the prevalence and the predictors of liver steatosis and fibrosis, and at evaluating whether they are associated with increased prevalence of ASCVD in adult FH patients.

Methods. 180 adult patients with a clinical (DLCN ≥ 6) and/or molecular diagnosis of FH consecutively enrolled within the LIPIGEN Project underwent comprehensive evaluation, including assessment of liver steatosis by abdominal ultrasound. In 154 patients the Fibrosis-4 (Fib-4) index was also measured (as a marker of liver fibrosis), and values higher than 1.30 were considered at risk of advanced liver fibrosis.

Results. Men and women were 92 and 88, respectively; median age was 48[18-83] years. Among 165 patients with available genetic test, 84.2% were carriers of a "pathogenic" or "likely pathogenic" mutation in FH-causing genes. Median body mass index (BMI) was 25.2[17.9-44.1] kg/m² and the prevalence of dysglycemia, high blood pressure and metabolic syndrome (MetS) was 22.2%, 47.8% and 17.9%, respectively. 17.2% of patients had a positive history of ASCVD. The prevalence of liver steatosis was 31.7% (n=57). Patients with liver steatosis were significantly more likely to have visceral adiposity ($p<.001$), dysglycemia ($p=.005$), high blood pressure ($p=.043$) and MetS ($p<.001$) than those without liver steatosis. They also showed significantly higher age ($p=.037$), BMI ($p<.001$), waist circumference ($p<.001$), systolic ($p=.033$) and diastolic ($p=.029$) blood pressure, triglycerides ($p<.001$), glucose ($p=.001$), HbA1c ($p<.001$), uric acid ($p<.001$), aspartate ($p=.007$) and alanine ($p=.001$) aminotransferases and gamma-glutamyltransferase ($p<.001$) levels and lower HDL cholesterol levels ($p=.012$) than their counterpart without liver steatosis. Median Fib-4 values were 1.04[0.25-3.28] and 52 patients (33.8%) were at risk of advanced liver fibrosis. Fib-4 was significantly and positively correlated with age ($\rho=.803$, $p<.001$), waist circumference ($\rho=.177$, $p=.031$), systolic ($\rho=.170$, $p=.037$) and diastolic ($\rho=.204$, $p=.012$) blood pressure, glucose ($\rho=.377$, $p<.001$), HbA1c ($\rho=.307$, $p<.001$), number of factors of the MetS ($\rho=.311$, $p<.001$), aspartate aminotransferase ($\rho=.327$, $p<.001$) and gamma-glutamyltransferase ($\rho=.171$, $p=.036$). Accordingly, patients at risk of advanced liver fibrosis were significantly more likely to have dysglycemia ($p=.001$), high blood pressure ($p=.002$) and MetS ($p=.046$) than patients not at risk. The prevalence of liver steatosis and the risk of advanced liver fibrosis both increased across the number of factors of the MetS (steatosis: 7.3% for 0 factors vs. 100% for 5 factors, $p<.001$; fibrosis: 12.5% for 0 factors vs. 50% for 5 factors, $p=.001$). Patients with liver steatosis (26.3% vs. 13.0%, $p=.028$) and those at risk of advanced liver fibrosis (38.5% vs. 10.8%, $p<.001$) were both significantly more likely to have a positive history of ASCVD than their counterpart. Moreover, Fib-4 was also significantly associated with carotid ar-

tery plaques ($p<.001$) and carotid intima-media thickness ($\rho=.486$, $p<.001$). At univariate logistic regression analysis, liver steatosis (OR:2.4, 95%CI:1.1-5.3; $p=.031$) and the risk of advanced liver fibrosis (OR:5.2, 95%CI:2.2-11.9; $p<.001$) were both significantly associated with ASCVD. However, after adjustments for sex, age, smoking status, untreated LDL-cholesterol and metabolic comorbidities, the significant associations between liver steatosis, liver fibrosis and ASCVD went lost.

Conclusions. Liver steatosis and liver fibrosis, mainly attributable to metabolic dysfunction-associated fatty liver disease (MAFLD), are common in adult FH patients and are associated with metabolic comorbidities and ASCVD. However, the associations between liver steatosis, liver fibrosis and ASCVD seem to be largely mediated by metabolic comorbidities.

IN VITRO, IN VIVO AND CLINICAL INVESTIGATIONS TO UNRAVEL THE INVOLVEMENT OF PROPROTEIN CONVERTASE SUBTILISIN/KEXINE TYPE 9 IN VASCULAR CALCIFICATION SECONDARY TO CHRONIC KIDNEY DISEASE

M.G. Lupo¹, A. Baragetti², E. Faggin³, M. Camera⁴, M. Rattazzi⁵, N. Ferri¹

¹Dipartimento di Scienze del Farmaco, Università degli Studi di Padova; ²Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano; ³Dipartimento di Medicina, Università degli Studi di Padova; ⁴Dipartimento di Scienze Farmaceutiche "Pietro Pratesi", Università degli Studi di Milano; ⁵Medicina Generale I^a, Ospedale Ca' Foncello, Azienda ULSS 2 Marca Trevigiana, Treviso

E-mail: mariagiovanna.lupo@phd.unipd.it

Background and Aim. Chronic kidney disease (CKD) lead to a higher rate of cardiovascular death (CVD) due to severe alterations in lipidic profile and a massive vascular calcification (VC) of the tunica media in the vessels' wall. Indeed, due to the hyperphosphatemia triggered by the renal damage, vascular smooth muscle cells (VSMCs) in the tunica media trans-differentiate in osteoblastic-like cells. Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) turned out as a cornerstone pharmacological target for familial hypercholesterolemia (FH), with two anti-PCSK9 monoclonal antibodies approved so far. Recently, PCSK9 plasma levels were associated with a higher calcification rate in the general, FH, CKD, and diabetic populations. Starting from these premises, the present study aims to study the putative causal role of PCSK9 in VC under uremic conditions.

Methods. Plasma PCSK9 has been measured in a cohort of 594 patients with renal impairment (RI) divided according to their GFR and the presence of atherosclerotic cardiovascular disease (AS-CVD). Sprague-Dawley rats were fed a standard diet (n=11) or uremic diet containing 0.5% adenine (n=11) for 6 weeks. Urine volumes have been measured every two weeks by housing rats in metabolic cages for 24h. At sacrifice, abdominal aortas, plasma, livers, and kidneys have been collected. Calcium crystals in tunica media of aortas have been visualized by von Kossa staining and quantified by a colorimetric assay. Plasma creatinine and phosphate levels have been evaluated by clinical standardized methods. PCSK9 expression in kidneys and liver has been evaluated by Western Blotting (WB). PCSK9 expression in tunica media was visualized by immunohistochemistry (IHC). The overexpression of PCSK9 in vascular smooth muscle cells (VSMCs) has been realized through retroviral infection. The cells have been cultured with low-FCS/high-phosphate media (2.5% FCS plus 2.0 mM or 2.4 mM of Pi solution) for 7 days, changing media every two days. Hydroxyapatite deposition by cells has been measured by a calcium colorimetric assay. Calcification markers, such as tissue-nonspecific alkaline phosphatase (ALP), osteopontin (OPN), matrix GLA protein (MGP) and bone morphogenetic protein 2 (BMP2) expressions were evaluated through WB and real time-qPCR (RT-qPCR). Extracellular vesicles (EVs) have been evaluated by flow cytometry (FC) and were tested for their calcium and ALP content.

Results. In a cohort of 594 patients with RI, the lower the GFR the higher plasma PCSK9, as previously reported. ASCVD as co-morbidity worsens this outcome. In our uremic model, the uremic condition was documented by increased urine volume (26 mL/day vs 58 mL/day), plasma creatinine (25.7 µM vs 208 µM) and phosphate levels (2.64µM vs 6.11 µM). The proved renal damage triggered extensive aortic calcifications, determined by measuring

aorta calcium concentrations (0.34 mg/g tissue vs 2.48 mg/g tissue) and by Von Kossa staining. Moreover, the model showed a significant increase in TC (from 75.3 mg/dL to 107.6 mg/dL) and PCSK9 levels (from 40.1 ng/mL to 109.7 ng/mL). Higher expression of PCSK9 was also observed in kidney (+4.8-fold) and liver (+1.5-fold). The overexpression of PCSK9 in VSMCs induced a significant increase of extracellular calcification in response to 7 days exposure to 2.4 mM Pi (+39% compared to control hSMCs). This increase in calcification rate is mediated by a significant reduction in VC inhibitors (OPN and MGP) and by a significant increase in VC stimulators, such as ALP and BMP2. We also observed an increase in Ca²⁺ and ALP-loaded EVs budding.

Conclusion. The present study indicates a direct role of PCSK9 on VC associated to a CKD condition. Further analysis on PCSK9 knockout models for CKD-mediated vascular calcification will attempt to prove the PCSK9 causality in VC process.

PCSK9 AFFECTS BRAIN CHOLESTEROL METABOLISM AND NEUROINFLAMMATION IN HUMAN CELL MODELS OF ASTROCYTES AND NEURONS

C. Marchi¹, F. Zimetti¹, N. Ferri², M.P. Adorni³, B. Papotti¹, E. Vandini⁴, N. Ronda¹, D. Giuliani⁵, F. Bernini¹

¹Dipartimento di Scienze degli Alimenti e del Farmaco, Università di Parma; ²Dipartimento di Scienze del Farmaco, Università degli Studi di Padova; ³Dipartimento di Medicina e Chirurgia, Università di Parma; ⁴Dipartimento di Scienze degli Alimenti e del Farmaco, Università di Parma, Dipartimento di Scienze Biomediche, Metaboliche e Neuroscienze, Università degli studi di Modena e Reggio Emilia, Modena; ⁵Dipartimento di Scienze Biomediche, Metaboliche e Neuroscienze, Università degli studi di Modena e Reggio Emilia, Modena
E-mail: cinzia.marchi2@studenti.unipr.it

Background. Altered lipid metabolism and increased neuroinflammation are associated with Alzheimer's disease (AD) pathogenesis. In the brain, PCSK9 is able to degrade the neuronal receptors that, by interacting with HDL-like particles containing apoE (apoE-HDL), are able to promote the uptake cholesterol derived from astrocytes. In addition, PCSK9 has shown a pro-inflammatory effect in macrophages, microglial-like cells. This study aims to investigate the molecular mechanisms by which PCSK9 may exert a pathogenetic role and a deleterious effect on brain cells by negatively modulating cholesterol homeostasis or neuroinflammation in astrocytes and neurons.

Methods. The following cell models have been utilized: human astrocytoma cells (U-373) exposed to exogenous human recombinant PCSK9; human neuroblastoma cells (SH-SY5Y) retrovirally transduced to overexpress human PCSK9. The effect of PCSK9 has been evaluated on: cholesterol synthesis, efflux and uptake by radioisotopic assays; gene and protein expression by qRT-PCR and Western Blot analyses, respectively; the interaction between fluorescent apoE and living cells, by confocal microscopy.

Results. In U-373 cells, incubation with PCSK9 significantly increased endogenous cholesterol synthesis in the presence of 10% FCS (+2 folds; p<0.001). In U-373 stimulated with LXR/RXR agonists, treatment with human recombinant PCSK9 significantly reduced the efflux to apoE-HDL (-25%; p=0.008), while it did not affect cholesterol efflux to isolated apoE. In SH-SY5Y overexpressing PCSK9, the uptake of 3[H]-cholesterol-labeled apoE-HDL was significantly reduced compared to control SH-SY5Y (-30%; p<0.001). PCSK9 overexpression also reduced the interaction between fluorescein labelled-apoE and neuroblastoma cells. Moreover, in the same cellular model, apoER2 and LDLr expression was significantly reduced (p<0.05). Regarding neuroinflammation, PCSK9 worsened the inflammatory response induced by beta-amyloid aggregates in U-373, further increasing the gene expression of IL-1beta and TNF-alfa (p<0.05). Altogether, these results suggest an influence of PCSK9 on cerebral cholesterol homeostasis and neuroinflammation, indicating a possible role in AD pathogenesis.

PRIMARY DYSLIPIDAEMIAS IN THE PEDIATRIC AGE: CLINICAL AND BIOCHEMICAL IMPACT OF NUTRITIONAL COUNSELLING

G. Massini, A. Nyffenegger, R. Buganza, L. de Sanctis, O. Guardamagna

Department of Pediatrics, University of Turin
E-mail: giulia.massini@unito.it

Background. Children affected by primary dyslipidaemia are exposed to cardiovascular risk, so they have to be treated early to avoid premature coronary heart disease. Dietary counselling is the first approach but its effectiveness questioned. The aim of this study was to investigate the dietary impact on lipid profile of pediatric patients affected by different form of dyslipidaemia. The second purpose was to check any relationship with different diagnosis of dyslipidaemia.

Methods. n. 225 familial hypercholesterolemia (FH), n.229 familial combined hypercholesterolemia (FCHL) and n.331 polygenic hypercholesterolemia (HyperCT), not undergoing phytosterols or statin therapy, were selected. Subjects underwent two consecutive medical examinations to assess their plasma lipid levels and daily diet. Throughout the first examination, they received dietary counselling, according to the CHILD-1 diet protocol. Week diaries checked compliance and LDL-c reduction was used as parameter of responsiveness to the diet.

Results. 66.4% of patients showed adherence to the dietary therapy with a lipid profile improvement in the 81.7% of them. CT, LDL-c and non-HDL-c decrease was observed in FH -7.5%, -10.6%, -9.9% respectively, FCHL -6.4%, -6.4%, -5.6% respectively and HyperCT -9.4%, -11.8%, -10.7% respectively. No significant reduction in triglycerides. Concerning nutritional changes: all groups reduced total lipids and saturated acid fat (-20%), increased complex carbohydrates (+6%) and dietary fiber (+20%) intakes. A significant difference in LDL-c reduction was detected comparing HyperCT and FCHL: the former had an average response greater of -6.7 mg/dl compared to the latter. The FH-FCHL comparison showed a mean difference in LDL-c and non-HDL-c of -11 mg/dl in favour of the FH group.

Conclusions. The study confirms the efficacy of dietary counseling as first approach in childhood, since the improvement of dietary habits has led to a significant decrease in plasma lipid values, regardless of diagnosis. HyperCT patients have recorded the greatest decrease followed by FH and FCHL patients; this could indicate that plasma lipid reduction may be influenced by the phenotype of dyslipidaemia besides the different dietary adherence.

ASSOCIATION BETWEEN DIETARY INFLAMMATORY INDEX AND SUBCLINICAL CAROTID ATHEROSCLEROSIS IN THE GENERAL POPULATION

E. Mattavelli¹, L. Redaelli¹, C. Tidone¹, L. Grigore², F. Pellegatta², V. Zampolieri³, A. Baragetti⁴, A.L. Catapano²

¹SISA Center for the Study of Atherosclerosis, Bassini Hospital, Cinisello Balsamo, Milan, ²SISA Center for the Study of Atherosclerosis, Bassini Hospital, Cinisello Balsamo, Milan, and IRCCS Multimedica Hospital, Milan; ³SISA Center for the Study of Atherosclerosis, Bassini Hospital, Cinisello Balsamo, Milan, and Department of Pharmacological and Biomolecular Sciences, University of Milan; ⁴Department of Pharmacological and Biomolecular Sciences, University of Milan
E-mail: elisa.mattavelli1@gmail.com

Introduction. Unhealthy dietary habits account for both the occurrence of chronic metabolic conditions, like type 2 diabetes (T2D) and metabolic syndrome (MetS) and Atherosclerotic Cardiovascular Diseases (ACVDs). So far, this association has been attributed to the metabolic effects of highly-caloric dietary intakes and majorly to saturated fats, carbohydrates and sugars. At the same time, macro- and micro-nutrients can exert anti- or pro-inflammatory effects beyond their metabolic impact. The question is whether the balance between the intake of pro- and anti-inflammatory effects of diet might associate with Subclinical Carotid Atherosclerosis (SCA), even in absence of T2D and MetS.

Materials and Methods. We collected information about clinical history, anthropometric measurements, and dietary habits (7-days dietary record) of 339 subjects (PLIC cohort) without T2D and MetS and in primary prevention for ACVD. We hereby were able determine the balance between the intake of pro- and anti-inflammatory micro- and macro-nutrients, by calculating the Energy Adjusted-Dietary Inflammatory Index (EA-DII). Lipid profile, glucose-metabolic parameters, haematocrit, and high-sensitivity C-Reactive Protein (hs-CRP) were measured. A detailed ultrasound-based vascular characterization identified subjects with SCA and to cluster four different vascular phenotypes, combining the information about presence/absence of SCA (-/+ SCA) and the parietal intima media thickening (IMT>0.9 mm) (-/+ IMT).

Results. The balance in the intake of pro- and anti-inflammatory nutrients in the first EA-DII quartile was significantly different between subjects with SCA (41.9% of the population) and subjects without SCA (-2.19 ± 0.10 vs -1.87 ± 0.10 p=0.030). Differences between subjects with SCA and those without SCA were also observed in the fourth EA-DII quartile (2.21 ± 0.14 vs 1.81 ± 0.12 , p=0.042). It is finally of note that the identification of subjects with different vascular phenotypes, unmasked the association between hs-CRP and EA-DII. In fact, higher hs-CRP was significantly associated with higher EA-DII in subjects with -SCA/-IMT and was numerically (but not statistically) associated with higher EA-DII in subjects with +SCA/+IMT.

Conclusion. Our results suggest an association between SCA and unbalance between the intake of pro- and anti-inflammatory nutrients. The association found between EA-DII and hs-CRP calls for further investigation on larger numbers.

EFFECTS OF A SYNERGISTIC FOOD SUPPLEMENT BASED ON PROBIOTIC MICROORGANISMS ON “LIPID ACCUMULATION PRODUCT” IN OVERWEIGHT-OBESE ADULTS

E. Mazza, R. Pujia, Y. Ferro, G. Boragina, A. Mirarchi, S. Maurotti, T. Montalcini, A. Pujia
University Magna Graecia, Catanzaro

Background. Obesity is a major public health problem because of its association with non-communicable diseases and all-cause mortality. Lipid accumulation product (LAP), which is calculated as a combination of waist circumference (WC) and fasting plasma triglyceride (TG) levels, has been proposed as an alternative measure of excessive lipid accumulation. Recently, a growing number of studies have shown that LAP is a powerful marker for insulin resistance, metabolic syndrome, diabetes, and hepatic steatosis in the general population and associated with risk of cardiovascular diseases (CVDs). Currently, gut dysbiosis has been identified as a remarkable factor to be considered in the pathogenesis of CVDs. The importance of gut microbiota in health and disease is being highlighted by numerous research groups worldwide. Some research has revealed that glycaemic, lipid, blood pressure and inflammation indicators are significantly improved by supplementing probiotics. The aim of this study was to evaluate the effects of a food supplement based on probiotic microorganisms on lipid accumulation product in overweight/obese subjects.

Methods. We examined the data from 46 overweight/obese adults of both genders with high levels of LAP, enrolled in a trial (prot. CE.58/2019) carried out at the Clinical Nutrition Unit of the University of Catanzaro. LAP was calculated using the formula [WC (cm) - 65] \times TG concentration (mmol/L) for men, and [WC (cm) - 58] \times TG concentration (mmol/L) for women. In our analyses, the cut-off value for men was 56.7 and 30.4 for women. The intervention group (n=21) was given a synergistic food supplement based on probiotic microorganisms: Bifidobacterium lactis BS05 (DSM 23032) and Lactobacillus plantarum LP01 (LMG P-21021), capable of promoting the balance of the intestinal bacterial flora. The placebo group (n=25) received food supplement containing maltodextrins. All participants received intensive oral and written recommendations to increase adherence to the Mediterranean diet with energy restriction (-500kcal/day). All subjects underwent fasting blood samples to evaluate lipid, hepatic and glycaemic profiles; they were also subjected to anthropometric measurements and body composition assessment. All measurements were performed at baseline and at 1, 3 and 6 months of follow-up.

Results. A total of 69% were females. The mean age was 55 ± 9 yrs, and BMI was 30.5 ± 4 kg/m². In probiotic group, we found a reduction statistically different in LAP index between 1, 3 and 6 months (LAP= -8.8 ± 17 , p=0.03; -9.2 ± 17 , P=0.02; -17 ± 20 , P=0.001 respectively). In the placebo group we did not find statistically significant change in LAP index during the study. In addition, in the probiotic group we found a statistically significant reduction of serum glucose at 3 and 6 months (glucose: -4 ± 8 mg/dL, p=0.03; -5 ± 9 mg/dL, p=0.01) and triglycerides after 6 months (-26.48 ± 48 mg/dL, p=0.02). No significant differences in glucose and lipid levels were found in the placebo group. Both groups had a statistically significant reduction of body weight at each follow-up.

Conclusions. The present study suggests that a food supplement based on probiotic microorganisms reduces lipid accumulation product, and improves serum glucose and triglycerides in overweight/obese individuals. If confirmed in randomized clinical trials, the food supplement based on probiotic microorganisms could represent an effective strategy in the prevention of cardiometabolic risk for these patients.

NON-ALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE AND METABOLIC SYNDROME IN ATRIAL FIBRILLATION. A MULTICENTER PROSPECTIVE COHORT STUDY

D. Menichelli¹, D. Pastori¹, A. Sciacqua², R. Marcucci³, M. Del Ben¹, F. Baratta¹, F. Violi¹, P. Pignatelli¹

¹Sapienza University, Rome; ²University Magna Graecia of Catanzaro; ³University of Florence

E-mail: danilo.menichelli@uniroma1.it

Background. Metabolic syndrome (MetS) is highly prevalent in patients with atrial fibrillation (AF), and frequently associated with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). The risk of cardiovascular events (CVEs) in AF patients according to the presence of MetS and NAFLD is unknown.

Methods. Prospective observational multicenter study including 1,735 patients with non-valvular AF treated with vitamin K antagonists (VKAs) or non-VKAs oral anticoagulants (NOACs). NAFLD was defined by a fatty liver index ≥ 60 . We categorized patients in 4 groups: 0= neither MetS or NAFLD (38.6%), 1= NAFLD alone (12.4%), 2= MetS alone (19.3%), 3= both MetS and NAFLD (29.7%). Primary endpoint was a composite of CVEs.

Results. Mean age was 75.4 ± 9.4 years, and 41.4% of patients were women. During a mean follow-up of 34.1 ± 22.8 months (4,926.8 patient-years), 155 CVEs were recorded (incidence rate of 3.1%/year): 55 occurred in Group 0 (2.92%/year), 12 in Group 1 (2.17%/year), 45 in Group 2 (4.58%/year) and 43 in Group 3 (2.85%/year). Multivariable Cox regression analysis showed that use of NOACs, and female sex were inversely associated with CVEs, whilst age, heart failure, previous cardiac and cerebrovascular events, and group 2 (Group 2, Hazard Ratio 1.517, 95% Confidence Interval, 1.010-2.280) were directly associated with CVEs.

Conclusions. In patients with AF, cardiovascular risk seems to be related to the presence of MetS rather than NAFLD. The coexistence of NAFLD and MetS does not seem to increase the risk of CVEs.

EFFECTS OF PCSK9 INHIBITORS ON GLUCOSE METABOLISM AND β CELL FUNCTION IN HUMANS

S. Moffa¹, T. Mezza¹, F. Cinti¹, C. Cefalo¹, F. Impronta¹, A. Pontecorvi¹, A. Mari², A. Giaccari¹

¹Endocrinology and Diabetology, Catholic University, Rome;

²Department of Engineer CNR, Padua

E-mail: simona.moffa@gmail.com

PCSK9 inhibitors are monoclonal antibodies effective in reducing LDL-C and cardiovascular events by neutralizing circulating PCSK9. Since PCSK9 is also expressed in other organs, including pancreas, studies on PCSK9 KO mice, have shown impaired insulin secretion. Other murine models in which PCSK9 was silenced only in the liver (mimicking the action of PCSK9i) had normal glucose metabolism. The aim of our study was to evaluate the effect of PCSK9 inhibitors on glucose metabolism and beta cell function in humans. 12 non-diabetic subjects candidate for PCSK9i therapy were enrolled in the study. All subjects underwent an OGTT at baseline and after 6 months of therapy, at which point surrogate insulin sensitivity indices were obtained (Matsuda; OGIS). During OGTT, insulin secretion parameters were derived from C-peptide levels by deconvolution; we evaluated basal insulin secretion rate, total insulin secretion rate and β -cell glucose sensitivity, for all of the 12 enrolled subjects. All patients showed a 58.5% reduction in LDL cholesterol after 6 months of therapy; the mean LDL-C baseline level (B) was 205.6 ± 58 mg/dl, while mean LDL-C post therapy (PT) value was 85 ± 31 mg/dl. Glycemic and insulinemic curves showed no significant differences between baseline and follow-up. Matsuda index (B 3.8 ± 1.6 , PT 3.6 ± 1.4 mL min-1 kg-1) and OGIS (B 379.3 ± 63 , PT 400.4 ± 49 ml min-1 m-2), showed no differences between baseline and post-therapy evaluation. There were no significant differences in insulin secretion parameters: basal insulin secretion rate (B 65.6 ± 29 , PT 70.7 ± 31 pmol min-1 m-2), total insulin secretion rate (B 49.8 ± 14 , PT 47.7 ± 13 , nmol m-2) and β -cell glucose sensitivity (B 105.7 ± 54 , PT 123.3 ± 57 pmol min-1 m-2 mM-1) obtained from c-peptide deconvolution. Our study, although preliminary and in a small sample of patients, suggests that PCSK9i does not cause alterations in glucose metabolism and beta cell function. Further studies and a longer follow-up may provide us with further data to confirm our observations.

MCT1 LACTATE TRANSPORTER DELETION IN T LYMPHOCYTES AFFECTS VISCERAL ADIPOSE TISSUE HOMEOSTASIS DURING OBESITY

A. Moregola, C. Macchi, M.F. Greco, F. Bonacina, M. Ruscica, G.D. Norata

*Department of Pharmacological and Biomolecular Sciences,
University of Milan*

E-mail: annalisa.moregola@unimi.it

Introduction. Recent studies have shed light on the interconnection between metabolism and immunity in multicellular organisms and their functional coordination for an effective establishment and resolution of immune responses. Imbalance of this delicate signaling network might lead to non-resolving inflammation and consequently to the development of obesity associated chronic inflammation (ObCI). T lymphocytes (T cells) accumulate in the adipose tissue during obesity and their activation leads to a switch in their metabolism from oxidative phosphorylation to aerobic glycolysis which involves the production of elevated amount of lactate. MCT1 is a lactate transporter expressed in different type of cells including T lymphocytes. Aim of this project is to investigate the relevance of T cells lactate transport by MCT1, in the context of adipose tissue inflammation during obesity.

Materials and Methods. MCT1f/f CD4-cre mice, with specific deletion of MCT1 in both CD4+ and CD8+ T lymphocytes, and MCT1f/f littermates were generated and fed with an high-fat diet (HFD; 45% Kcal from fat) for 20 weeks. Body weight was measured weekly; glucose metabolism (glucose-tolerance test (GTT) and insulin-tolerance test (ITT)) was checked at 10 and 20 weeks. Immunophenotyping of different tissues (blood, lymph nodes, adipose tissue, thymus) was performed at 20 weeks by flowcytometry. qPCR analysis was performed on visceral adipose tissue.

Results. T cells activation results in the increase of MCT1 expression in both human and mouse T lymphocytes. Following high fat diet feeding, MCT1f/f CD4-cre mice in spite of a similar weight gain and insulin response compared to MCT1f/f, present a decreased visceral (VAT) and subcutaneous (SCAT) fat accumulation. Moreover, MCT1 deficiency in T cells results in a reduction of CD8+ T lymphocytes number in visceral and subcutaneous adipose tissue (VAT MCT1f/f mice 48098cells/g \pm 36587, MCT1f/f CD4-cre 18497cells/g \pm 14508, p<0.05; SCAT MCT1f/f 2738cells/g \pm 1189, MCT1f/f CD4-cre 1669cells/g \pm 684, p<0.05); this profile was associated with a different T cell subsets distribution (T effector memory (Tem) CD8+ VAT: MCT1f/f 84.20% \pm 5.72, MCT1f/f CD4-cre 57.29% \pm 8, p<0.001; Tem CD8+ SCAT: MCT1f/f 72.2% \pm 14.16, MCT1f/f CD4-cre 44.93% \pm 14.25, p<0.001), but a similar number of innate immune cells (monocyte and macrophages) infiltrating adipose depots. This lower number of T cells in MCT1f/f CD4-cre mice is furthermore associated with a reduction in the adipocytes area in the adipose tissues and to a lower expression of preadipogenic markers in the visceral adipose tissue (e.g. PPAR γ , PPAR δ , cEBP δ).

Conclusions. Our data suggest that MCT1 transporter supports T lymphocytes activation and proliferation during obesity. MCT1 deficient CD8+ T lymphocytes accumulate less in VAT and this reflects into reduced adipose tissue hypertrophy under HFD conditions.

UNMET NEEDS FOR CARDIOVASCULAR PREVENTION IN A LARGE POPULATION OF PATIENTS WITH IN TYPE 2 DIABETES. AN ITALIAN SURVEY ON LIPID LOWERING THERAPIES AND ACHIEVEMENT OF LDL-CHOLESTEROL TARGETS

M.L. Morieri, A. Avogaro, G.P. Fadini

University of Padova

E-mail: morieri.ml@gmail.com

Background. The well-known benefit of lowering LDL-c has led clinical practice guidelines to lower the LDL-c targets for cardiovascular prevention. Despite this, there is a surprising lack of real-world studies (RWS) evaluating whether these information are transferred into clinical practice. We, therefore evaluated, in a large RWS, the pattern of Lipid-Lowering Treatments (LLTs) use and the achievement of LDL-c targets in patients with type 2 diabetes (T2D) in Italian specialist clinics.

Methods and Results. We collected data from 46 diabetes outpatient clinics, following a total of 281,381 patients. We extracted information from 104,726 T2D patients for whom use of LLT between 2015-2016 was ascertained. 63,861 (61.0%) patients were on statin therapy, 9.2% of whom were also on ezetimibe. According to EAS/ESC-2019 guidelines, almost all subjects were at very-high (70.4%) or high (29.3%) cardiovascular risk. Among very-high-risk patients, 35% were not on statin despite half of them had LDL-c >2.6 mmol/l (100 mg/dl), and among the 65% taking statins, only 15% had LDL-c <1.4 mmol/l (55 mg/dl). 83% of subjects in secondary prevention were on a statin, but half of them had LDL-c >1.8 mmol/l (70 mg/dl). Based on anticipated response to treatment, we estimated that 38% of the entire population would require initiation or shift towards high-intensity (HI) statin, 27% a combination of HI-statin+ezetimibe, and 27% the addition of PCSK9-inhibitors. These intensifications of LLT would reduce the incidence of cardiovascular events by 32%, from 23.511 events per 100,000/10 years to 16.022 per 100,000/10 year (IRR 0.68; 95% C.I. 0.67-0.70, P<0.001).

Conclusions. The use of LLT in T2D is increased over the last decades. However, the majority of subjects with T2D did not achieve their LDL-c targets. Given the very-high cardiovascular risk of these patients, improving LLT is expected to have a dramatic impact on cardiovascular prevention.

GUT PERMEABILITY-RELATED TOLL-LIKE RECEPTOR 4-PRIMED PLATELETS IN MYOCARDIAL INFARCTION

C. Nocella¹, F. Barillà¹, R. Carnevale², V. Cammisotto³, S. Bartimoccia¹, N. Bruno¹, C. Torromeo¹, N. Viceconte¹, L. Loffredo¹, P. Pignatelli¹, C. Gaudio¹, F. Violi¹

¹Department of Clinical, Internal, Anaesthesiologic, and Cardiovascular Sciences, Sapienza University of Rome;

²Department of Medical-Surgical Sciences and Biotechnologies, Sapienza University of Rome; ³Department of General Surgery and Surgical Speciality Paride Stefanini, Sapienza University of Rome
E-mail: cristina.nocella@uniroma1.it

Background. Lipopolysaccharides (LPS) from Gram-negative bacteria are implicated in coronary thrombosis but the underlying mechanism is unclear. Objectives. We hypothesized that circulating platelets from myocardial infarction (MI) patients are primed by LPS upon interaction with its receptor Toll-like receptor 4 (TLR4).

Methods. Serum levels of LPS and zonulin, and platelet aggregation (PA) by collagen alone or in combination with a TLR4 inhibitor (TLR4i) were studied ex vivo in platelets from 40 MI patients and 40 controls matched for age, sex and atherosclerotic risk factors; platelet TIR domain-containing adaptor protein (TIRAP) and TIRAP-MyD88 interaction were also investigated by western blot and co-immunoprecipitation, respectively.

Results. MI patients showed higher levels of serum LPS and zonulin compared to controls; serum zonulin and LPS significantly correlated. Platelets from MI patients incubated with TLR4i showed a significant reduction of PA while no effect was detected in controls. LPS serum levels significantly correlated with the rate of PA lowering induced by TLR4i in MI patients. TIRAP was over-expressed in platelets from MI compared to controls and co-immunoprecipitated with MyD88; conversely, co-immunoprecipitation was not detected in platelets from controls. In vitro study showed that LPS, at concentrations similar to those found in MI, dose-dependently activated TIRAP and amplified the platelet response to the agonist, an effect blunted by TLR4i.

Conclusions. The study provides the first evidence that in MI patients LPS primes platelets via TLR4 activation; enhanced gut permeability is suggested as mechanism accounting for LPS-mediated TLR4 priming of platelets.

ADOPTIVE CELL TRANSFER OF ENGINEERED REGULATORY T CELLS IMPROVES ATHEROSCLEROSIS IN EXPERIMENTAL MODELS

J. Nour¹, F. Bonacina¹, E. Martini², M. Svecla¹, M. Cremonesi², F. Pellegatta³, A.L. Catapano⁴, M. Kallikourdis², G.D. Norata⁵

¹Department of Excellence of Pharmacological and Biomolecular Sciences, University of Milan; ²IRCCS Humanitas Research Foundation, Rozzano; ³Centro SISA, Ospedale Bassini, Cinisello Balsamo, Milan; ⁴Department of Excellence of Pharmacological and Biomolecular Sciences, University of Milan; IRCSS Multimedica, Milan; ⁵Department of Excellence of Pharmacological and Biomolecular Sciences, University of Milan, Milan, Centro SISA, Ospedale Bassini, Cinisello Balsamo, Milan
E-mail: jasmine.nour@studenti.unimi.it

Aim. Regulatory T cells exert a pivotal immunosuppressive function during atherosclerosis by dampening the inflammatory response associated with the disease. Established that Tregs engineering improves their homing to atherosclerotic plaques in experimental models, aim of this study was to investigate the effect of adoptive cell transfer (ACT) with Tregs previously engineered to home to the atherosclerotic plaque, on atherosclerosis progression.

Methods. LDLR-KO mice fed with cholesterol-enriched diet (WTD) for 8 weeks were treated with engineered Tregs which have been retrovirally transfected with CX3CR1. After four weeks we evaluated atherosclerosis progression at the level of the aorta by immunohistochemistry and profiled aortic proteomic signature by shotgun proteomics.

Results. The gene expression analysis of a set of chemokines in LDLR-KO mice fed a cholesterol-rich diet revealed that CX3CL1 expression is selectively increased during atherosclerosis in the aorta but not in other tissues, as compared to control mice. We, therefore, engineered Tregs to overexpress CX3CR1, the receptor matching CX3CL1, to force homing preferentially in the aorta of LDLR-KO mice and tested this approach on atherosclerosis progression. Adoptive cell transfer with CX3CR1+/Tregs reduced atherosclerotic plaque area in the aortic sinus of LDLR-KO mice ($65016 \pm 9446 \mu\text{m}^2$ for CX3CR1+/Tregs treated mice compared to $99658 \pm 11782 \mu\text{m}^2$ for controls). The lesions in CX3CR1+/Tregs treated mice presented also increased extracellular matrix (+25%) and -SMA+ content (+29%), and a lower lipid content (-12%). Proteomics analyses highlighted a different activation of several correlated biological pathways, including increased fibroblasts mobility (z-score=2,727) and integrin signaling (z-score=1,732), and decreased apoptosis (z-score=-0,888), necrosis (z-score=-1,498), and cell infiltration (z-score=-2,206) in the aorta of CX3CR1+/Tregs treated mice compared to controls. Moreover, the first group presented also increased expression of proteins related to endocytosis, actin cytoskeleton organization, LXR activation, and even efferocytosis (such as MFGE8, LRP1 and calreticulin). The detection of macrophages surrounding apoptotic cells in the lesion of CX3CR1+/Tregs treated LDLR-KO mice confirmed the upregulation of efferocytosis. These data overall support an improved atherosclerotic plaque phenotype.

Conclusions. ACT with aorta-targeting regulatory T cells improves atherosclerosis by promoting plaque stability and reducing inflammatory burden.

COMPARING THE DISTRIBUTION OF A 12 LDL-C RAISING SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS SCORE IN PATIENTS WITH FAMILIAL HYPERCHOLESTEROLEMIA ENROLLED IN THE LIPIGEN STUDY

E. Olmastroni¹, M. Gazzotti¹, M. Arca², M. Averna³, M. Casula⁴, A.L. Catapano⁴, on behalf of the LIPIGEN Study group
¹Epidemiology and Preventive Pharmacology Service (SEFAP), Department of Pharmacological and Biomolecular Sciences, University of Milan; ²Department of Translational and Precision Medicine, Sapienza University of Rome; ³Department of Health Promotion Sciences Maternal and Infantile Care, Internal Medicine and Medical Specialties (PROMISE), School of Medicine, University of Palermo; ⁴Epidemiology and Preventive Pharmacology Service (SEFAP), Department of Pharmacological and Biomolecular Sciences, University of Milan, and IRCCS MultiMedica, Sesto S. Giovanni, Milan
E-mail: elena.olmastroni@unimi.it

Background. A significant proportion of individuals clinically diagnosed with familial hypercholesterolemia (FH), where a disease-causing mutation was not found, are likely to have a polygenic cause for their hypercholesterolemia, due to the inheritance of common LDL-cholesterol (LDL-C) raising single nucleotide polymorphisms. This study aimed at comparing the distribution of a polygenic risk score, comprised of 12 LDL-C raising variants (LDLc-score), in subjects clinically diagnosed with FH.

Methods. The analysis was performed in patients enrolled in the LIPIGEN study, an observational, multicenter study collecting data on FH patients. Adult subjects were divided in mutation-positive FH patients (with at least one causative mutation in one of the candidate genes) and mutation-negative FH patients (without a causative mutation, and pre-treatment LDL-C levels >190 mg/dL).

Results. A total of 823 mutation-positive FH patients (females 53.6%, mean age 42.4±15.1 years) and 457 mutation-negative FH patients (females 55.0%, mean age 51.5±12.3 years) were identified. Mutation-negative individuals were characterized by a higher mean LDLc-score compared to mutation-positive patients (1.01±0.17 vs 0.93±0.20, p-value <.0001), even if the latter had higher mean pre-treatment LDL-C level (237.1±42.0 vs 266.6±67.7 mg/dL, p-values <.0001). A higher mean LDLc-score in the mutation-negative cohort was also detected when the two groups were matched by pre-treatment LDL-C levels (1.01±0.18 vs 0.93±0.20, p-value <.0001). Finally, we performed a ROC analysis to determine if the LDLc-score could be used in clinical practice to distinguish between individuals with a causative mutation and mutation-negative subjects. The area under the curve for recognizing subjects characterized by a polygenic hypercholesterolemia was 0.623 (95% CI, 0.590-0.653), with a sensitivity and specificity being 52% and 65% at 1.02 as a cut-off value.

Conclusions. Despite FH mutation-negative individuals are characterized by higher values of LDLc-score, the ability of the score to distinguish monogenic or polygenic FH appears to be limited.

CER-001 AMELIORATES LIPID PROFILE AND KIDNEY DISEASE IN A MOUSE MODEL OF FAMILIAL LCAT DEFICIENCY

A. Ossoli¹, A. Strazzella¹, D. Rottoli², C. Zanchi², M. Locatelli², C. Zoj², S. Simonelli², R. Barbaras³, J.-L. Dassegue³, L. Calabresi¹

¹Department of Pharmacological and Biomolecular Sciences, Università degli Studi di Milano; ²Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri IRCCS, Centro Anna Maria Astori, Science and Technology Park Kilometro Rosso; ³Abionyx Pharma
E-mail: alice.ossoli@unimi.it

Background and Purpose. CER-001 is an HDL mimetic previously tested in different pathological conditions, but never in LCAT deficiency. This study was designed to investigate whether the absence of LCAT affects the catabolic fate of CER-001, and to evaluate the effects of CER-001 on kidney disease associated with LCAT deficiency.

Experimental. Approach: Lcat-/ and wild-type mice received intravenously CER-001 (2.5, 5, 10 mg/kg) for 2 weeks. Plasma lipid/lipoprotein profile and HDL subclasses were analyzed. In a second set of experiments, Lcat-/ mice were injected with LpX to induce renal disease and treated with CER-001. Plasma lipid profile, lipid accumulation in the kidney, albuminuria and glomerular podocyte markers were evaluated.

Results. In Lcat-/ mice a decrease in total cholesterol and triglycerides, and an increase in HDL-c was observed after CER-001. While in wild-type mice CER-001 enters the classical HDL remodeling pathway, in the absence of LCAT it disappeared from plasma shortly after injection and ended-up in the kidney. In a mouse model of renal disease in LCAT deficiency, CER-001 at 10 mg/kg had beneficial effects not only on lipid profile by reducing plasma triglycerides and increasing HDL-c levels, but also on renal disease by limiting albuminuria and podocyte dysfunction.

Conclusion. Treatment with CER-001 ameliorates the dyslipidemia typically associated with LCAT deficiency and more importantly, limits renal disease in a mouse model of renal disease in LCAT deficiency. The present results set the basis for the potential use of CER-001 in FLD patients.

IDENTIFICATION OF A RARE VARIANT IN ABCG5 GENE IN A PATIENT WITH FAMILIAL HYPERCHOLESTEROLEMIA

D. Palma¹, G. Massini², M.D. Di Taranto¹, C. Giacobbe¹, G. Maione¹, G. Cardiero¹, O. Guardamagna², G. Fortunato¹

¹Dipartimento di Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche, Università degli Studi di Napoli Federico II and CEINGE S.C.a r.l. Biotecnologie Avanzate, Napoli; ²Ambulatorio Pediatrico di Prevenzione Cardiovascolare e Dislipidemie Torino
E-mail: palmad@ceinge.unina.it

Introduction. Familial hypercholesterolemia (FH) is one of the most common monogenic metabolic diseases and is characterized by very high plasma concentrations of total cholesterol (TC) due to increased low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C). Approximately 20% to 40% of clinically defined FH patients do not show a causative variant in causative genes (LDLR, APOB and PCSK9). Mutation in other lipid-related genes can contribute to mimicking FH phenotype (FH phenocopies). Genetic diagnosis allows to perform cascade screening, increasing the disease diagnosis.

Patient, Materials and Method. We report a 11-years-old female child with a clinical suspect of FH (total cholesterol 214 mg/dL, LDL-c 140 mg/dL, triglycerides 59 mg/dL and HDL-c 61 mg/dL). The family history was positive for hypercholesterolemia and acute myocardial infarction. Patient was screened by next-generation sequencing (NGS) to detect variants in a large panel of lipid related-genes. Rare variants were confirmed by Sanger sequencing. Pathogenicity assessment was performed by ACMG guidelines.

Results. No clearly pathogenic variants in FH-causative genes were identified, although a rare variant was identified at heterozygous state in ABCG5 gene (causative of sitosterolemia): c.592C>T p.(Arg198Trp). This variant is absent from databases of gene variants (GnomAD; EVS; 1kG) and mutations (HGMD professional); according to the ACMG guidelines can be classified as a likely pathogenic variant. Phytosterol measurement revealed increased levels of campesterol 0.62 mg/dL (normal <0.33 mg/dL) and sitosterol 0.53 (normal <0.39 mg/dL).

Conclusion. The presence of the rare variant c.592C>T p.(Arg-198Trp) in ABCG5 at heterozygous state is associated with lightly increased phytosterols in the FH pediatric patient. This variant could be a possible cause of hypercholesterolemia in the patient. The use of extended gene panels analyzed by NGS can help to identify variants in additional lipid-related genes with a potential role in FH.

A NEW MACROPHAGE-SPECIFIC LONG NON-CODING RNA REGULATES CELL CHOLESTEROL METABOLISM AND PROMOTES ATHEROSCLEROSIS

B. Papotti¹, V. Simion², H. Zhou², S. Haemming², C. Marchi¹, F. Zimetti¹, M.P. Adorni³, F. Bernini¹, M.W. Feinberg², N. Ronda¹

¹Department of Food and Drug, University of Parma; ²Department of Medicine, Cardiovascular Division, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston, MA, USA;

³Department of Medicine and Surgery, University of Parma
E-mail: bianca.papotti@unipr.it

Background. Long non-coding (lnc) RNAs are potent regulators of many pathophysiological processes including atherosclerosis. Using RNAseq profiling of the intima lesions of LDLR^{-/-} mice, our group identified for the first time a macrophage-specific lncRNA MAARS (Macrophage Associated Atherosclerosis lncRNA Sequence), whose expression was strongly increased during atherosclerosis progression. Moreover, its *in vivo* silencing reduced atherosclerotic lesion formation. As macrophage cholesterol metabolism is strongly involved in atherogenesis, we explored the possibility of a direct effect of MAARS on cholesterol handling.

Material and Methods. Bone marrow was isolated from C57bl/6 mice and differentiated to BMDM (bone marrow-derived macrophages) with mMCSF (mouse macrophage-colony stimulating factor). BMDM were silenced using Lipofectamine and customized GapmeRs for MAARS or negative control. MAARS knockdown efficacy was verified through RT-qPCR. Cholesterol synthesis and efflux were evaluated though a radioisotopic technique, while macrophage cholesterol uptake was evaluated though a fluorimetric assay.

Results and Conclusions. MAARS expression in BMDM was significantly reduced after the silencing with MAARS GapmeRs compared to those transfected with control GapmeRs (~ 72%). MAARS silencing in acLDL-loaded BMDM showed an increased cholesterol efflux to HDL ($p<0,01$), ApoA-I ($p<0,001$) and serum from normolipidemic subjects (NS; $p<0,05$) compared to control BMDM. MAARS knockdown BMDM exposed to acLDL and hypercholesterolemic human serum (HCS) showed a reduced cholesterol uptake as compared to control BMDM ($p<0,05$). Finally, MAARS knockdown BMDM displayed a reduced cholesterol synthesis compared to control BMDM ($p<0,01$). Altogether, these results suggest a potential regulation of MAARS on total cell and membrane cholesterol content, as demonstrated by an increased cholesterol efflux, decreased cholesterol uptake and cholesterol synthesis following the *in vitro* MAARS silencing. Thus, the impact of MAARS on macrophage cholesterol handling may be one of the mechanisms of its proatherogenicity; ongoing studies will explore the underlying molecular mechanisms.

STATIN USE AND MORTALITY IN ATRIAL FIBRILLATION: A SYSTEMATIC REVIEW AND METANALYSIS OF 100,287 PATIENTS

D. Pastori¹, F. Baratta¹, A. Di Rocco¹, A. Farcomeni², M. Del Ben¹, F. Angelico¹, F. Violi¹, G. Lip³, P. Pignatelli¹
¹Sapienza University; ²University of Rome "Tor Vergata"; ³Liverpool University
E-mail: daniele.pastori@uniroma1.it

Statins are effective for reducing cardiovascular disease in patients at risk or with cardiovascular disease. The benefit of statin therapy on adverse cardiovascular outcomes in patients with non-valvular atrial fibrillation (AF) is not clear. We performed a systematic review and metanalysis of studies retrieved from MEDLINE via PubMed and Cochrane (CENTRAL) database of studies investigating the efficacy of statins in AF patients. The principal endpoint was all-cause mortality. Other endpoints were cardiovascular mortality, ischemic stroke, composite endpoints and any bleeding. We included 14 observational studies (2 post-hoc analysis of randomized clinical trials, 8 prospective and 4 retrospective) with 100,287 AF patients, of whom 23,228 were on statins. The pooled hazard ratio (HR) for all-cause mortality was 0.59 (95% Confidence Interval [CI] 0.54-0.65). This association was consistent by aging, sex and prevalent cardiovascular or cerebrovascular disease, and the beneficial effect was evident already after 12 months of therapy. The pooled HR for statins against cardiovascular mortality was 0.75 (95% CI 0.58-0.96). No association was found with other secondary endpoints. Regarding bleeding events, the pooled HR for statin use was 0.60 (95%CI 0.48-0.76). Our metanalysis shows that in AF patients, statin therapy was associated with a reduction in all-cause and cardiovascular mortality are reduced by 41% and 25%, respectively. Randomized clinical trials in AF patients are necessary, as well as clarity on AF-specific LDL cholesterol targets.

MANAGEMENT OF FAMILIAL CHYLOMICRONEMIA SYNDROME IN REAL-WORLD PRACTICE: A REPORT OF TWO ITALIAN PATIENTS TREATED WITH VOLANESORSEN

C.A. Pavanello¹, F. Pazzucconi², A. Alberti³, L. Calabresi⁴

¹Centro E. Grossi Paoletti, Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano; ²Centro Dislipidemie, ASST Grande Ospedale Metropolitano Niguarda, Milano; ³SSD Diagnosi e Cure Territoriali per Malattie Cardiache, Dipartimento Cardiotoracovascolare, ASST Grande Ospedale Metropolitano Niguarda, Milano; ⁴Centro E. Grossi Paoletti, Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano
E-mail: chiara.pavanello@unimi.it

Familial Chylomicronemia Syndrome (FCS) is a rare genetic disease characterized by severe hypertriglyceridemia and consequent risk of recurrent and acute pancreatitis (AP), which entails a reduced quality of life. Traditional TG-lowering therapies (fibrates) are largely ineffective in FCS patients. Volanesorsen is a second-generation antisense oligonucleotide inhibiting apoC-III transcription that has been recently approved in Europe for FCS. We examined the efficacy and safety of volanesorsen in two FCS patients treated in Lipid Clinic in Milan, outside a clinical trial setting. Two female patients (aged 47 and 54) with genetically determined FCS and recurrent AP has been treated with volanesorsen on top of standard TG-lowering therapies since February 2020. Baseline TG levels were 1580 mg/dL and 913 mg/dL, respectively. Volanesorsen was administered according to the approved European Union prescribing information. Lipid profile and complete blood count were monitored. After only one dose, TG dropped by 32% in one patient and 90% in the other one. Although response fluctuations could be appreciated, TG levels have been always maintained below 1000 mg/dL. TG elevation was observed when dietary fat compliance was reduced. Volanesorsen was generally well-tolerated. Moderate thrombocytopenia was a common adverse event but required dose adjustment only in one case. Any specific intervention was needed. No AP occurred during the observation period. In conclusion volanesorsen is an effective and safe adjunct to standard therapies in patients with FCS.

PROGRESSION OF CHRONIC KIDNEY DISEASE IN FAMILIAL LECITHIN CHOLESTEROL ACYLTRANSFERASE DEFICIENCY: FOLLOW-UP OF THE ITALIAN COHORT

C. Pavanello¹, A. Ossoli¹, M. Arca², L. D'Erasmo², G. Boscutti³, L. Gesualdo⁴, T. Lucchi⁵, T. Sampietro⁶, F. Veglia⁷, L. Calabresi¹
¹*Centro E. Grossi Paoletti, Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano; ²Department of Translational and Precision Medicine, Sapienza University of Rome; ³Nephrology, Dialysis and Transplantation Unit, S. Maria della Misericordia Hospital, Azienda Sanitaria Universitaria Friuli Centrale (ASUFC), Udine; ⁴Nephrology, Dialysis and Transplantation Unit, Department of Emergency and Organ Transplantation, University of Bari Aldo Moro, Bari; ⁵Metabolic Disease Clinic - Geriatric Unit, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milan; ⁶Lipoapheresis Unit and Reference Center for Inherited Dyslipidemias, Fondazione Toscana Gabriele Monasterio, Pisa; ⁷Centro Cardiologico Monzino, IRCCS, Milan*
E-mail: chiara.pavanello@unimi.it

Familial LCAT deficiency (FLD) is a rare genetic disorder of HDL metabolism, caused by loss-of-function mutations in the LCAT gene. Renal disease represents the first cause of morbidity and mortality in FLD cases. However, the prognosis is not known and the rate of deterioration of kidney function is variable and unpredictable. Here we report the follow-up of the Italian cohort of FLD patients, one of the largest cohorts described, followed for up to 24 years. The follow-up of the large Italian cohort of FLD patients showed that renal failure occurs at the median age of 46 years, with a median time to a second recurrence of 10 years. Survival curves categorized for sex showed that event-free survival time was extended in females compared to males (median time 62 vs 43 years in females and males, respectively), although not significantly (log-rank test: p=0.308). High plasma unesterified cholesterol level was a predicting factor for rapid deterioration of kidney function. In conclusion, this study highlights the severe consequences of FLD, and underlines the need of correct early diagnosis and referral of patients to specialized centres, and the urgency for effective treatments to prevent or slow the renal disease in patients with LCAT deficiency.

OMERO - OBSERVATIONAL MULTICENTER STUDY ON EFFECTIVENESS AND TOLERABILITY OF ALIROCUMAB IN REAL WORLD

L. Pisciotta¹, K. Bonomo², P. Calabro³, F. Carubbi⁴, A.L. Catapano⁵, A.P. Maggioni⁶, R. Mantovan⁷, F. Rossi⁸, G. Agnelli⁹
¹*IRCCS AOU San Martino, IST Genova; ²AOU San Luigi Gonzaga, Orbassano, Torino; ³AO delli Colli, Ospedale Monaldi, Napoli; ⁴Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia; ⁵Università degli Studi di Milano; ⁶Centro Ricerche ANMCO, Firenze; ⁷UO di Cardiologia, Ospedale di Conegliano; ⁸Università della Campania Luigi Vanvitelli, Napoli; ⁹Università degli Studi di Perugia
E-mail: livia.pisciotta@unige.it*

Background. Despite the extensive information collected in the ODYSSEY Phase 3 trial, long-term experience with alirocumab in real life setting is still limited. Thus, few evidences about its use in real life clinical practice are available in Italy since the launch.

Objectives. The OMERO study is aimed to assess the long term effectiveness (proportion of patients reaching the recommended LDL-C goals), tolerability and safety of the proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 inhibitor (PCSK9-i) alirocumab in the real life in Italy, in patients with hypercholesterolemia at high and very high risk of cardiovascular (CV) events who are unable to achieve their LDL-C goal despite therapy with high intensity statin and ezetimibe. This study will also assess the use of electronic Informed Consent as a pilot project and the patient perception of use and acceptance of subcutaneous self-administration, in order to support clinicians in the daily use of this new drug (I-TAQ questionnaire).

Design. OMERO is a national, multicenter, observational study planned to include 800 patients, in 40 Italian sites, treated with alirocumab (Praluent®) on top of standard lipid lowering therapy and fully according to indications for reimbursement provided by the Agenzia Italiana del Farmaco (AIFA). Patients will be stratified by the type of hypercholesterolemia (familial or not familial) and on the basis of being in primary or secondary prevention, since it is related to the recommended LDL-C goals according to the EAS/ESC guideline 2016. In patients in secondary prevention, further stratification will be performed based on the date of the index event. The whole duration of the study is assumed to be approximately 5 years in order to ensure an adequate observation period (at least 2.5 years for all patients).

Conclusion. The OMERO study is expected to collect a huge clinical dataset of information on the use of alirocumab in daily clinical practice. Relevant insights on the use of long-term background therapies (statins, ezetimibe and other LLTs), related patients adherence and acceptance to PCSK9-i self-injection will be gathered. Moreover, the long-term follow-up will better clarify the journey in real life condition of hypercholesterolemic patients at high and very high CV risk.

MARKERS OF KIDNEY FUNCTION AND DAMAGE ARE NOT ASSOCIATED WITH LDL CHOLESTEROL BURDEN BUT WITH METABOLIC COMORBIDITIES IN ADULT PATIENTS WITH FAMILIAL HYPERCHOLESTEROLEMIA

A. Pontara, A. Cavicchioli, S. Lugari, G. Onfiani, A. Mondelli,
P. Vita, E. Zardi, E. Pellegrini, P. Andreone, F. Carubbi,
F. Nascimbene

*Internal and Metabolic Medicine, Civil Hospital, A.O.U. of Modena
and University of Modena and Reggio Emilia
E-mail: pontara.andrea@gmail.com*

Introduction and Aims. Familial hypercholesterolemia (FH) is associated with increased risk of atherosclerotic cardiovascular disease (ASCVD), mainly attributable to coronary artery disease (CAD), owing to life-long exposure to high LDL cholesterol (LDLc) levels. However, the risk of chronic kidney disease (CKD), that could be a manifestation of peripheral ASCVD, is largely unknown. We evaluated the prevalence of and the factors associated with decreased kidney function and kidney damage in adult FH patients.

Methods. 270 consecutive patients with clinical suspicion of FH within the LIPIGEN Project underwent comprehensive evaluation, including glomerular filtration rate estimation (eGFR) with the CKD-EPI equation (as a marker of kidney function). eGFR values lower than 90 or 60 ml/min/1.73 m² were considered as mildly or moderately decreased, respectively. In 180 patients urine albumin-to-creatinine ratio (ACR) was also measured (as a marker of kidney damage), and values higher than 30 mg/g were considered as moderately increased.

Results. Men and women were 132 and 138, respectively; median age was 49[18-91] years. Median untreated LDLc levels were 260[156-640] mg/dl. 15.6% of patients had a positive history of ASCVD and 79.6% were treated with statins. Among 244 patients with available genetic test, 73.8% were carriers of a "pathogenic" or "likely pathogenic" mutation in FH-causing genes. Median body mass index (BMI) was 25.1[16.6-44.1] kg/m² and the prevalence of treated arterial hypertension and type 2 diabetes mellitus was 23.3% and 3.0%, respectively. Median eGFR values were 98[27-146] ml/min/1.73 m². 81 patients (30%) presented at least a mild decrease in eGFR, but only 5 (1.9%) had at least a moderate decline in kidney function. eGFR values were significantly and negatively correlated with female sex, age (ρ :.685, p :<.001), BMI (ρ :.201, p :.001), waist circumference (ρ :.260, p :<.001), systolic (ρ :.214, p :<.001) and diastolic (ρ :.148, p :.016) blood pressure, triglycerides (ρ :.171, p :.005), glucose (ρ :.270, p :<.001) and HbA1c (ρ :.390, p :<.001) levels. Moreover, we found a significant correlation between eGFR and Lp(a) values (ρ :.177, p :.005). However, there were no associations between eGFR values and untreated LDLc levels, DLCN and statin therapy. Of note, FH mutation-negative patients had lower eGFR levels and higher age, metabolic comorbidities and Lp(a) values than FH mutation-positive patients. Median ACR values were 5[1-190] mg/g. 11 patients (6.1%) showed moderately increased ACR levels. ACR was significantly and positively associated with female sex, systolic blood pressure (ρ :.236, p :.001) and metabolic syndrome. We did not find any association between ACR and FH-related variables. We found significant and negative associations between eGFR, carotid intima-media thickness (ρ :.369, p :<.001) and prevalence of carotid artery plaques (p :<.001). Moreover, FH patients with a positive history of ASCVD had significantly lower eGFR values (p :.001) and a higher prevalence of moderately increased ACR (p :.048) than those without ASCVD.

Conclusions. Kidney function and damage, as assessed with eGFR and ACR, respectively, are normal or mildly altered in the majority of our cohort of adult FH patients, and are not associated with FH-related variables but with cardio-metabolic comorbidities. The pathophysiological mechanisms of CKD in FH may extend beyond LDLc burden.

OPTIMIZING THE START TIME OF STATIN THERAPY: LIPID PROFILE IN CHILDREN WITH TYPE 1 DIABETES MELLITUS

R. Pujia, E. Mazza, Y. Ferro, S. Maurotti, A. Pujia, T. Montalcini
University Magna Graecia, Catanzaro
 E-mail: roberta.puj@gmail.com

Background. Large bodies of evidence have shown a strong association between Type 1 diabetes mellitus (T1DM) and an adverse lipid profile. Furthermore, high levels of HbA1c in the untreated newly diagnosed children were associated with significantly higher serum triglycerides level in comparison with treated patients with good glycemic control. However, limited data are available on the difference in the lipid profile among children affected by T1DM according to gender and age categories, thus, this study aimed to evaluate these unexplored features in children with T1DM and assess the start time of statin therapy.

Materials and Methods. This study included 89 children (≤ 19 years of age) with T1DM who had referred to the outpatient clinics of several Hospitals in Calabria region (Castrovilliari, Cetraro, Cosenza, Crotone, Soveria Mannelli and Lamezia Terme) from November 2018 to March 2019. Based on gender, patients were divided into 2 groups and, then, according with age categories (5-9 ys; 10-14 ys; 15-19 ys), patients were divided into 3 groups. Mean lipid levels in the groups were compared with the reference values of the Italian child (Committee of Nutrition, Pediatrics 2008). We also assessed the atherogenic index of plasma (AIP) calculated as logarithm [log10] of the ratio of plasma concentration of TG to HDL-C. All patients had normal thyroid, renal and hepatic function.

Results. Mean age of the studied population was 14 ± 3 years and 45 (51%) were boys. Hypercholesterolemia was most common in female in the 15-19 years category (178.4 ± 35 ; +21 mg/dl). Furthermore, hypertriglyceridemia was found in the same group (88.9 ± 49 mg/dl; +24.9 mg/dl). In male, a mild hypercholesterolemia was found in the 15-19 years category (163 ± 33 ; +11 mg/dl). Glycemic control (serum glucose under replacement therapy) was associated with total cholesterol abnormality ($p=0.003$). Serum HbA1c was also associated with total cholesterol ($p=0.002$), while body weight did not associate with serum glucose.

Conclusion. A poor glycemic control is associated with hypercholesterolemia in young individuals with T1DM. Hypercholesterolemia was common 15-19 years category. These results need to be taken into account for planning preventative strategies for reducing T1DM-related cardiovascular disease in adolescents affecting with T1DM and in optimizing the start time of statin therapy.

CONTROL OF CARDIOVASCULAR RISK FACTORS IN A POPULATION OF HYPERTENSIVE PATIENTS ACCORDING TO EUROPEAN SOCIETY OF CARDIOLOGY/EUROPEAN ATHEROSCLEROSIS SOCIETY GUIDELINES

L. Ristori, F. Spannella, S. Buscarini, F. Giulietti, C. Di Pentima, S. Falzetti, R. Sarzani

Internal Medicine and Geriatrics, "Hypertension Excellence Centre" of the European Society of Hypertension, IRCCS INRCA, Ancona, Department of Clinical and Molecular Sciences, University "Politecnica delle Marche", Ancona
 E-mail: letizia.ristori@gmail.com

Aim. Prevalence and control of dyslipidemia, hypertension and diabetes mellitus in patients referred to our ESH "Hypertension Excellence Centre" for high blood pressure (BP) and evaluated by ambulatory blood pressure monitoring (ABPM).

Methods. Observational study on 1219 consecutive outpatients referred for high BP with valid ABPM. Low-density lipoprotein cholesterol (LDLc) targets and the cardiovascular risk stratification (SCORE) were defined according to 2016 and 2019 ESC/EAS Dyslipidemia Guidelines. Diabetics with glycated hemoglobin (HbA1c) $<7\%$ were considered controlled.

Results. Mean age: 56.5 ± 13.7 years. Male prevalence: 55.6%. Diabetics: 10.8%. Lipid lowering drugs were taken by 23.1% of patients. LDLc control according to 2019 ESC/EAS dyslipidemia guidelines are lower than observed with 2016 ESC/EAS Guidelines (19.2% vs 28.5%, $p<0.001$). The higher the cardiovascular (CV) risk, the lower was the prevalence of LDLc control ($p<0.001$). Only 19.2% of treated patients took high-intensity statins and only 25.9% within patients in secondary prevention. BP was controlled in 41.5% and only in 22.3% of high risk patients ($p<0.001$). Median Hb1Ac: 6.0% (5.6-7.0%) with 27.1% of uncontrolled patients. The prevalence of diabetics increased with CV risk, while their HbA1c control worsened (40.7% of uncontrolled in very high risk).

Conclusion. Cardiovascular risk factors, especially dyslipidemia and diabetes mellitus, are still often neglected in hypertensives, in particular in patients at higher CV risk. After the new lower LDLc targets proposed by the 2019 guidelines, physicians should pay further attention recommending statins at the right dosages and/or high-intensity statins, in order to control this important CV risk factor.

THE DIAGNOSTIC AND PROGNOSTIC IMPORTANCE OF THE ANKLE-BRACHIAL INDEX IN PRIMARY CARE: A PROSPECTIVE, SINGLE-CENTRE STUDY

A. Sacchetti¹, A. Sgro¹, M. Bottino¹, M.M. Coronelli²

¹University of Pavia, Department of Molecular Medicine, Pavia;

²Professor of Family Medicine and Geriatrics, University of Pavia, Department of Molecular Medicine, Pavia

E-mail: arianna.sacchetti01@universitadipavia.it

Introduction. Peripheral Arterial Disease (PAD) is a manifestation of systemic atherosclerosis that is common in the general population and that is associated with an increased risk of death and ischemic events. The Ankle-Brachial Index (ABI) is used for the diagnosis of lower extremity PAD. This study aims to propose a primary care PAD screening strategy in view of a subsequent implementation of risk modification strategies to minimise disease progression and reduce overall risk of cardiovascular mortality.

Methods. A prospective, single-centre study design was adopted. Participants were patients receiving care from a general practice between November 2018 and April 2019. Participants underwent ABI measurement, and their 10-year cardiovascular disease (CVD) risk was calculated using the American Heart Association ASCVD Risk Calculator. Measures of diagnostic accuracy of the ASCVD risk score for the detection of patients with a positive ABI were calculated. Sensitivity, specificity and accuracy were expressed as percentages.

Results. A total of 207 patients participated in the study. Among patients with a calculable 10-year CVD risk (n=181) PAD prevalence was 21% (n=38). The sensitivity, specificity and diagnostic accuracy rates for a positive ABI of a borderline or higher 10-year ASCVD risk were respectively 92.1%, 38.5% and 49.7%. For an intermediate or higher 10-year ASCVD risk, the sensitivity, specificity and diagnostic accuracy rates were respectively 89.5%, 48.3% and 56.9%. For high 10-year ASCVD risk patients only, the sensitivity, specificity and diagnostic accuracy rates for a positive ABI were respectively 60.5%, 72.7%, 70.2%.

Conclusion. Our study suggests that ABI measurement can detect asymptomatic PAD among primary care patients not already known to have atherosclerotic cardiovascular disease. To identify those patients who would mostly benefit from having their ABI measured, we recommend screening patients that have an intermediate or high 10-year ASCVD risk, as this cut-off minimises the number of false negatives.

POSITIVE EFFECTS OF MEDITERRANEAN DIET ON ANTHROPOMETRIC, METABOLIC PARAMETERS, AND INFLAMMATORY STATE

J.M. Sanz¹, A. D'Amuri¹, G. Lo Coco¹, E. Capatti², E. Dalla Nora², G. Zuliani¹

¹Department of Morphology, Surgery and Experimental Medicine, University of Ferrara; ²Department of Medicine, Azienda Ospedaliera Universitaria di Ferrara

E-mail: szj@unife.it

Introduction. The Mediterranean diet is a nutritional model that endorse foods of plant origin (fruits, vegetables, olive oil) while limiting the consumption of red meat and sweets. Fruits and vegetable foods are characterized by a high content of antioxidants and anti-inflammatory compounds and can play an important role in the prevention of cardio-metabolic diseases, neurodegenerative disorders, some types of cancer and improvement of psycho-physical conditions. Aim. To evaluate the correlation between adherence to the Mediterranean diet (Mediterranean Diet score - MDS) and anthropometric and biochemical parameters in a group of elderly people.

Methods. Participants (456, age 54-81 years) agreed to anthropometric measurements, blood sampling collection and filled out a questionnaire to evaluate the frequency of intake of 90 foods or food groups. Based on habits and its importance in the food pyramid, a score (0, 1 or 2) was assigned to 13 macro categories: olive oil; vegetables; fresh fruit; dried fruit; cereals, bread and pasta; legumes; milk and dairy products; fish; eggs; white meat; red meat and processed meat; wine and sweets. Finally, MDS is obtained from the sum of the 13 macro categories.

Results. Statistical analysis showed a negative correlation between MDS and some parameters such as: BMI (-0.098; p=0.036), fat mass (-0.104; p=0.027), triglycerides (-0.083; p=0.082), insulin (-0.110; p=0.022), HOMA-IR (-0.103; p=0.032) and interleukin-18 (-0.114; p=0.016). Instead, a positive correlation is observed with HDL (0.109; p=0.022) and vitamin D (0.296; p=0.002).

Conclusions. Mediterranean diet adherence is associated with higher Vitamin D levels, a better metabolic profile, insulin sensitivity and a lower inflammatory state, reducing the risk of the onset of type 2 diabetes and other chronic diseases.

ACUTE EFFECT OF LIPOPROTEIN APHERESIS ON CORONARY FLOW VELOCITY RESERVE EVALUATED BY THE COLD PRESSURE TEST

F. Sbrana, E. Pasanisi, B. Dal Pino, F. Bigazzi, A. Ripoli, T. Sampietro
Fondazione Toscana "Gabriele Monasterio", Pisa
 E-mail: francesco.sbrana@ftgm.it

Background. Familial Hypercholesterolemia (FH), the major coronary risk factor, is in turn the best clinical model to study endothelial dysfunction with special attention to the regulation of vascular endothelium dependent tone. In FH high plasma cholesterol per se may be a sufficient stimulus to upregulate endothelial adhesiveness, phenomenon that can be acutely "restored", by Lipoprotein Apheresis (LA).

Methods. The Cold Pressor Test (CPT) is a validated test, which induces systemic stress involving immersion of an individual's hand in ice water (normally temperature between 0-5 °C for a period of 4 minutes), is used to measure cardiac microvascular function because modifies vascular tone and increased blood flow in the epicardial coronary arteries via sympathetic activation mainly through endothelial release of nitroxide in normal endothelium. The aim of the present work is to evaluate the behavior of coronary flow velocity reserve (CFR) during sympathetic stimulus induced by CPT before and after LA.

Results. We enrolled 12 patients (mean age 57±6 years, male 75%) with FH and ischemic heart disease on maximally tolerated lipid lowering therapy and chronic LA (median inter-apheresis interval of 14 [10-16] days). No relevant comorbidity was present in any patient. CPT was performed immediately before and within 48 hours to LA procedure. CFR showed a significant increase (from 1.34±0.22 to 1.59±0.33; p<0.05) after LA treatment. No adverse event was reported during the test.

Conclusion. This study, as performed in a small number of patients, show that a single LA procedure can increase a CFR measured by CPT. This diagnostic exam stands as a non-invasive, cheapest method that mimic a physiological effect, like cold exposure, is validated test to measure cardiac microvascular function. Have more methods to measure CFR has importance because myocardial blood flow should represent the ultimate target of any lipid lowering therapy.

EVOLOCUMAB IMPROVES INTIMA MEDIA THICKNESS REGRESSION IN HEFH SUBJECTS ON LIPOPROTEIN APHERESIS

F. Sbrana, B. Dal Pino, A. Monteleone, E. Pasanisi, C. Petersen, A. Ripoli, F. Bigazzi, T. Sampietro
Fondazione Toscana "Gabriele Monasterio", Pisa
 E-mail: francesco.sbrana@ftgm.it

Background. The long-term effects of lipoprotein apheresis (LA) on carotid atherosclerosis in Heterozygous Familial Hypercholesterolemia (HeFH) are well known since 1999. The aim of the study was to verify if evolocumab, added to LA, improve intima media thickness regression respect to LA alone.

Methods. We retrospectively evaluated 14 HeFH patients (mean age 61±8 years, 12 male) enrolled in the TAUSSIG trial [NCT01624142] with known cardiovascular disease and on chronic LA. The TAUSSIG study was conducted in subjects affected by Heterozygous Familial hypercholesterolemia (HeFH); its aim was to assess the effects of long-term use of PCSK9 inhibition. During the 42 months of the TAUSSIG trial, evolocumab 420 mg was administered every 14 days at the end of each apheresis procedure in addition to conventional medical therapy. LA procedures performed in agreement to manufacturer's instructions, with a median inter-apheresis interval of 14 [10-16] days.

Results. During the study period a cumulative LDL-C reduction of -51% was reported and 7/14 patients discontinued LA because they were able to maintain LDL-C level below 70 mg/dl. During the chronic LA, the carotid intima-media thickness (IMT) variation rate resulted to be -0.72 [-1.43-0] x 10-3 mm/month in absence of relevant changes in the echogenicity and size of the coexisting atherosomatous plaques. After evolocumab addition a significant decrease in IMT variation rate was recorded (-3.90 [-5.30-2.68] x 10-3 mm/month; p<0.0001). All patients had carotid plaque with <50% of diameter reduction which stable throughout the study period.

Conclusion. This study, although in a small number of patients, confirms that chronic LA procedure reduces IMT and that the association of LA and evolocumab further improves the beneficial effect on the atherosclerotic regression process, possibly acting on the common pathogenetic mechanisms underlying the carotid stiffness.

FTO RS9939609 VARIANT MAY PREDICT THE METABOLIC RISK IN OBESE SUBJECTS

C. Scrimali, R. Spina, V. Ingrassia, F. Brucato, M. Gueli Alletti, A.B. Cefalù, G. Misiano, G.I. Altieri, D. Noto, A. Giannanco, C.M. Barbagallo, A. Ganci, F. Fayer, M.R. Averna

Department of Health Promotion, Mother and Child Care, Internal Medicine and Medical Specialties (PROMISE), University of Palermo

E-mail: chiara.scrimali@libero.it

Introduction. Obesity, characterized by an abnormal or excessive fat accumulation, represents a risk for health worldwide. Life-style, especially in the western countries, and genetic factors are mainly involved in the etiology of obesity. Recently, Genome-Wide-Association-Studies (GWAS) have analyzed the genes associated to obesity and, among these, FTO (Fat mass and Obesity-associated) gene and its rs9939609 variant has been associated to BMI increase and the risk to develop type 2 mellitus diabetes (DM2) and metabolic syndrome.

Materials and Methods. The aim of this study was to evaluate the clinical and biochemical features, the metabolic risk of a cohort of 81 severe obese subjects ($BMI > 27 \text{ kg/m}^2$) and the correlation between these parameters and the effects of the FTO allelic variant SNP rs9939609. Anthropometric measures, clinical and biochemical parameters were evaluated. A total of 90 non-obese subjects from the "Ventimiglia di Sicilia Epidemiological Project" with a $BMI < 27 \text{ kg/m}^2$ were selected as controls.

Results. Obese subjects have shown a significant increase of anthropometric parameters (BMI and waist circumference), insulin-resistance (HOMA-IR index) and metabolic risk compared to controls; moreover the genotype A/A of the FTO SNP rs9939609 variant was strongly correlated to the BMI and waist circumference increase in both genders. We have confirmed a correlation between the anthropometric parameters (BMI and waist circumference), the metabolic state (insulin-resistance status) and the genetic FTO profile in our cohort of subjects. The genotype A/A of the FTO rs9939609 variant A/A is significantly associated to a metabolic risk increase in severe obese patients in both genders.

ENDOGENOUS PCSK9 MAY INFLUENCE CIRCULATING CD45NEG/CD34BRIGHT AND CD45NEG/CD34BRIGHT/CD146NEG CELLS IN PATIENTS WITH TYPE 2 DIABETES MELLITUS

P.G.M. Simeone¹, R. Tripaldi¹, P. Lanuti¹, R. Liani¹, G. Bologna¹, S. Ciotti¹, P. Simeone¹, M. Marchisio¹, A. Di Castelnuovo², M. Bucci¹, F. Cipollone¹, F. Santilli¹

¹*Department of Medicine and Aging, and Center for Advanced Studies and Technology (CAST), Chieti, ²Mediterranea Cardiocentro, Napoli*

E-mail: paolagsimeone@gmail.com

To evaluate whether the effect of protease proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) on vascular homeostasis may be mediated by in vivo circulating endothelial progenitor cells (EPCs) in patients with or without type 2 diabetes mellitus (T2DM). Eighty-two patients (45 with, 37 without T2DM) at high cardiovascular risk were enrolled in this observational study. Plasma PCSK9 was measured by ELISA and EPCs with phenotype CD45neg/CD34bright and CD34bright/CD146neg were analyzed by a standardized flow cytometry method. Statin treatment was associated with higher circulating levels of PCSK9 in patients with and without T2DM ($p<0.001$ and $p=0.036$) and with reduced CD45neg/CD34bright ($p=0.016$) and CD45neg/CD34bright/CD146neg ($p=0.040$) only among patients with T2DM. PCSK9 correlated inversely with both CD45neg/CD34bright ($p=0.006$) and CD45neg/CD34bright/CD146neg ($p=0.002$) only in patients with T2DM. Dividing patients according to statin treatment, PCSK9 correlated inversely with CD45neg/CD34bright ($p=0.022$) and CD45neg/CD34bright/CD146neg ($p=0.004$) only in patients with diabetes on statin treatment. In high-risk T2DM patients, high endogenous levels of PCSK9 may have a detrimental effect on EPCs by reducing the endothelial repair and worsening the progression of atherosclerosis.

FAMILIAL MEDITERRANEAN FEVER AND EARLY CARDIOVASCULAR DAMAGE: A PRELIMINARY DATA

D. Sinicropi, M. Cinquegrani, F. Savarino, M. Scuruchi, G. Squadrito, A. Saitta, G. Mandruffino
Internal Medicine, A.O.U. G. Martino, University of Messina
 E-mail: sinicropidavide@gmail.com

Aims. Familial Mediterranean fever (FMF) is the most common monogenic periodic fever syndrome, characterized by recurrent episodes of fever, serositis, arthritis, dermal manifestations, and long-term renal complications. The MEFV gene responsible of FMF encodes for mutated protein pyrin, an important player in the innate immune system and the component of inflammasome which leads to exaggerated inflammatory response through uncontrolled production of interleukin-1. Inflammatory diseases are known to be associated with increased cardiovascular risk. Few studies have investigated the association between FMF and cardiovascular disease. To evaluate early cardiovascular damage in subjects suffering from FMF on the basis of the estimate of the Pulse Wave Velocity, the cIMT, liver stiffness, the biohumoral indices and the circulating hematopoietic cells.

Results. Preliminary data from patients with FMF were compared to normal values and divided according to age strata: ≤20 (PWV 5.94 vs 6.1 m/s, cIMT 0.47 vs 0.44 mm, liver stiffness 3.8 vs 4.7 kPa), 20-50 (PWV 7.5 vs 7 m/s; cIMT 0.62 vs 0.55 mm; liver stiffness 7.8 vs 3.9 kPa, p<0.001), 50-70 (PWV 10.7 vs 8.8 m/s, cIMT 1.1 vs 0.85 mm, liver stiffness 7.8 vs 3.9 kPa, all p<0.001)

Conclusions. In this explorative study, we found that FMF patients could present higher risk to develop cardiovascular/cardio-metabolic disease; in fact, they presented with a time-dependent acceleration of vascular - and also liver - involvement, as suggested by the increased cIMT and PWV values in the highest age stratum (50-70) with respect to controls; moreover, we found a significant increase of liver stiffness values, likely as consequence of chronic inflammatory status (the link between serum amyloid A precursor levels in FMF subjects and liver fibrosis should be deepened). These data need to be replicated on larger scale.

ENDOTHELIAL DYSFUNCTION, THROMBIN GENERATION AND FIBRINOLYSIS IN COVID-19 PATIENTS

E. Sticchi¹, A.M. Gori¹, B. Giusti¹, A. Kura¹, R. De Cario¹, B. Bandinelli¹, A. Rogolino², D. Poli², L. Mannini², S. Suraci¹, E. Lotti², R. Marcucci³

¹*University of Florence, Department of Experimental and Clinical Medicine, Florence;* ²*AOU Careggi, Atherothrombotic Diseases Center, Florence;* ³*University of Florence, Department of Experimental and Clinical Medicine and AOU Careggi Covid Group, Florence*

E-mail: elenasticchi@hotmail.com

Background. In patients affected by COVID-19, an hyper-inflammatory state and a coagulopathy have been documented. Aim of our study was to evaluate the role of thrombin generation, fibrinolytic alterations and endothelial dysfunction in 115 consecutive COVID-19 patients [67M/48F; median age 78(range 62-85)].

Methods. 115 patients with confirmed Sars-CoV-2 infection, admitted to Careggi Hospital, from March 2nd to April 7th 2020 were enrolled. The clinical outcomes were monitored up to April 7th 2020 (median follow-up:11 days[interquartile range[IQR]:7-14]).

Results. Sixteen of 115 patients died (13.9%). Dead patients had a higher median age [81(70-89)] with respect to alive patients [76(60-85)]. Seventy-two patients have been discharged (62.6%). Twenty-seven patients (23.5%) have been transferred to an ICU. Non-survivors had significantly (p<0.01) higher Von Willebrand Factor (VW) antigen [389(314-629%)] and D-Dimer [1609(860-4584)ng/ml] plasma levels than survivors [VW: 274(154-352%); D-dimer 932(487-1805)]. VW antigen levels significantly and positively correlated with C Reactive Protein (CRP) levels ($r=0.39, p=0.002$) and White Blood Count ($r=0.30, p=0.015$). D-dimer plasma levels significantly correlated with CRP ($r=0.20, p=0.033$) and lymphocyte count ($r=-0.30, p=0.001$). ETP values were significantly lower (p<0.05) in dead patients with respect to those observed in survivors [931(360-1115) vs 1218(755-1500)]. Lag time, time to peak, peak and ETP ratio (ETP with thrombomodulin/ETP without thrombomodulin) values did not significantly differ between nonsurvivors and survivors. CLT values did not differ between survivors and nonsurvivors [83(76-91) min vs 82(77-86) min] as well as the percentage of patients with CLT above the normal range (82 min) [9/16(56%) in dead patients vs 39/72(54%) alive patients].

Conclusions. Our data demonstrate that in COVID patients an endothelial dysfunction, associated with a marked pro-inflammatory state, is present in COVID patients. Moreover, in dead patients endogenous thrombin potential was significantly reduced, suggesting the presence of a consumption coagulopathy. The coexistence of an endothelial dysfunction and a hypocoagulability is associated with a poor prognosis.

INSIGHT INTO FAMILIAL HYPERCHOLESTEROLEMIA GENETIC DETERMINANTS BEYOND LDLR LOCUS

E. Sticchi¹, A. Kura², A. Volta², R. De Cario², A. Magi³, S. Suraci², A.M. Gori¹, R. Marcucci¹, B. Giusti¹

¹University of Florence, Department of Experimental and Clinical Medicine, Atherothrombotic Diseases Center, Careggi Hospital, Florence; ²University of Florence, Department of Experimental and Clinical Medicine, Florence; ³University of Florence, Department of Information Engineering, Florence
E-mail: elenasticchi@hotmail.com

Background. As many subjects (about 60%) with Familial Hypercholesterolemia (FH) did not demonstrate functional mutations in FH major candidate genes (LDLR, APOB, PCSK9 and LDLRAP1), we assessed FH patients genetic profile through targeted high-throughput sequencing (HTS).

Methods. We analyzed 38 subjects with possible/probable or definite FH, according to the most common diagnostic algorithm, the Dutch lipid score. Targeted HTS (57 genes panel, including loci involved in lipid metabolism, genes supposed to be involved in dyslipidemia, pharmacogenetics of statins, genes related to higher susceptibility for FH polygenic forms, HDL and triglycerides related diseases) through Illumina MiSeq technology was performed.

Results. Thirteen out of 38 patients investigated showed pathogenic/likely pathogenetic mutations in LDLR gene. Three out of 13 LDLR mutation-positive patients also carried likely pathogenetic/uncertain significance mutations in APOB and LDLRAP1 genes. In patients without LDLR mutations (n=25), at least 2 rare variants were identified in 16 patients (64%), and at least 3 rare variants were identified in 9 patients (36%). In these patients, a total of 58 rare variants in other genes beyond LDLR, known to be involved in FH, hypertriglyceridemia, other forms of familial dyslipidemia, polygenic FH or pharmacogenetics (APOB, CELSR2, GHR, ABCG5, LMF1, SLC22A1, GCKR, CREB3L3, ABCB1, LRP1, APOA4, ITIH4, PON1, LIPC, SCARB1, PCSK9, DAB2, PPP1R17, SREBF1/2, HFE, LCAT, LPL, ABCG2, NYNRIN, SLC01B1, LIPI) were observed. Patients with or without pathogenetic mutations in LDLR gene were comparable for age, sex, and LDL cholesterol levels, whereas Dutch score was significantly higher in LDLR mutation positive patients.

Conclusions. Results from the present study suggest the possible effect of multiple rare variants on the clinical phenotype, thus supporting the contribution of a polygenic predisposition to lipid profile alteration. Conversely, even if significant, our preliminary data support a less severe weight of cardiovascular manifestations and family history in patients with polygenic forms of FH.

RECOMBINANT LCAT (LECITHIN:CHOLESTEROL ACYLTRANSFERASE) PARTIALLY RESTORES THE ALTERED HDL-MEDIATED CARDIOPROTECTION IN ACUTE CORONARY SYNDROME

A. Strazzella¹, A. Ossoli¹, N. Morici², M. Turri¹, S. D'Elia², M. Palazzini², F. Oliva², S.K. Karathanasis³, L. Calabresi¹

¹Centro E. Grossi Paoletti, Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli studi di Milano; ²Cardiologia 1, Emodynamic, ASST Grande Ospedale Metropolitano Niguarda, Milan; ³Cardiovascular and Metabolic Diseases, MedImmune, Gaithersburg, MD
E-mail: arianna.strazzella@unimi.it

Background. Low plasma HDL-C is associated with unfavorable prognosis in patients with acute coronary syndrome (ACS). After an acute myocardial infarction, an early reperfusion is the most effective strategy for improving the clinical outcome; however, the restoration of blood flow can induce injury. HDL are able to preserve cardiac function when given before ischemia or at reperfusion by acting on cardiomyocytes. During ACS, HDL lose their protective proprieties, like the ability to stimulate endothelial nitric oxide (NO) release, because of an altered composition due to a reduction in LCAT concentration/activity.

Aim. To evaluate if the incubation with recombinant LCAT restores the HDL-mediated cardioprotection during ACS.

Methods. 20 STEMI patients were enrolled by Intensive Cardiac Care Unit of Niguarda Hospital and blood samples were collected at hospital admission and 72 hours after the event. LCAT concentration and activity, and cholesterol esterification rate (CER) were analyzed. HDL were purified by ultracentrifugation after incubation of patients' plasma with or without recombinant LCAT and used to incubate rat cardiomyoblast cells (H9c2) in a hypoxia/re-oxygenation model. ROS production, apoptosis and cell viability were evaluated by standardized methods.

Results. LCAT concentration and activity and CER were reduced in ACS patients at 72 hours from the event (-22%, p=0.011; -15%, p=0.015; -33%, p<0.01 vs admission, respectively). HDL isolated after incubation of plasma with rhLCAT showed a significantly reduced ROS production stimulation (p=0.023) at 72 hours and a decreased apoptosis induction at admission (p<0.01) compared to untreated HDL. No effect of rhLCAT was observed on HDL capacity to influence cell viability.

Conclusions. The impairment of the cholesterol esterification system during ACS at least partially explains the loss of cardiac anti-oxidant and cytoprotective activities of HDL. rhLCAT can partially restore HDL functionality, making LCAT a new target in ACS.

GLYCOPROTEIN ER-CHAPERONS SURVEILLANCE CHANGES DURING ATHEROGENESIS

M. Svecla¹, P. Uboldi¹, F. Bonacina¹, A.L. Catapano¹, G. Beretta², G.D. Norata¹

¹Department of Pharmacological and Biomolecular Sciences, University of Milan; ²Department of Environmental Science and Policy ESP, University of Milan

E-mail: monika.svecla@unimi.it

Background. Protein glycosylation is a post-translation modification consisting on the enzymatic attachment of glycans that are covalently attached to a nascent polypeptide chain. It starts in endoplasmic reticulum (ER) where 14 glycans are transferred as "en block" to a lipid linked anchor in a polypeptide chain. This is followed by enzymatic trimming of glucosidase I and II that can hydrolyze two molecules of glucose. This process allows a proper glycan configuration that is recognized by ER chaperons calnexin and calreticulin which are known to assist in quality control and protein folding. Only corrected glycoproteins with eight- or nine-glycans are exported in Golgi while uncorrected glycoproteins are retained in ER to complete the folding or they are targeted for degradation. Any disruption in glycosylation affects protein folding and can lead to unfolded protein response (UPR) and ER stress. Aim of this work was to investigate changes in N-glycosylation maturation of proteins during atherosclerotic plaque development in animal models.

Methods. Shotgun proteomics was performed in aorta from LDL-R KO mice, fed in chow or WTD diet, using orbitrap Fusion™ Tribrid™ Mass Spectrometer followed by protein inference, label free quantification. Total RNA was reverse transcribed into cDNA and gene expression analysis by qRT-PCR was performed.

Results. Cholesterol (Chol) and triglycerides (TG) plasma levels were 211.64 ± 24.85 mg/dl and TG 126.76 ± 0.92 mg/dl on chow diet and increased to 518.9 ± 53.41 mg/dl and TG 266.16 ± 56.86 mg/dl on WTD respectively. Following shotgun proteomics, from 1134 proteins identified, 1102 were quantified and matched for biological enrichment pathways where fatty acid metabolism ($\text{z-score}=3.18$). The second activated pathway was metabolism of proteins ($\text{z-score}=1.48$) where the unfolded protein response was significantly activated followed by activation of "conformational modification of proteins" pathway. Within the unfolded proteins response pathway observed on WTD mice, several enzymes were associated with the modulation in glycosylation of mice. Firstly, riphophorin unit that transfer the glycans in lipid anchored oligosaccharide was significantly upregulated, (an index of glycan assembly in ER); secondly glucosidase enzymes that tries to make a proper conformation of glycoproteins were significantly up-regulated (Ganab, p-value=0.03). In line with this we observed the up-regulation of chaperons such as calnexin, calreticulin and GRP78 (p-value=0.01) both at the mRNA and at the protein level. In addition, we have observed a significant increase in VCP which is known to participate to protein degradation through ERAD pathways. Moreover, the abundance and side-specific N-glycosylation of integrin β -1, laminin subunit γ -1, integrin α -8 were reduced in the plaque of WTD fed mice.

Conclusion. Our data suggest that in aorta of LDL-R KO mice, fed in WTD there is an increased glycan assembly in ER and the up-regulation of glycoprotein chaperon expression, probably to compensate an uncorrected folding of glycoproteins. This is paralleled by N-glycosylation proteins reduction in the plaque of WTD fed mice.

USE OF VOLANESORSEN IN A PATIENT WITH FAMILIAL CHYLOMICRONEMIA SYNDROME (FCS)

C. Trenti¹, E.A. Negri¹, E. Bonelli², T. Fasano²

¹Dip. Internistico, Alta Intensità medica, AUSL-IRCCS Reggio Emilia; ²Laboratorio Analisi Chimico-Cliniche e di Endocrinologia, AUSL-IRCCS Reggio Emilia

E-mail: chiara.trenti@ausl.re.it

Introduction. Familial chylomicronemia syndrome (FCS) is a rare recessive monogenic disorder (1:2:1.000.000) characterized by reduced or absent lipoprotein lipase (LPL) activity due to homozygous or compound heterozygous mutations in LPL gene and/or in its modulators. LPL catalyzes the hydrolysis of TG-rich lipoprotein and its functional impairment leads to persistence of circulating chylomicrons resulting in severe hypertriglyceridemia. Patients with FCS have a high risk of severe recurrent acute pancreatitis, a potentially life-threatening condition. Volanesorsen is a second-generation antisense oligonucleotide inhibiting transcription/translation of the LPL-inhibitor apoC-III. We evaluated the efficacy and safety of Volanesorsen in a patient with FCS.

Materials and Methods. A 56-year-old female with an homozygous mutation of the LPL gene and severe defect in the enzyme activity was followed up in our lipid clinic. From the age of 20, she has had plasma triglyceride levels consistently higher than 2000 mg/dl despite adequate dietary therapy and drug therapy with fibrate and omega 3 fatty acids. She performed therapeutic apheresis for a year, suspended for symptomatic anemia. In her clinical history one episode of acute edematous pancreatitis was described. Since January 2019 therapy with Volanesorsen was started (285 mg/week and after 3 months 285 mg every two weeks).

Results. The treatment resulted in a 95% reduction in triglyceride levels (from 2400 mg/dl to 129 mg/dl after two months of weekly Volanesorsen administration, with stabilization at levels of 500-700 mg/dl after switching to biweekly injections. The platelet count was monitored every two weeks and was never below 130x109 per liter. Treatment tolerability was good, only mild fever responsive to paracetamol occurred shortly after the first two administrations.

Conclusions. Volanesorsen therapy in a patient with FCS has been shown to be effective in significantly reducing triglyceride levels below the risk threshold for acute pancreatitis without causing significant side effects.

DIETARY RECOMMENDATIONS: THE FIRST STEP FOR MANAGEMENT OF CHILDREN WITH HYPERCHOLESTEROLEMIA

C. Viggiano, R. Romano, E. Verduci, G. Banderali, C. Pederiva
Clinica Pediatrica, Ospedale San Paolo, ASST, Santi Paolo e Carlo, Università degli Studi di Milano
E-mail: claudiaviggiano79@gmail.com

Background and Aims. Cardiovascular diseases represent the most important cause of mortality. Primary prevention of atherosclerosis must be implemented as early as possible through the promotion of a healthy lifestyle. We aimed to assess if a qualitative nutritional intervention can improve the eating behaviours and the lipid profile of children with primary hypercholesterolemia, in follow-up in our Lipid Clinic.

Methods. We examined 86 children (43M, 43F, average age of 8.4 years) with severe hypercholesterolemia, mainly (74%) normal weight, 73% with genetically-confirmed Familiar Hypercholesterolemia. At baseline we evaluated complete lipid profile (after 12 hour fasting) and eating habits using food frequency questionnaire. No child had previously received dietary counselling, vitamin supplementation or drug therapy. We gave the following dietary recommendations, based on Mediterranean diet: low fat content (<30%, saturated <7%), carbohydrates (45-60%), proteins (14%); 4 main meals plus 1 snack, dividing the calories into: 20% for breakfast and snack, 40% for lunch, 10% for snack, 30% for dinner.

Results. At baseline, mg/dl CT 293, LDL-C 227, triglycerides 82, non-HDL 242, HDL-C 52, vitB12 660 pg/ml, folic acid 7 ng/ml, vitD 23 ng/dl (deficient). Weekly frequencies were: fruits and vegetables 13.9, blue fish 1.7, whole grains 1.6, legumes 1.5, low-fat cheeses 3.3, junk food 9.7, cold cuts 2.9, meat 4.7, egg 0.5. After 6 months of dietary individualized recommendations, weekly frequencies were: fruits and vegetables 21.5 (+54.8%), blue fish 2.4 (+38.7%), whole grains 3 (+85%), legumes 1.9, (+20.1%), low-fat cheeses 1.6 (-53%), junk food 4.9 (-49.7%), cold cuts 1.8 (-39.2%), meat 3.8 (-18.8%), egg 0.8 (+52.1%). The lipid profile was mg/dl CT 287 (-2.1%), LDL-C 219 (-3.3%), triglycerides 78 (-4.1%), non-HDL 234 (-3.3%), HDL-C 53 (+3.7%).

Conclusion. The dietary counselling is safe and well applicable and it has improved the diet and the lipid profile of our patients. This is the first step for management of children with hypercholesterolemia. The long-term goal is to establish the nutritional quality and pattern of food consumption by children and their families.

THE ADAPTATION OF LIPID PROFILE OF HUMAN FIBROBLASTS TO ALGINATE 2D FILMS AND 3D PRINTED SCAFFOLDS

I. Zanotti, S. Marando, G. Remaggi, C. Bergonzi, F. Bernini, R. Bettini, L. Elviri
Dipartimento di Scienze degli Alimenti e del Farmaco, Università di Parma
E-mail: ilaria.zanotti@unipr.it

Background. The development of innovative active materials is currently widely studied in several research and application fields. Here, a targeted lipidomic approach has been used to explore the early impact of alginate (ALG) hydrogel architecture (2D films or 3D printed scaffolds) and the type of gelling agent (CaCl₂ or FeCl₃) on the lipid profile of human fibroblasts.

Methods. 2D and 3D ALG scaffolds were characterized in terms of mechanical resistance and morphology through scanning electron microscope analysis before seeding human skin fibroblasts for 8 days. Using a liquid chromatography-triple quadrupole-tandem mass spectrometry approach, selected ceramides (CER), lysophosphatidylcholines (LPC), lysophosphatidic acids (LPA) and free fatty acids (FFA) were analyzed.

Results. The highly abundant CER d18:1-16:0 is more expressed on 2D ALG gelled with CaCl₂ vs 2D ALG gelled with FeCl₃ and vs 3D ALG gelled with CaCl₂. Conversely, CER d18:1-22:0 present an opposite trend. The short chain ceramides (CER d18:1-16:1, CER d18:1-20:0) present higher expression on the 2D films gelled with CaCl₂ compared to 3D ALG gelled with CaCl₂, while the opposite occurs for long chain ceramides (CER d18:1-22:2, CER d18:1-22:5). LPC, FFA and LPA relative trends are more maintained during cell culture on biomaterial and only minor differences are observed as a function of scaffold geometry or gelling agent.

Conclusions. These data suggest that CER are significantly affected by both the structure of the scaffolds and the gelling agents employed, whereas LPC, FFA and LPA are not susceptible of significant influence neither from the geometry nor from the gelling agent we selected. These data allow to extend the knowledge of the behavior of selected lipids in cell-biomaterial interactions.

INDICE DEGLI AUTORI

A

Accattatis F.M., 1
 Adorni M.P., 1, 5, 30, 36
 Agnelli G., 38
 Agolini E., 10
 Alberti A., 37
 Allegra M., 6
 Altieri G.I., 8, 19, 23, 25, 43
 Andreone, P., 13, 28, 39
 Angelico F., 3, 4, 9, 14, 22, 37
 Angius A., 2
 Arba F., 26, 27
 Arca M., 6, 12, 35, 38
 Arnaboldi L., 1
 Audano M., 16
 Averna M.R., 8, 19, 22, 23, 25, 35, 43
 Avogaro A., 33

B

Baldelli, E., 5
 Banderali, G., 47
 Bandinelli, B., 26, 44
 Baragetti A., 2, 12, 16, 29, 31
 Barale C., 3, 12
 Baratta F., 3, 4, 9, 14, 32, 37
 Barbagallo C.M., 8, 19, 23, 25, 43
 Barbaras R., 35
 Barillà F., 34
 Bartimoccia S., 3, 34
 Bartuli A., 10
 Bedin R., 5
 Bellini R., 4
 Bellosta S., 17
 Beretta G., 7, 46
 Beretta S., 7
 Bergonzi C., 47
 Bernini F., 1, 30, 36, 47
 Bertolini S., 7
 Bertolotti M., 5
 Bettini R., 47
 Bianco F., 9, 14
 Bigazzi F., 5, 17, 42
 Bini S., 6
 Biolo M., 2
 Boccatonda A., 6, 14
 Bollati V., 24
 Bologna G., 43

Bonacina F., 4, 7, 33, 34, 46
 Bonelli E., 7, 46
 Bonino E., 9
 Bonomo K., 3, 38
 Boragina G., 31
 Borghi C., 13, 14, 22
 Boscutti G., 38
 Bottino M., 41
 Bove M., 14
 Brambilla P., 17
 Brucato F., 8, 19, 23, 25, 43
 Bruno N., 34
 Bucci M., 6, 8, 9, 14
 Bucciarelli B., 9, 14
 Buganza R., 9, 30
 Buonaiuto A., 10, 11
 Buonuomo P.S., 10
 Buscarini, S., 40
 Busnelli M., 15
 Busti F., 8

C

Cabibi D., 23
 Calabresi L., 35, 37, 38, 45
 Calabria D., 20
 Calabò P., 38
 Calcaterra I., 10, 11
 Calcaterra I.A., 11
 Caliceti C., 20
 Camastra S., 6
 Camera M., 29
 Cammisotto V., 3, 12, 34
 Canclini L., 12
 Caniglia D., 6
 Canovi S., 7
 Cantone L., 24
 Capatti E., 41
 Capra M.E., 22
 Cardiero G., 36
 Caredda G., 2
 Caridero G., 22
 Carnevale R., 3, 12, 34
 Carubbi F., 2, 13, 22, 28, 38, 39
 Caruso D., 2
 Caruso M., 19
 Castiglioni L., 16
 Castiglioni S., 17

Casula M., 2, 15, 22, 35
 Catapano A.L., 2, 4, 7, 12, 15, 16, 21, 22, 31, 34, 35, 38, 46
 Cavalot F., 3
 Cavicchioli A., 2, 13, 28, 39
 Cefalo C., 32
 Cefalù A.B., 8, 23, 25, 43
 Chiari A., 5
 Chiesa G., 15
 Cibella J., 2
 Cicero A., 8
 Cicero A.F.G., 13, 14, 20
 Cinquegrani M., 16, 21, 44
 Cinti F., 32
 Ciotti S., 43
 Cipollone F., 6, 9, 14
 Cocciadiferro, D., 10
 Cocco G., 6
 Cocomello, N., 9, 14
 Coe D., 7
 Colaiori I., 7
 Colombo A., 15
 Colpani O., 15
 Conca Dioguardi C., 2
 Consolandi C., 2
 Consoli A., 26, 27
 Coronelli M.M., 41
 Corsini A., 1, 5, 17, 24
 Costantino D., 16
 Cremonesi M., 34

D

D'Addato S., 14
 D'Amuri A., 41
 D'Ardes D., 6, 9, 14
 D'Elia S., 45
 D'Erasmo L., 4, 6, 12, 38
 Da Dalt L., 16
 Dal Pino B., 5, 17, 42
 Dall'Agata M., 2
 Dalla Nora, E., 27, 41
 Damiani, I., 17
 Dasseux J.-L., 35
 De Cario R., 18, 26, 27, 44, 45
 de Sanctis L., 9, 30
 Del Ben M., 3, 4, 9, 14, 32, 37
 den Heijer M., 1

- Di Minno A., 10
 Di Minno M.N.D., 10, 11
 Di Pentima C., 40
 Di Rocco A., 4, 37
 Di Taranto M.D., 10, 22, 36
 Dore M.P., 18
- E**
 Elviri L., 47
 Errigo A., 18
- F**
 Fadini G.P., 33
 Faggion E., 29
 Falzetti S., 40
 Farcomeni A., 4, 37
 Fasano T., 7, 46
 Fayer F., 8, 19, 23, 25, 43
 Feinberg M.W., 36
 Ference B.A., 21
 Ferrannini E., 6
 Ferri N., 5, 24, 29, 30
 Ferro Y., 19, 31, 40
 Fogacci F., 13, 14, 20
 Foracchia M., 7
 Forte F., 10, 11
 Fortunato G., 22, 36
 Fortunato V., 24
 Franzè M.S., 21
 Franzoni F., 8
 Frascaroli C., 3
- G**
 Galimberti F., 21
 Ganci A., 23, 25, 43
 Gaudio C., 34
 Gazzotti M., 2, 22, 35
 Gentile M., 10
 Georges C., 20
 Gesualdo L., 38
 Giaccari A., 32
 Giacobbe C., 10, 22, 36
 Giannamico A., 8, 19, 23, 25, 43
 Giavarini F., 2
 Giorgini E., 24
 Girelli D., 8, 19
 Giuliani D., 30
 Giulietti F., 40
 Giusti B., 18, 26, 27, 44, 45
 Gliozzi M., 19
 Goffredo B., 10
 Gori A.M., 18, 26, 27, 44, 45
- Granata A., 1
 Grandi E., 14
 Greco M.F., 24, 33
 Greco S., 24, 27
 Grigore L., 2, 12, 31
 Guagnano M.T., 6
 Guardamagna O., 9, 22, 30, 36
 Guardigli M., 20
 Gueli Alletti M., 8, 25, 43
 Guiducci V., 7
- H**
 Haemming S., 36
- I**
 Iannuzzo G., 10, 11
 Ieva R., 8
 Impronta F., 32
 Ingrassia V., 8, 19, 23, 25, 43
 Inzitari D., 26, 27
- K**
 Kallikourdis M., 34
 Karathanasis S.K., 45
 Kennedy C., 20
 Kiamehr M., 15
 Knežević T., 20
 Krogager C., 20
 Kura A., 18, 26, 27, 44, 45
- L**
 Lancellotti G., 5
 Lanuti P., 43
 Liani R., 6, 43
 Liberopoulos E., 20
 Limbucci N., 26, 27
 Lip G., 37
 Lo Coco G., 27, 41
 Locatelli M., 35
 Loffredo L., 34
 Lopreato M., 24
 Lotti E., 44
 Lucchi T., 38
 Luciani F., 24, 27
 Lugari S., 2, 13, 28, 39
 Lupo M.G., 5, 29
- M**
 Macchi C., 24, 33
 Maggioni A.P., 38
 Magi A., 18, 26, 27, 45
 Magni P., 15
- Maione G., 22, 36
 Malvandi A.M., 12
 Mandraffino G., 16, 21, 22, 44
 Manetti F., 8
 Mangiafico S., 26, 27
 Mannini L., 44
 Mantovan R., 38
 Manzini S., 15
 Marando S., 47
 Marche C., 18
 Marchi C., 30, 36
 Marchisio M., 43
 Marcucci R., 18, 26, 27, 32, 44, 45
 Marelli-Berg F., 7
 Mari A., 32
 Martinelli N., 8, 19
 Martini E., 34
 Massini G., 9, 30, 36
 Mastrogiorgi G., 10
 Mattavelli E., 31
 Maurotti S., 31, 40
 Mazz E., 19
 Mazza E., 31, 19, 40
 Mazza S., 1
 Menichelli D., 32
 Mezza T., 32
 Mirarchi A., 31
 Misiano G., 8, 25, 43
 Mitro N., 16
 Moffa S., 32
 Molaschi M., 17
 Mollace V., 19
 Mondelli A., 13, 28, 39
 Montagano M., 6
 Montalcini T., 19, 31, 40
 Monteleone A., 42
 Moregola A., 7, 33
 Morici N., 45
 Morieri M.L., 33
 Morotti A., 3
 Murri A., 26
 Musolino V., 19
 Mussi C., 5
- N**
 Nappini S., 26, 27
 Nascimbene F., 2, 13, 28, 39
 Nassisi V., 16
 Negri E.A., 7, 46
 Nocella C., 12, 34
 Norata G.D., 2, 4, 7, 16, 33, 34, 46
 Noto D., 8, 19, 23, 25, 43

- Nour J., 34
 Novo S., 19
 Nucera S., 19
 Nyffenegger A., 9, 30
- O**
 Oliva F., 45
 Olivieri O., 8
 Olmastroni E., 2, 15, 21, 22, 35
 Onfiani G., 13, 28, 39
 Ossoli A., 35, 38, 45
- P**
 Palazzini M., 45
 Palma D., 22, 36
 Palumbo M., 1, 5, 6
 Pani A., 4
 Paone S., 19
 Papotti B., 30, 36
 Pasanisi E., 17, 42
 Passaro A., 24, 27
 Pastori D., 3, 4, 12, 32, 37
 Pavanello C.A., 37, 38
 Pazzucconi F., 37
 Peano C., 2
 Pederiva C., 22, 47
 Pellegatta F., 2, 4, 7, 16, 31, 34
 Pellegrini E., 13, 28, 39
 Pepe G., 18
 Perez P., 20
 Perla F.M., 9, 14
 Pernice V., 19
 Pes G., 18
 Petersen C., 42
 Piccardi B., 26, 27
 Pignatelli P., 12, 32, 34, 37
 Pirro M., 8
 Pisciotta L., 38
 Poli D., 44
 Polito L., 6
 Pontara A., 13, 28, 39
 Pontecorvi A., 32
 Pontrelli G., 10
 Pujia A., 19, 22, 31, 40
 Pujia R., 19, 31, 40
 Punzo A., 20
 Purrello F., 12
- R**
 Rana I., 10
 Rattazzi M., 29
 Redaelli L., 31
- Remaggi G., 47
 Renieri L., 26, 27
 Ripoli A., 42
 Ristè F., 2
 Ristori L., 40
 Rizzo M., 20
 Rizzoli E., 14
 Rodolfo M., 1
 Rogolino A., 26, 44
 Romano R., 47
 Ronda N., 30, 36
 Rosi A., 26, 27
 Rossi F., 38
 Rossi I., 9, 14
 Rotta L., 2
 Rottoli D., 35
 Rubba P., 10
 Ruscica M., 1, 5, 24, 33
 Russo I., 3, 12
- S**
 Sacchetti A., 41
 Saitta A., 16, 21, 44
 Sampietro T., 5, 17, 24, 38, 42
 Santilli F., 6
 Sanz J.M., 27, 41
 Sarti C., 26, 27
 Sartore G., 8
 Sarullo F., 19
 Sarzani R., 22, 40
 Šatrauskiene A., 20
 Savarino F., 16, 21, 44
 Sbrana F., 5, 17, 42
 Scarinzi, P., 2
 Schiavone C., 6
 Sciacqua A., 32
 Scicali R., 2, 12
 Scopa A., 24
 Scrimali C., 8, 19, 23, 25, 43
 Scuruchi M., 16, 21, 44
 Severgnini M., 2
 Sgrò A., 41
 Simeoli R., 10
 Simeone P., 43
 Simeone P.G.M., 43
 Simion V., 36
 Simonelli S., 35
 Simsek S., 1
 Sinicropi D., 16, 21, 44
 Sironi L., 16
 Sirtori C.R., 1, 5, 24
 Sodero A., 26, 27
- Spannella F., 40
 Spina R., 8, 19, 23, 25, 43
 Squadrato G., 16, 21, 44
 Stefanini L., 3
 Sticchi E., 18, 26, 27, 44, 45
 Strazzella A., 35, 45
 Suraci S., 18, 26, 27, 44, 45
 Svecla M., 4, 7, 16, 34, 46
- T**
 Tarchi M., 10
 Tidone C., 31
 Torromeo C., 34
 Toth P.P., 13
 Tragni E., 15
 Trenti C., 7, 46
 Tripaldella M., 10, 11
 Tripaldi R., 6, 43
 Turri M., 45
 Uboldi P., 46
- V**
 Vallée A., 20
 van Velzen D.M., 1
 Vandini E., 30
 Veglia F., 38
 Verduci E., 47
 Vergani E., 1
 Vestita G., 24
 Viceconte N., 34
 Viggiano C., 47
 Vigna G.B., 2, 27
 Violi F., 12, 32, 34, 37
 Vita P., 13, 28, 39
 Vitelli N., 11
 Volta A., 18, 26, 45
 Vrablik M., 20
- W**
 Wenstedt E.F.E., 20
- Z**
 Zambon A., 13
 Zampoleri V., 2, 12, 31
 Zanchi C., 35
 Zanotti I., 47
 Zardi E., 13, 28, 39
 Zhou H., 36
 Zimetti F., 1, 5, 27, 30, 36
 Zoja C., 35
 Zuliani G., 27, 41

