

FISIOPATOLOGIA

RUOLO DEI LIPIDI

MAURIZIO AVERNA

Introduzione

I lipidi sono biomolecole che appartengono a diverse famiglie biochimiche e hanno nel nostro organismo importanti ruoli sia strutturali, componenti essenziali di tutte le membrane cellulari e subcellulari, che di *signalling*. L'introduzione delle metodologie basate sulla spettrometria di massa ha determinato lo sviluppo della Lipidomica che ha permesso di identificare migliaia di specie lipidiche che vengono raggruppate in 8 categorie (*Tabella 1*). Il loro metabolismo è strettamente controllato da enzimi e catene enzimatiche (*per es.*, la catena enzimatica di sintesi del colesterolo) e da circuiti di regolazione molecolare. Le alterazioni dei meccanismi di controllo o i deficit enzimatici sono responsabili di patologie umane (*per es.*, le malattie da accumulo lisosomiale). Colesterolo, trigliceridi e fosfolipidi

sono lipidi e come tali, molecole idrofobe e poco solubili in un mezzo acquoso come il plasma; per tale motivo vengono trasportati in circolo in associazione a proteine: tali complessi macromolecolari sono le lipoproteine plasmatiche (*Tabella 1*). Le alterazioni quantitative e/o qualitative di colesterolo, trigliceridi e fosfolipidi e delle lipoproteine che li trasportano sono responsabili di patologie, le dislipidemie, strettamente associate allo sviluppo di aterosclerosi e malattie cardio e cerebrovascolari. La randomizzazione mendeliana ha dimostrato come il colesterolo e le lipoproteine che contengono apolipoproteina B (apoB-Lp) [LDL, VLDL e loro remnants, Lp(a)] hanno un ruolo causale nei confronti delle malattie cardiovascolari di natura aterosclerotica. In questo capitolo verranno presi in esame i meccanismi fisiopatologici che legano i lipidi plasmatici e le apoB-Lp all'aterosclerosi.

Tabella 1

Categorie lipidiche	Specie	Trasportatore plasmatico	Classe lipoproteica
1. Acidi Grassi		Albumina	
2. Glicero Lipidi	trigliceridi	Lipoproteina	Chilomicroni, VLDL, remnants
3. Glicero Fosfolipidi	fosfolipidi	Lipoproteina	HDL, Lp (a)
4. Sfingo Lipidi			
5. Stero Lipidi	colesterolo	Lipoproteina	LDL, VLDL, remnants, Lp(a), HDL
6. Prenol Lipidi			
7. Saccaro Lipidi			
8. Poliketidi			

Colesterolo, Lipoproteine ricche in apolipoproteina B (apoB-LP) ed Aterosclerosi

La dimostrazione del ruolo patogenetico del colesterolo e dei suoi cristalli nello sviluppo della lesione anatomopatologica iniziale della aterosclerosi risale agli studi seminali di Anitschkow e Chalatow risalenti al 1913. Dopo un secolo di ricerca sperimentale, i meccanismi che dalla alimentazione ricca di grassi saturi determinano lo sviluppo di aterosclerosi sono stati definiti a livello cellulare e molecolare (1). Oggi sappiamo che il colesterolo associato alle lipoproteine ricche in apolipoproteina B (apoB-Lp) e cioè lipoproteine a bassa densità (LDL), lipoproteine a densità molto bassa [VLDL di piccole dimensioni e remnants delle VLDL] e Lipoproteina (a) [Lp(a)], attraversa lo strato endoteliale e dà inizio ad una serie di eventi che portano alla formazione dell'ateroma. Il flusso trans-endoteliale di apoB-Lp avviene anche in assenza di alterazioni focali dell'endotelio, dovute allo shear stress o all'attivazione endoteliale da parte degli altri fattori di rischio di aterosclerosi. I determinanti della permeabilità endoteliale sono in parte ancora da definire ma un ruolo importante lo hanno i livelli plasmatici di apoB-Lp che quando aumentati, come avviene nei pazienti con dislipidemie aterogene mono/poligeniche, una maggiore quantità di apoB-Lp attraversa l'endotelio. Viceversa, studi sperimentali nel topo hanno dimostrato come la riduzione di apoB-Lp, attraverso ad esempio interventi farmacologici è in grado di ridurre la permeabilità endoteliale. Le apoB-LP vengono quindi intrappolate nello spazio sotto-endoteliale in virtù del legame che si stabilisce tra i proteoglicani e la apolipoproteina B (trapping delle apoB-Lp), che contiene il dominio aminoacidico necessario (2) (Figura 1). È possibile documentare in queste fasi ini-

ziali della aterogenesi la formazione di cristalli di colesterolo la cui deposizione aumenta progressivamente determinando l'aumentato reclutamento di monociti-macrofagi e cellule dell'immunità. I cristalli di colesterolo libero non esterificato (CL) che si formano all'interno dei macrofagi si assemblano e determinano la rottura delle membrane lisosomiali ed il rilascio di catepsine che sono in grado di attivare non solo la infiammazione attraverso l'inflammasoma (NLRP3) ma anche l'apoptosi dei macrofagi, evento che aumenterà la quantità di cristalli nell'interstizio e la propagazione degli eventi infiammatori (*vedi capitolo sull'immuno-flogosi*).

L'accumulo di colesterolo all'interno dei macrofagi della placca nascente rappresenta l'evento chiave del processo che porta alla formazione della placca ateromatosa, alla sua progressione ed evoluzione in placca fibro-calcifica o in placca con core necrotico e ricco in lipidi. L'infiammazione alla cui attivazione concorrono i cristalli di colesterolo, condizionerà le complicanze dell'ateroma, erosione-rottura-crecita stenotante, che sono i correlati anatomo-patologici della angina pectoris, della sindrome coronarica acuta e della morte improvvisa coronarica (3-5). La comprensione della fisiopatologia dell'accumulo di colesterolo nei macrofagi della placca deriva dagli studi di Brown and Goldstein. Gli esperimenti che portarono alla scoperta del recettore delle LDL (LDL-R) indicarono anche che i macrofagi dei soggetti con ipercolesterolemia familiare omozigote, privi del recettore, accumulavano colesterolo all'interno e che queste cellule non erano in grado, in quanto prive del LDL-R, di internalizzare le LDL native ma riuscivano ad internalizzare LDL modificate. Vennero così scoperti i recettori *scavenger* che non sono *down-regolati* e quindi accumulano colesterolo fino alla morte della cellula (1).

Gli studi delle ultime decadi hanno confermato il ruolo fondamentale dello stress ossidativo nell'aterogenesi. Lo stress ossidativo è il risultato dell'equilibrio redox costituito dal rapporto tra l'accumulo di molecole riducenti ed ossidanti che vengono prodotte dai processi metabolici. Le apoB-Lp intrappolate nello spazio sub-intimale subiscono modificazioni ossidative (oxLDL, oxLP) che consentono loro di essere captate ad libitum dai recettori scavengers del macrofago (SR-A, LOX-1, CD-36). LOX-1 - una glicoproteina di membrana - è uno dei recettori scavenger dei ma-

crofagi ed ha tra i suoi ligandi le oxLDL ma anche ad esempio gli AGE- i prodotti avanzati della glicazione (6). Il gene che codifica LOX-1 è sovra-espresso da NF- κ B, fattore centrale nella flogosi ed è anche un suo attivatore, e da angiotensina II, a suggerire che esiste a livello fisiopatologico molecolare una interazione tra i vari fattori di rischio, quali diabete ed ipertensione. Inoltre, nei macrofagi, in condizioni di flogosi della placca, fino al 40% di oxLDL è captato da LOX-1 (*Box 1*). Un polimorfismo del gene LOX1 che ne riduce gli effetti pro-aterogeni è meno frequente tra i soggetti

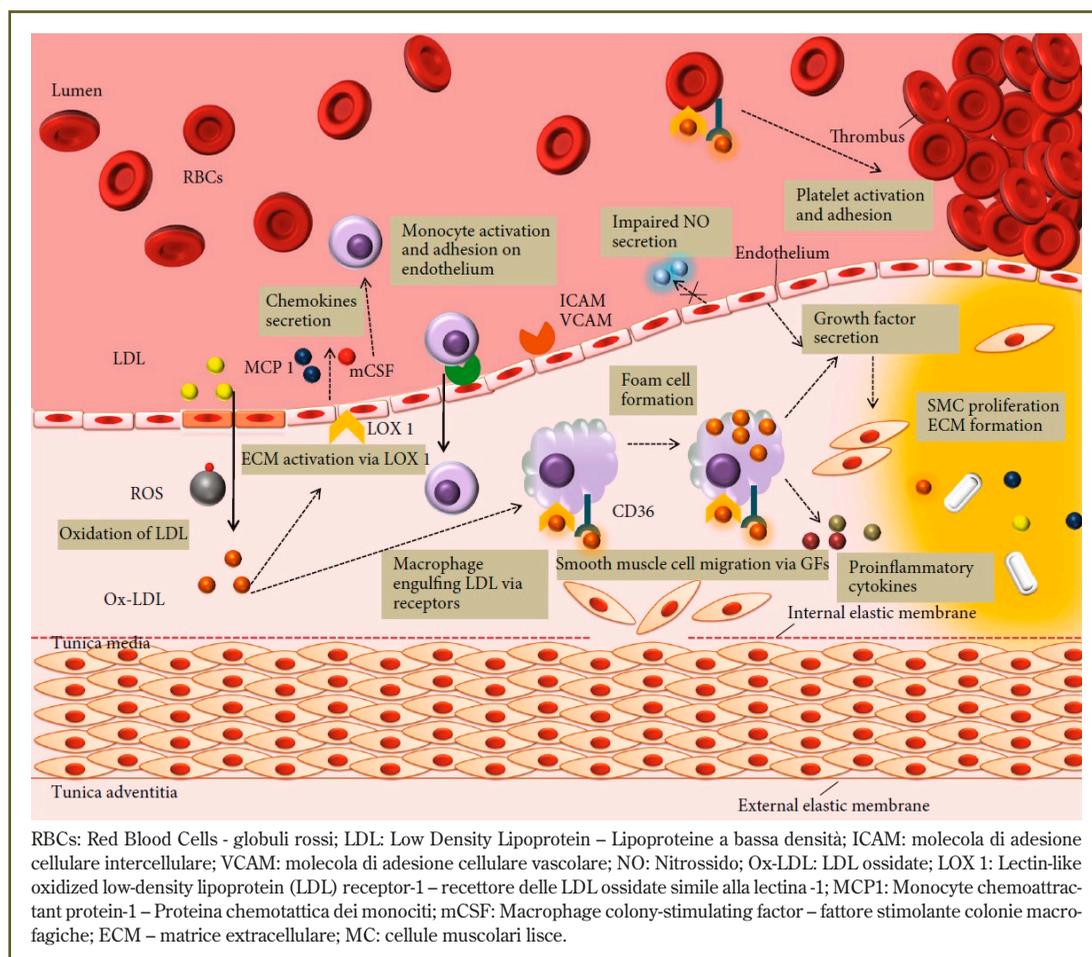


Figura 1 - Aterogenesi. Modificata e adattata da: Khatana C et al., *Oxid Med Cell Longev.* 2020; Sep 15; 2020: 5245308.

con eventi cardiovascolari ad indicare che esiste anche, come del resto in tutte le condizioni di salute e di malattia, un contributo rilevante del patrimonio genetico individuale.

I processi di ossidazione delle LDL mediati dai ROS e da attività enzimatiche come lipossigenasi e fosfolipasi A2 rendono le oxLDL e le oxLP riconoscibili dai macrofagi. Le oxLDL stimolano la produzione di autoanticorpi che sono dosabili nel plasma e che sono utilizzati come biomarcatori di predizione. La ossidazione delle oxLDL e delle apoB-Lp riguarda non solo le specie lipidiche trasportate ma anche la componente proteica (apoB). Le specie lipidiche più prone alla ossidazione sono gli acidi grassi poliinsaturi, i fosfolipidi e gli esteri del colesterolo che li contengono; i grassi monoin saturati sono meno suscettibili incluso l'acido oleico componente primario dell'olio d'oliva e della dieta mediterranea. Alcuni prodotti di ossidazione lipidica sono stati utilizzati come biomarcatori - ad es. la malonaldeide -. La apo B componente proteica delle LDL dà origine, per effetto della ossidazione a frammenti che possono agire da epitopi antigenici e stimolare quindi la risposta immunitaria (*vedi capitolo sull'immuno-flogosi*). Le oxLDL sono in grado di favorire l'attivazione in senso infiammatorio delle cellule endoteliali, la proliferazione delle cellule muscolari lisce ed il reclutamento dei monociti. Inoltre le oxLDL amplificano la risposta infiammatoria, stimolando la produzione sia di ROS che di citochine pro-infiammatorie. Recenti studi hanno dimostrato come le apoB-Lp oltre a trasportare molecole lipofiliche come colesterolo, trigliceridi e fosfolipidi, trasportano anche prodotti di ossidazione lipidica (LOP) provenienti dalla alimentazione soprattutto se ricca in grassi. I LOP trasportati dalle LDL assieme al colesterolo vengono veicolati ai tessuti in-

cluso lo spazio sub-intimale vascolare e contribuiscono alla formazione delle cellule schiumose macrofagiche della placca aterosclerotica ed alla attivazione dei processi flogistici.

I cristalli di colesterolo e le LDL ossidate costituiscono il legame fisiopatologico tra livelli non ottimali di colesterolo, aterogenesi e malattie cardiovascolari. Infatti la placca ateromatosa durante la sua progressione può trovarsi in una situazione di relativa stabilità se il core è povero di lipidi e l'attivazione delle cellule muscolari lisce è in grado di favorire la formazione di un cappuccio fibro-calcifico; questo tipo di placca tuttavia può crescere nello spazio endo luminale e determinare stenosi critiche responsabili di angina stabile ed infarto del miocardio. Quando il cuore necrotico-lipidico prevale con una conseguente

Box I - Le tappe significative della comprensione dei meccanismi ossidativi delle lipoproteine contenenti ApoB

- **I macrofagi degli HoFH accumulano colesterolo in assenza di LDL-R.** Brown MS, Goldstein JL. Annu Rev Biochem. 1979/1983.
- **I macrofagi non accumulano colesterolo in presenza di LDL native ma di LDL chimicamente modificate (LDL acetilate non presenti in vivo).** Brown MS, Goldstein JL. Annu Rev Biochem. 1979/1983
- **Le LDL sono citotossiche quando ossidate.** Chisolm GM, et al. Arteriosclerosis. 1983.
- **Le cellule endoteliali modificano le LDL attraverso meccanismi di ossidazione.** Steinberg D, et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1984.
- **Isolamento nel plasma umano di Ox-LDL.** Avogaro P, et al. Basic Life Sci. 1988.
- **Scoperta dei recettori scavenger SRA e SRB (CD36) per Ox-LDL.** Kodama T. PNAS. 1988; Krieger M. Science. 1996.
- **Scoperta del recettore LOX-1 per Ox-LDL.** Sawamura T. Nature. 1997.
- **Localizzazione di LOX-1 nelle cellule endoteliali coronariche umane.** Mehta JL. BBRC. 1998.

maggior attivazione della immuno-flogosi, l'endotelio sovrastante viene interessato e diventa pronò alla erosione o alla rottura. Tali ultimi eventi sono in grado di attivare l'aggregazione piastrinica e la trombosi, responsabili in modo diretto delle sindromi coronariche acute anche in assenza di una stenosi critica.

Trigliceridi, VLDL, VLDL-remnants (RPL) ed aterosclerosi

I trigliceridi sono veicolati nel plasma a digiuno ed in fase inter-prandiale dalle VLDL e dai loro remnants (RPL) ed in fase post-prandiale dai Chilomicroni (*Tabella 1*). I chilomicroni ed i loro remnants, lipoproteine di dimensioni piú piccole prodotte dalla attività enzimatica lipolitica della lipo-

protein-lipasi (LPL), contengono come apolipoproteina la apoB-48 ed il loro metabolismo è molto rapido con un tempo di residenza plasmatico di pochi minuti. Le VLDL ed i loro remnants contengono invece apoB-100 e percentualmente, oltre i trigliceridi, una quantità di colesterolo che è maggiore. Nella *Figura 2* sono schematizzate le tappe principali del metabolismo dei trigliceridi esogeni, trasportati dai chilomicroni e da quelli endogeni, trasportati dalle VLDL - prodotte nel fegato - e dai loro remnants originati in circolo ad opera della LPL. I dati sperimentali ed epidemiologici indicano che apoB-100 ed il colesterolo dei remnants contribuiscono alla aterogenesi e quindi alle malattie cardiovascolari (7). La lipolisi delle grandi VLDL (*Figura 2*) produce una serie di macromolecole di dimensioni progressivamente decrescenti, i remnants delle VLDL ed alla fine del processo le LDL. VLDL-remnants come le LDL sono in grado di attraversare l'endotelio vascolare e rimanere intrappolate nello spazio sub-intimale, legate ai proteoglicani connettivali. Gli eventi successivi innescati da queste particelle molto simili per dimensioni alle LDL, comprendono l'uptake da parte dei macrofagi attraverso i recettori *scavenger*, la formazione delle cellule schiumose (*foam cell*) e la crescita e progressione della placca. A differenza delle LDL, i remnants delle VLDL non necessitano di essere ossidati per penetrare i macrofagi, contengono una quantità di colesterolo superiore alle LDL e per tali motivi risultano essere piú aterogeni. Tuttavia anche i trigliceridi contenuti nelle VLDL e nei loro *remnant* concorrono all'aterogenesi: durante la lipolisi ad opera della LPL vengono liberati acidi grassi liberi ossidati che sono in grado di attivare l'endotelio in senso pro-infiammatorio e pro-coagulante, amplificando così l'aterogenesi. Infatti l'endotelio attivato esprime molecole di adesione che in-

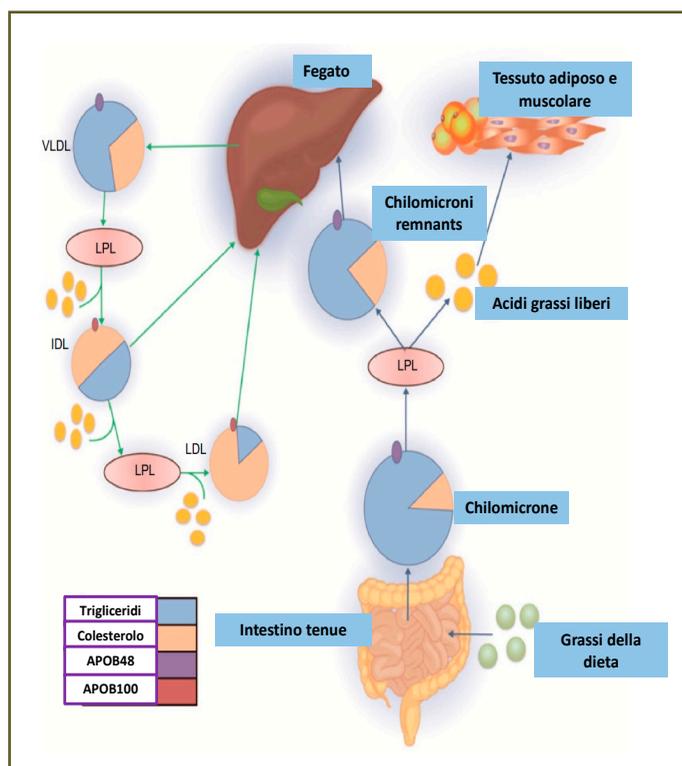


Figura 2 - Metabolismo delle Lipoproteine. *Adattata e modificata da: Peter P Toth, Vascular Health and Risk Management. 2016: 12: 171-183.*

crementano il reclutamento di monociti, la loro penetrazione all'interno della placca e la formazione quindi di più cellule schiumose (8). Un effetto peculiare dei *remnant* è quello sulle piastrine e sullo stato coagulativo ed è probabilmente dovuto ai trigliceridi ed agli acidi grassi. Vengono così potenziati sia l'aggregazione piastrinica che la formazione di coaguli attraverso l'aumentata espressione di fattore tissutale, potente attivatore della trombosi e di PAI-1 (inibitore dell'attivatore del plasminogeno). Il ruolo aterogeno e causale di malattia cardiovascolare di natura aterosclerotica delle lipoproteine ricche in trigliceridi e dei loro *remnants* è stato stabilito, oltre che dalle evidenze sperimentali già descritte, anche dallo studio di una malattia genetica del trasporto lipidico, la Disbetalipoproteinemia o malattia da accumulo di *remnant* e dagli studi di randomizzazione mendeliana. La Disbetalipoproteinemia è causata dalla presenza di un particolare genotipo- $\epsilon 2/\epsilon 2$ - che determina la presenza sui *remnant* di una variante della apolipoproteina E (E2), che perde l'affinità per il recettore delle LDL. Per tale motivo nei soggetti affetti, i *remnant* non possono essere rimossi dal circolo e si accumulano. Questa malattia è gravata da aterosclerosi severa, arteriopatia periferica ed eventi cardiovascolari precoci. Il Copenhagen City Heart Study, condotto su di una coorte di circa 10.000 individui, ha dimostrato come i soggetti portatori di varianti genetiche che dalla nascita causavano una riduzione dei trigliceridi dosati non a digiuno, avessero una ridotta mortalità cardiovascolare. Tali studi hanno anche messo in evidenza il rapporto tra sistema lipolitico (LPL con i suoi inibitori ed attivatori) ed il rischio cardiovascolare. I soggetti portatori di varianti geniche dei due principali inibitori di LPL, apoCIII ed ANGPTL3, e/o di un attivatore, apoA-V, che si associano a bassi livelli di trigliceridi,

hanno una consistente riduzione del loro rischio di eventi coronarici.

Correlati clinici del ruolo causale di aterosclerosi delle lipoproteine ricche in apoB che trasportano colesterolo e trigliceridi

Gli eventi cellulari e molecolari che caratterizzano l'aterogenesi sono causati da una esposizione prolungata a livelli non ottimali delle lipoproteine che trasportano il colesterolo (LDL) ed i trigliceridi (VLDL, RLP). Le evidenze che derivano dagli studi prospettici di coorti o popolazioni sul rischio cardiovascolare, dagli studi di intervento farmacologico sugli *outcome* clinici e dagli studi delle malattie genetiche che determinano aumenti estremi del colesterolo plasmatico (ipercolesterolemia familiare - FH -) e dei trigliceridi (sindrome chilomicronemia familiare -FCS- e sindrome chilomicronemia multifattoriale - MCS -) hanno permesso di quantificare il rischio cardiovascolare (Figura 3). Per il colesterolo esso cresce passando dalla ipercolesterolemia comune poligenica con livelli di LDL-C sub-ottimali (fino a 160-180 mg/dl)

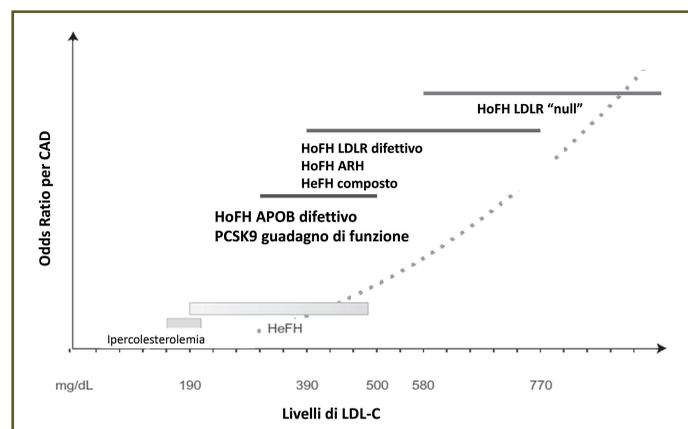


Figura 3 - Rischio cardiovascolare nella ipercolesterolemia. Adattata e modificata da: Alexandre M. Belanger et al., *Curr Opin Lipidol.* 2020, 31: 176-181.

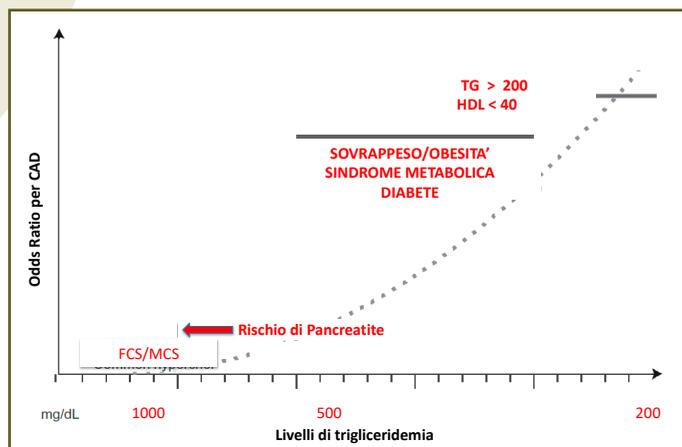


Figura 4 - Rischio cardiovascolare nella ipertrigliceridemia.

a quello altissimo e precocissimo della forma più grave di FH omozigote (LDL-C >700 mg/dl) mentre per i trigliceridi il comportamento della curva di rischio è opposto con un aumento del rischio cardiovascolare per livelli di trigliceridi tra 150 e 400, associati a bassi livelli di HDL, *range* in cui sono presenti condizioni che causano elevati livelli di *remnant* aterogeni (insulino-resistenza e diabete). Nelle patologie in cui i livelli di trigliceridi invece sono molto alti >1000 mg/dl (FCS ed MCS) e sono veicolati da lipoproteine molto grandi, VLDL e chilomicroni - non aterogene - aumenta il rischio di pancreatite (Figure 3 e 4). Il correlato clinico più importante è rappresentato dalla possibilità di influenzare positivamente la storia naturale dell'ateroma, rallentandone la progressione o addirittura favorendone la regressione e aumentandone la resistenza alla erosione ed alla rottura. Per raggiungere questi obiettivi è necessario ridurre in modo significativo ed a lungo i livelli di colesterolo veicolato dalle apoB-Lp.

Fosfolipidi e Lp (a)

La Lipoproteina (a) - Lp (a) - è un fattore di rischio indipendente di malattia car-

diovascolare e recentemente le evidenze raccolte attraverso studi sperimentali, epidemiologici, genetici e di randomizzazione mendeliana hanno dimostrato come essa assieme a LDL e RLP, rappresenti un fattore causale di aterosclerosi. Lp (a) è una lipoproteina costituita da una LDL, la cui apoB è legata ad un'altra proteina, la apolipoproteina a [apo (a)]. Apo (a) è molto simile al plasminogeno e si ritiene per questo che possa interferire con la fibrinolisi svolgendo un ruolo pro-trombotico.

Lp (a) quindi ha le caratteristiche strutturali per essere aterogena come una LDL e favorire anche i processi coagulativi. I livelli plasmatici di Lp (a) sono in gran parte geneticamente determinati e la maggior parte degli individui ha concentrazioni di Lp (a) inferiori a 50 mg/dl e circa il 20-30 % della popolazione ha livelli superiori. Studi prospettici su decine di migliaia di individui hanno dimostrato il ruolo di fattore di rischio indipendente di Lp (a): valori superiori al 95° percentile o a 50 mg/dl aumentano di circa 2-3 volte il rischio di infarto del miocardio e di 5 volte negli individui con ipercolesterolemia familiare. Lp (a) appartiene alla categoria di lipoproteine ricche in apoB e come già descritto condivide gli stessi meccanismi aterogeni di penetrazione nello spazio sub-intimale, di *trapping* mediato dai proteoglicani, reclutamento dei monociti e formazione di cellule schiumose (9). Lp (a) inoltre è il maggiore serbatoio circolante di OxPL, uno dei prodotti dell'ossidazione dei lipidi delle LDL, veicolando circa l'80% degli OxPL legati alle lipoproteine (10). L'ossidazione dei fosfolipidi legati alla apolipoproteina B crea degli epitopi antigenici indistinguibili da quelli prodotti dalle cellule apoptotiche e batteriche. La risposta immunitaria evocata assieme a quella infiammatoria rende conto

del potere aterogeno degli OxPL legati a Lp (a) (11). Una modalità di rimozione degli OxPL presenti nella placca risiede nell'attività di un enzima, la fosfolipasi A2 (Lp-PLA2) associata a LDL e Lp (a). La efficienza di tale enzima è però ridotta nei pazienti con malattia cardiovascolare, probabilmente per l'effetto inibitorio di Lp (a). Grazie alla capacità antigenica degli OxPL, è possibile dosarli. I risultati degli studi che hanno utilizzato il dosaggio di questo biomarker hanno dimostrato che i livelli di OxPL plasmatici correlano con i livelli di Lp (a) ed inoltre che i livelli più elevati di OxPL aumentano il rischio cardiovascolare di circa 2 volte (9).

Prospettive future

La comprensione della fisiopatologia dell'aterosclerosi e dei meccanismi biochimico-molecolari mediati dai lipidi nella aterogenesi permetterà di studiare terapie anti aterosclerotiche innovative mirate alla modulazione di nuovi *target* molecolari. I risultati di *trial* recenti disegnati per intervenire sui processi coagulativi ed infiammatori dimostrano come in futuro l'intervento farmacologico sarà sempre più personalizzato e guidato dalla genetica, dalle informazioni derivate dai *biomarker* e dall'*imaging* molecolare.

Bibliografia

1. Goldstein JL, Brown MS. A century of cholesterol and coronaries: from plaques to genes to statins. *Cell*. 2015; 161: 161-72.
2. Williams KJ, Tabas I. The response-to-retention hypothesis of early atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1995; 15: 551-61.
3. Ross R. Atherosclerosis - An Inflammatory Disease. *N Engl J Med*. 1999; 340: 115-26.
4. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation*. 2002; 105: 1135-43.
5. Witztum JL, Steinberg D. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *The Journal of Clinical Investigation*. 1991; 88: 1785-92.
6. Mehta JL, Chen J, Hermonat PL, et al. Lectin-like, oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (LOX-1): A critical player in the development of atherosclerosis and related disorders. *Cardiovasc Res*. 2006; 69: 36-45.
7. Toth PP. Triglyceride-rich lipoproteins as a causal factor for cardiovascular disease. *Vascular Health and Risk Management*. 2016; 12: 171-83.
8. Peng J, Luo F, Ruan G, Peng R, Li X. Hypertriglyceridemia and atherosclerosis. *Lipids Health Dis*. 2017; 16: 233.
9. Shah NP, Pajidipati NJ, McGarrah RW, et al. Lipoprotein (a): An Update on a Marker of Residual Risk and Associated Clinical Manifestations. *Am J Cardiol*. 2020; 126: 94-102.
10. Tsimikas S, Witztum JL. The role of oxidized phospholipids in mediating lipoprotein(a) atherogenicity. *Current Opinion in Lipidology* 2008; 19: 369-77.
11. Leibundgut G, Witztum JL, Tsimikas S. Oxidation-specific epitopes and immunological responses: Translational biotheranostic implications for atherosclerosis. *Curr Opin Pharmacol*. 2013; 13: 168-79.