

FISIOPATOLOGIA

IL SISTEMA HDL NELLA COMPLESSA FISIOPATOLOGIA DELL'ATEROSCLEROSI

MARTA TURRI, BIANCA PAPOTTI, LAURA CALABRESI, FRANCO BERNINI

Numerosi studi epidemiologici hanno chiaramente evidenziato l'esistenza di una correlazione inversa tra livelli plasmatici di HDL-colesterolo (HDL-c) e incidenza di malattie cardiovascolari (1). Il ruolo delle HDL nella protezione cardiovascolare è stato però messo in discussione da studi di randomizzazione mendeliana (2), così come da trial clinici condotti con farmaci che pur in grado di aumentare i livelli plasmatici di HDL-c non hanno mostrato benefici sugli eventi cardiovascolari. Questa discrepanza trova diverse spiegazioni:

- 1) come dimostrato dai dati del Copenhagen Heart Study la relazione tra HDL-c ed eventi cardiovascolari non è lineare ma ha una forma a U;
- 2) la relazione è negativa per bassi livelli di HDL-c, mentre per valori medi la curva è piatta per divenire positiva per valori di HDL-c elevati (3);
- 3) il livello plasmatico di HDL-c non riflette la reale efficienza del sistema HDL, che è certamente complesso e coinvolge particelle diverse con funzionalità variabile;
- 4) il colesterolo non rappresenta la componente protettiva delle HDL.

Questa rassegna si propone di discutere le proprietà strutturali e funzionali delle

HDL nel tentativo di chiarire la relazione tra le diverse sottoclassi HDL e l'ateroprotezione mediata da queste lipoproteine.

Struttura delle HDL

Le HDL costituiscono una famiglia di lipoproteine composta da diverse particelle che variano per densità, forma e dimensione; con densità compresa tra 1.063 e 1,21 g/mL e diametro da 7,0 a 13,0 nm le HDL sono le più piccole e più dense tra le lipoproteine plasmatiche (4, 5). Le HDL sono costituite per il 50% da lipidi, soprattutto colesterolo e fosfolipidi, e per il 50% da proteine che conferiscono la densità elevata. La maggior parte delle HDL plasmatiche ha forma sferica, con un core centrale di lipidi idrofobici (trigliceridi ed esteri del colesterolo) circondato da un unico strato di lipidi polari (fosfolipidi e colesterolo non esterificato) e apolipoproteine. Una piccola frazione di HDL ha struttura discoidale; si tratta di HDL nascenti, composte da un doppio strato di lipidi polari circondato da apolipoproteine.

La componente proteica delle HDL è composta per la maggior parte da apolipoproteina A-I (apoA-I) e apoA-II. Sulla base della maggior componente proteica sono

state identificate due maggiori sottoclassi di HDL: particelle contenenti sola apoA-I, dette LpA-I, e particelle contenenti apoA-I e apoA-II, dette LpA-I:A-II. Altre proteine circolano nel plasma legate alle HDL, tra cui apoA-IV, C peptidi, apoE, la lecitina: colesterolo aciltransferasi (LCAT), la proteina di trasferimento degli esteri del colesterolo (CETP), la proteina di trasferimento dei fosfolipidi (PLTP), la paraoxonasi (PON) e l'acetilidrolasi del fattore attivante le piastrine (PAF-AH). Recenti analisi di proteomica hanno rivelato che le HDL trasportano numerose proteine (si stima più di 80), non tutte coinvolte nel metabolismo lipoproteico.

Le sottoclassi HDL possono essere separate utilizzando diverse tecniche; l'ultracentrifugazione consente di separare due sottoclassi chiamate HDL2, più grandi e meno dense (1,063-1,12 g/mL) e HDL3, più piccole e dense (1,12-1,21 g/mL). Le due maggiori classi di HDL possono essere ulteriormente frazionate mediante elettroforesi su gel di poliacrilammide in gradiente non denaturante (GGE) che separa le sottoclassi HDL in base alla dimensione delle particelle. La tecnica consente di identificare cinque sottoclassi: HDL3c, 7,2-7,8 nm; HDL3b, 7,8-8,2 nm; HDL3a, 8,2-8,8 nm; HDL2a, 8,8-9,7 nm; HDL2b, 9,7-12,0 nm. L'elettroforesi su gel di agarosio separa le HDL in base alla loro carica superficiale; la maggioranza delle HDL migra in posizione α , da qui il nome di alfa-lipoproteine, mentre una piccola quota di HDL ha migrazione $\text{pre}\beta$ a causa della forma discoidale. La combinazione di elettroforesi su gel di agarosio e GGE (elettroforesi bidimensionale o 2D-elettroforesi) rappresenta il metodo più risolutivo e consente di identificare fino a 12 distinte sottoclassi di HDL. È stato anche sviluppato un metodo di risonanza magnetica nucleare (NMR) per la separazione delle HDL, basato sul

concetto che ogni lipoproteina con una data dimensione ha il suo caratteristico segnale. NMR e GGE consentono anche di misurare il contenuto plasmatico di HDL grandi (8,8-13,0 nm), medie (8,2-8,8 nm) e piccole (7,3-8,2 nm). La separazione delle HDL nelle diverse sottoclassi viene generalmente effettuata nei laboratori accademici a scopo di ricerca; negli ultimi anni si è però vista comparire l'offerta di valutazioni delle sottoclassi HDL da parte di laboratori commerciali. L'interpretazione dei dati di sottoclassi HDL resta tuttavia complessa. La nomenclatura delle sottoclassi non è infatti uniforme per le diverse tecniche di frazionamento e i risultati sono espressi in vari modi (es. come percentuale delle HDL totali o del colesterolo plasmatico o del numero totale di particelle). Inoltre, un forte limite nella valutazione delle sottoclassi HDL è la mancanza di standard ampiamente accettati e di controlli di qualità. Tutti questi problemi rendono difficile il confronto dei risultati di studi epidemiologici e di intervento quando questi vengono prodotti utilizzando diversi metodi di frazionamento.

Metabolismo delle HDL

Le apolipoproteine A-I e A-II sono sintetizzate principalmente dal fegato e, in misura minore, dall'intestino tenue. Le proteine sono secrete come componenti di lipoproteine ricche in trigliceridi, i chilomicroni derivanti dall'intestino e le lipoproteine a bassissima densità (VLDL) derivanti dal fegato. Alcuni componenti di superficie (fosfolipidi, colesterolo e apolipoproteine) si dissociano dalle lipoproteine ricche in trigliceridi durante la lipolisi, generando $\text{pre}\beta$ -HDL, o venendo incorporati in HDL preesistenti, attraverso l'azione della PLTP. Gli epatociti secernono anche apoA-I povera di lipidi che acquisisce poi fosfolipidi e

colesterolo attraverso l'interazione con il trasportatore ATP binding cassette A1 (ABCA1) per formare pre β -HDL. Una volta in circolo, le pre β -HDL vengono modificate dall'azione di LCAT, che converte la lecitina e il colesterolo in lisolecitina ed esteri del colesterolo in una reazione che richiede apoA-I come cofattore. Gli esteri del colesterolo non polari separano il doppio strato lipidico e danno origine alle HDL mature e sferiche (HDL3, *Figura 1*). Queste α -HDL ricche di esteri seguono un duplice destino. Una piccola quota di HDL interagisce con il recettore scavenger di tipo BI (SR-BI) epatico con conseguente captazione selettiva del colesterolo contenuto in HDL e formazione di HDL piccole che possono riprendere il processo di conversione plasmatica. La gran parte delle HDL interagisce nel plasma con la CETP, che scambia esteri del colesterolo e trigliceridi tra HDL e lipoproteine contenenti apoB, generando HDL ricche di trigliceridi e quindi di maggiori dimensioni (HDL2). I trigliceridi e i fosfolipidi delle HDL vengono idrolizzati ad opera delle lipasi epatica ed endoteliale con conversione delle sferiche α -HDL in pre β -HDL discoidali che possono riprendere il ciclo. Durante questo processo, parte dell'apoA-I si dissocia dalle HDL e viene eliminata dalla circolazione, principalmente attraverso il rene. L'apoA-I ha una dimensione inferiore al valore limite della barriera glomerulare e può essere prontamente rimossa dalla circolazione mediante filtrazione glomerulare. L'apoA-I filtrata è interamente riassorbita nel tubulo prossimale contorto e non è rilevabile nelle urine in condizioni fisiologiche. La cubilina, un recettore multi-ligando espresso nella membrana apicale di vari epiteli di assorbimento, incluso quello del rene, lega l'apoA-I con alta affinità e media l'endocitosi della stessa. L'apoA-I interiorizzata potrebbe sfuggire alla degradazione e ritor-

nare in circolo; tuttavia, il fatto che tutti i ligandi della cubilina conosciuti sembrano destinati al trasporto verso i lisosomi è contrario a tale ipotesi della transitosi dell'apoA-I. Il rene è anche in grado, in minor misura, di filtrare e riassorbire le HDL. Forma molecolare e carica delle particelle influenzano la capacità delle HDL di attraversare la barriera glomerulare; le piccole HDL discoidali e cariche positivamente vengono filtrate più facilmente delle HDL mature.

Funzioni delle HDL

1. HDL e trasporto inverso del colesterolo

Le HDL possiedono numerose funzioni ateroprotettive, tra le quali la più studiata è la capacità di promuovere il trasporto inverso del colesterolo (RCT, *Figura 1*). Si tratta di un processo attraverso cui il colesterolo in eccesso viene rimosso ad opera delle HDL dai macrofagi (foam cells) presenti nella placca aterosclerotica e da queste trasportato al fegato per l'escrezione biliare. Il primo e limitante passaggio di questo processo è rappresentato dall'efflusso di colesterolo dai macrofagi alle HDL. Tale processo avviene attraverso diversi meccanismi i più importanti dei quali implicano il trasporto attivo del colesterolo ad opera di specifici trasportatori di membrana quali ATP binding cassette A1 (ABCA1) e G1 (ABCG1).

La dimensione delle HDL influisce sulla capacità di promuovere l'efflusso di colesterolo: ad esempio, l'efflusso tramite il trasportatore ABCA1 avviene in modo specifico a particelle HDL nascenti povere o prive di lipidi, le pre β -HDL. D'altra parte, HDL di dimensione maggiore, sferiche e mature (HDL2 e HDL3) interagiscono in modo preferenziale con il trasportatore ABCG1.

La funzione delle HDL di promuovere l'efflusso del colesterolo è definita capaci-

tà di efflusso del colesterolo (CEC) (6). Questo parametro valuta l'efficacia delle HDL plasmatiche di indurre l'efflusso di colesterolo da macrofagi in coltura e rappresenta una stima dell'efficienza dell'intero processo di RCT nell'uomo. Numerose sono ormai le evidenze cliniche, di tipo cross-sectional o prospettiche, che sottolineano l'esistenza di una relazione inversa tra la CEC e il rischio cardiovascolare, indipendentemente dai livelli plasmatici di HDL-c. Per quanto riguarda gli studi cross-sectional, è stata dimostrata una associazione inversa tra la CEC e la prevalenza di aterosclerosi, valutata tramite la misurazione di marker subclinici quali lo spessore medio-intimale carotideo (IMT) o la velocità dell'onda sfingica. Altri studi hanno messo in evidenza una correlazione positiva tra la CEC e la funzionalità endoteliale. Analogamente, per quanto riguarda gli studi prospettici, è emersa una relazione inversa tra la CEC misurata al basale e l'incidenza di eventi cardiovascolari oltre che la mortalità cardiovascolare al follow-up, relazione persistente anche in seguito ad aggiustamento per i fattori di rischio tradizionali (7). La CEC ha mostrato inoltre un migliore potere predittivo di rischio cardiovascolare rispetto ad alcuni fattori di rischio come la calcificazione coronarica o i livelli di proteina C-reattiva (PCR).

2. HDL e infiammazione

Oltre all'attività anti-aterogena di promozione dell'efflusso di colesterolo, le HDL svolgono una potente attività antinfiammatoria su diversi tipi cellulari coinvolti nell'aterogenesi, tra cui le cellule endoteliali e i macrofagi. Le HDL, infatti, attraverso il legame tra alcuni lisosfingolipidi ad esse associati e specifici recettori presenti sulle cellule endoteliali, attivano una cascata intracellulare volta all'inibizio-

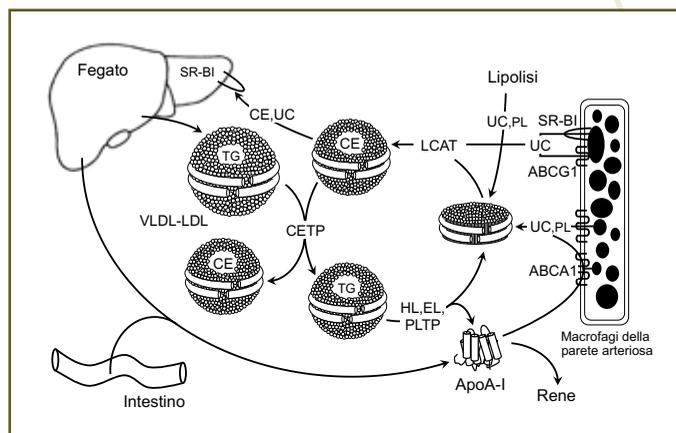


Figura 1 - Interconversione plasmatica delle HDL e trasporto inverso del colesterolo.

ne dell'espressione di molecole di adesione endoteliali, quali ICAM-1, VCAM-1 e la E-Selectina, anche in presenza di fattori pro-aterogeni e pro-infiammatori quali LDL ossidate, $TNF\alpha$ e lipopolisaccaridi, con conseguente riduzione dell'adesione all'endotelio dei monociti circolanti. L'attività antinfiammatoria delle HDL si esplica anche attraverso l'aumento dell'espressione della proteina ATF3 (activating transcription factor 3) coinvolta nella modulazione della risposta infiammatoria a livello macrofagico. Studi recenti, inoltre, hanno indicato un effetto cellulare diretto da parte delle HDL di inibizione della risposta infiammatoria mediata dalla promozione dell'efflusso di colesterolo. È stato infatti osservato che l'efflusso di colesterolo promosso dalle HDL in cellule mieloidi comporta una ridotta attivazione dell'infiammasoma, con conseguente riduzione dell'accumulo di neutrofili nella placca aterosclerotica. Anche l'apoA-I è coinvolta nell'azione antinfiammatoria delle HDL; è stata infatti osservata una relazione tra apoA-I e infiammazione in pazienti con ipofalipoproteinemia familiare, una condizione genetica caratterizzata da valori di HDL estremamente bassi. In questi pa-

zienti, le concentrazioni plasmatiche di PCR sono risultate essere inversamente correlate con la concentrazione plasmatica di HDL-c e apoA-I.

3. HDL e processi ossidativi

Evento primario dell'aterogenesi è rappresentato dalla presenza e ritenzione di particelle LDL nella tonaca intima delle arterie. I lipidi e le proteine associate alle LDL sono estremamente suscettibili a modificazioni come l'ossidazione e tale processo rappresenta uno degli eventi critici nella progressione dell'aterosclerosi. L'attività antiossidante delle HDL si esplica attraverso svariati meccanismi, partendo dalla rimozione da parte delle HDL dei lipidi ossidati delle LDL. Una volta incorporati nelle HDL, i lipidi ossidati possono essere neutralizzati dagli enzimi associati a queste lipoproteine, come la PON1 e LCAT. Tra le diverse sottoclassi delle HDL, le piccole HDL3 sembrano essere più efficaci delle HDL2 nell'accumulare e inattivare specie lipidiche ossidate e reattive, a causa della deplezione della sfingomieline, dell'arricchimento di apoA-I e di una conformazione distinta di apoA-I rispetto alle HDL2 (8).

4. HDL e trombosi

Oltre agli effetti protettivi precedentemente descritti, le HDL svolgono anche una attività antitrombotica (9) mediante la modulazione di meccanismi molecolari riconducibili a tre processi noti come la triade di Virchow: la disfunzione vascolare, l'alterazione del flusso vascolare e l'attivazione piastrinica. Le HDL, infatti, inibiscono l'espressione dei fattori tissutali come la E-selectina e la P-selectina e preservano le caveole, porzioni specializzate della membrana dove è localizzato l'enzima ossido nitrico sintasi endoteliale (eNOS), oltre che agire come agonisti dello stesso enzima, contribuendo quindi alla produzione di

ossido nitrico (NO), un potente vasodilatatore. Le HDL contribuiscono inoltre alla sintesi di prostaciclina, che agisce sinergicamente a NO inducendo il rilassamento del tono vascolare e l'inattivazione piastrinica. Infine, le HDL riducono la produzione di trombina, responsabile dell'attivazione delle piastrine.

5. HDL e immunità

Negli ultimi anni è emerso un ruolo rilevante delle HDL nell'immunità innata e adattativa (10); livelli ridotti di HDL-c, per esempio, comportano una risposta infiammatoria eccessiva e sono inversamente correlati con la severità della sepsi. È stato dimostrato che apolipoproteine, quali apoA-I, e specifiche molecole associate alle HDL, come la sfingosina 1-fosfato (S1P), sono in grado di modulare vie di segnalazione coinvolte nell'immunità innata e adattativa, regolando, in particolar modo, il contenuto lipidico dei lipid rafts, in cui sono localizzati i principali recettori delle cellule immunitarie, quali il complesso maggiore di istocompatibilità-II (MHC-II), i recettori Toll-like (TLRs), i recettori delle cellule T (TCR) e B (BCR). Ne consegue una possibile modulazione dell'equilibrio tra il fenotipo macrofagico M1 proinfiammatorio a favore di macrofagi M2, ad attività prevalentemente antinfiammatoria. Inoltre, la S1P associata alle HDL, attraverso la modulazione di recettori localizzati nei lipid rafts, contribuisce a regolare la quota di linfociti circolanti e quella localizzata nei linfonodi, oltre che il processo di differenziamento delle sottoclassi di linfociti. Attraverso la modulazione del contenuto lipidico dei rafts in cui è localizzato MHC-II, le HDL interferiscono anche con la presentazione dell'antigene in monociti e linfociti. Inoltre, le HDL sono in grado di modulare l'immunità umorale innata, attraverso la regolazione dell'attivazione del sistema del

complemento e della Pentraxina 3 (PTX3), una proteina di fase acuta in grado di riconoscere diversi ligandi, come componenti microbiche, il complemento stesso e la P-selectina. Infine, le HDL ed i suoi componenti sono coinvolti nella protezione contro infezioni da batteri Gram-negativi, Gram-positivi e parassiti, mentre il ruolo delle HDL nelle infezioni virali è ancora dibattuto.

Conclusioni

Le HDL ricoprono un ruolo di primaria importanza nella modulazione del processo aterosclerotico alla base della malattia cardiovascolare, attraverso la modulazione di numerosi processi. In particolare, la funzione delle HDL, che non sempre correla con i livelli plasmatici, quanto piuttosto con la dimensione e la composizione di queste lipoproteine, si basa non solo sulla promozione del trasporto inverso del colesterolo, ma anche sul coinvolgimento in diversi processi correlati all'aterogenesi, come l'infiammazione, i processi ossidativi, la trombosi e l'immunità. I dati elencati in questa rassegna suggeriscono l'importanza di valutare composizione e funzione delle HDL come potenziali target terapeutici per lo sviluppo di strategie farmacologiche innovative per le malattie cardiovascolari e altre patologie.

Bibliografia

1. Gordon T, Castelli WP, Hjortland MC, et al. High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease. The Framingham Study. *Am. J. Med.* 1977; 62: 707-14.
2. Voight BF, Peloso GM, Orho-Melander M, et al. Plasma HDL cholesterol and risk of myocardial infarction: a mendelian randomisation study. *Lancet.* 2012; 380: 572-80.
3. 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: 2478-86.
4. Kontush A, Lindahl M, Lhomme M, et al. Structure of HDL: particle subclasses and molecular components. *Handb. Exp. Pharmacol.* 2015; 224: 3-51.
5. Calabresi L, Gomaschi M, Franceschini G. High-density lipoprotein quantity or quality for cardiovascular prevention? *Curr. Pharm. Des.* 2010; 16: 1494-503.
6. Zanotti I, Favari E, Bernini F. Cellular cholesterol efflux pathways: impact on intracellular lipid trafficking and methodological considerations. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 2012; 13: 292-302.
7. Soria-Florido MT, Schröder H, Grau M, Fitó M, Lassale C. High density lipoprotein functionality and cardiovascular events and mortality: A systematic review and meta-analysis. *Atherosclerosis* 2020; 302: 36-42.
8. Kontush A, Chapman MJ. Antiatherogenic function of HDL particle subpopulations: Focus on antioxidative activities. *Curr. Opin. Lipidol.* 2010; 21: 312-8.
9. Mineo C, Deguchi H, Griffin JH, Shaul PW. Endothelial and antithrombotic actions of HDL. *Circ. Res.* 2006; 98: 1352-64.
10. Pirillo A, Catapano AL, Norata GD. HDL in infectious diseases and sepsis. *Handb. Exp. Pharmacol.* 2015; 224: 483-508.