

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II



**DOTTORATO DI RICERCA IN
MEDICINA CLINICA E SPERIMENTALE**

CURRICULUM IN

SCIENZE CARDIOVASCOLARI E GERONTOLOGICHE

XXIX Ciclo

Coordinatore: Prof. Gianni Marone

TESI DI DOTTORATO

**ASSOCIAZIONE TRA COLESTEROLO DELLE DIVERSE FRAZIONI
LIPOPROTEICHE ED ATEROSCLEROSI SUBCLINICA IN UN
CAMPIONE DI DONNE NAPOLETANE**

TUTOR/RELATORE

Chiar.mo

Prof. Paolo Osvaldo Rubba

CANDIDATA

Dott.ssa Ersilia La Fata

SOMMARIO

INTRODUZIONE.....	3
METODI.....	10
ANALISI STATISTICA.....	19
RISULTATI.....	21
DISCUSSIONE.....	24
BIBLIOGRAFIA.....	32
TABELLE.....	43
FIGURE.....	46

INTRODUZIONE

Il colesterolo plasmatico costituisce un ormai consolidato fattore di rischio cardiovascolare (1). La riduzione della colesterolemia e del colesterolo LDL (LDL-C) diminuisce sia il rischio di coronaropatia sia di ictus (2,3). Un'analisi dei dati clinici pubblicati e dei trials finalizzati ad una riduzione del colesterolo LDL indica come sia possibile ottenere un calo del rischio relativo tra il 25% ed il 40% (4). Pur tuttavia, anche in soggetti che con terapia ipocolesterolemizzante raggiungono il target di LDL-C prefissato, permane un rischio di mortalità e morbilità per malattia cardiovascolare (rischio residuo) (4). Un ruolo viene sicuramente giocato dagli altri fattori di rischio cardiovascolare noti (diabete, ipertensione arteriosa, fumo di sigaretta, sovrappeso) ma, probabilmente,

anche altri fattori lipidici, oltre al LDL-C, hanno importanza nel determinismo di questo rischio residuo.

Evidenze epidemiologiche hanno evidenziato, in analisi univariate, l'importanza della trigliceridemia (TG) e del colesterolo HDL (HDL-C) come fattori di rischio per malattie cardiovascolari (5,6).

In uno studio epidemiologico italiano i livelli di trigliceridi rappresentavano un predittore significativo di malattia cardiovascolare in donne di età >65 anni e le donne nel quintile più alto avevano un rischio 2.5 volte superiore delle donne nel primo quintile di morire per cardiopatia ischemica, anche dopo aggiustamento per obesità, diabete, alcool; il rischio aumentava a circa 4 volte se erano presenti anche bassi valori di HDL (7).

In altri studi però, la correzione per altri fattori di rischio cardiovascolari (in particolare BMI e iperglicemia) hanno fatto perdere a TG e HDL il ruolo di fattori di rischio "indipendenti", anche perché esiste una stretta associazione inversa tra questi due parametri lipidici.

Inoltre, alcuni trials negativi su end-points "forti", come la mortalità per tutte le cause, di farmaci in grado di aumentare le HDL (8) o di ridurre la trigliceridemia (9), hanno fatto calare l'interesse del mondo scientifico e delle aziende farmaceutiche sullo sviluppo di nuovi farmaci in grado di agire su HDL-C e TG.

Una possibile chiave interpretativa della discrepanza tra le evidenze epidemiologiche e i risultati dei trials clinici potrebbe essere che la focalizzazione dell'interesse scientifico

non deve essere posta solo sulle concentrazioni sieriche di HDL-C e TG ma anche su parametri in grado di darci informazioni su tutte le frazioni lipoproteiche e sul colesterolo "remnant".

Un recente studio ha dimostrato che l'aumento del colesterolo "remnant" in pazienti non a digiuno, è associato ad un aumentato rischio di cardiopatia ischemica indipendentemente dal valore delle HDL. Ciò implica che l'elevato contenuto in colesterolo delle particelle lipoproteiche ricche in trigliceridi è tra le cause della cardiopatia ischemica (10).

Pochi studi hanno finora valutato il rapporto tra colesterolo contenuto nelle diverse frazioni lipoproteiche ed aterosclerosi carotidea.

Lo spessore medio-intimale carotideo (IMT), valutato mediante esame ultrasonografico B-mode, rappresenta il marker surrogato di aterosclerosi sistemica maggiormente studiato ed utilizzato, anche e soprattutto in relazione al fatto che la sua determinazione è non invasiva, sicura, facilmente ripetibile e poco costosa. L'IMT è predittivo di eventi cardiovascolari (11,12).

Un aumento dell'IMT a livello della carotide comune è associato ad un aumento del rischio di ictus e di infarto acuto del miocardio (13).

La disponibilità di nuove tecnologie in grado di fornire informazioni sul colesterolo contenuto nelle diverse frazioni lipoproteiche, senza dovere ricorrere a metodiche lunghe e costose come l'ultracentrifugazione analitica, ha permesso di

indagare in maniera semplice e ripetibile sul ruolo giocato dalle diverse lipoproteine nel determinismo dell'aterosclerosi.

In particolare, il sistema Lipoprint (Quantimetrix Inc., Ridondo Beach, California) è una metodica basata sulla pre-colorazione delle frazioni lipidiche sieriche con Sudan black e sulla successiva elettroforesi in gradiente di gel di poliacrilammide al 3% non-denaturato (14). Fornisce informazioni sulla distribuzione delle lipoproteine, misura i livelli di colesterolo esterificato di ciascuna frazione e permette il confronto con il range di normalità. E' un metodo in grado di separare fino a 12 frazioni lipoproteiche a grandezza decrescente e crescente densità e mobilità elettroforetica: 1 frazione di lipoproteine a bassissima

densità (VLDL), 3 frazioni di lipoproteine a densità intermedia (IDL), 7 frazioni di lipoproteine a bassa densità (LDL) , 1 frazione di lipoproteine ad alta densità (HDL).

Scopo del presente studio e' stato di valutare la relazione tra colesterolo contenuto nelle VLDL, nelle IDL, nelle LDL, nelle HDL, dosate con la metodica Lipoprint® e lo spessore medio-intimale carotideo (IMT), in una popolazione di donne napoletane in età post-menopausale.

METODI

Caratteristiche della popolazione studiata

Il Progetto ATENA (15) è un'indagine epidemiologica che si propone di studiare le cause ambientali, biologiche e genetiche alla base delle principali malattie cronico-degenerative nella donna ossia le malattie cardiovascolari (infarto del miocardio, ictus cerebrale) e i tumori più frequenti nel sesso femminile (mammella, polmone). Tale progetto nasce dalla consapevolezza che tali patologie costituiscono un problema rilevante in termini sia clinici che economici: sono la causa del 65% delle morti nella popolazione femminile italiana e rappresentano oltre il 70% del carico di lavoro del sistema sanitario. Tra il maggio 1993

e l'ottobre 1996 sono state visitate 5.062 donne, di età compresa tra i 30 ed i 69 anni, residenti nell'area napoletana, e non affette dalle malattie di cui la ricerca si propone di studiare le cause. Circa 400 di queste donne provenivano da una selezione casuale effettuata dalle liste anagrafiche della città di Napoli. Le restanti, sensibilizzate attraverso campagne informative, hanno risposto volontariamente all'appello. Tutte le partecipanti hanno sottoscritto il consenso informato. Ciò affinché i dati raccolti (compresi quelli relativi ad eventuali futuri ricoveri o certificazioni di morte) ed i campioni biologici ottenuti conservati in azoto liquido (-80°C) ed organizzati in una banca dati, fossero accessibili ed utilizzabili a fini scientifici, nel rispetto della legislazione sulla tutela dei dati personali; lo studio è stato approvato dal comitato etico delle istituzioni coinvolte. A

circa 10 anni dalla prima visita, è stato effettuato un richiamo di 228 donne, randomizzate tra le più anziane. A queste donne, tutte in menopausa, sono state praticate indagini cliniche, biochimiche ed ultrasonografiche. Il nostro campione di osservazione è costituito dai dati derivati da tali indagini incluso il dosaggio delle lipoproteine attraverso il sistema Lipoprint®.

Valutazione clinica e biochimica

Le misurazioni antropometriche sono state eseguite con le pazienti vestite e senza scarpe. E' stato calcolato l'indice di massa corporea, utilizzato come indice di obesità, dividendo il peso (chilogrammi) con l'altezza (in metri quadri). La circonferenza addominale come marcatore di obesità addominale è stata misurata a metà fra la parte inferiore

della gabbia toracica e l'estremità superiore della cresta iliaca. La pressione brachiale arteriosa a riposo è stata misurata 2 volte dopo un intervallo ≥ 5 minuti a riposo, usando uno sfigmomanometro zero-random. Un questionario standard è stato usato per raccogliere informazioni riguardo alle abitudini al fumo. Sono stati raccolti campioni di sangue dopo 12-14 ore di digiuno, dalle 8.00 alle 9.30 del mattino, per ridurre l'influenza della variazione circadiana. Le concentrazioni di colesterolo totale e di trigliceridi sono state misurate usando metodi enzimatici standard (16,17). Il colesterolo HDL è stato misurato dopo la precipitazione di lipoproteine a densità molto bassa e di lipoproteine a bassa densità con acido fosfotungstenico (18), e il colesterolo LDL è stato calcolato con la formula di Friedewald. I livelli di glucosio a digiuno sono stati determinati enzimaticamente

con il metodo della perossidasi. I livelli di insulina a digiuno sono stati determinati utilizzando un dosaggio immunoenzimatico (Ultrasensitive Insulin Elisa, Mercodia, Sweden). L'errore del metodo è stato valutato in 2 sieri a concentrazione bassa ed alta di insulina ed è risultato del 10%. L'apolipoproteina B e la PCR ultrasensibile (hs-PCR) sono state misurate con metodo turbidimetrico automatizzato (Cobas-Mira, Roche, Italia). L'errore del metodo è stato valutato analizzando giornalmente un campione di plasma ed è risultato del 5%. L'indice di insulino-resistenza (HOMA) è stato calcolato utilizzando la seguente formula: $\text{insulina a digiuno (uU/ml)} \times \text{glucosio sierico a digiuno (mM)} / 22,5$, come descritto da Matthews et al (19).

Dosaggio delle lipoproteine

La separazione delle lipoproteine è stata effettuata utilizzando il Sistema Lipoprint (Quantimetrix Inc., Redondo Beach, California). Questo metodo si basa sulla pre-colorazione delle frazioni lipidiche con Sudan black e sulla successiva elettroforesi in gradiente di gel di poliacrilammide non denaturato al 3% (20,21). Sono state separate 12 subfrazioni (1 VLDL, 3 IDL, 7 LDL, 1 HDL) del colesterolo a grandezza decrescente e a crescente densità e mobilità elettroforetica (Rf). I coefficienti di variazioni inter- e intra-dosaggio per il colesterolo nelle 12 subfrazioni sono risultati essere <10%.

Ultrasonografia carotidea B-mode ad alta risoluzione

L'esame ultrasonografico carotideo B-mode ad alta risoluzione è stato eseguito da un sonografista esperto utilizzando un apparecchio Biosound 2000 II s.a. (Biosound Inc.) ed il software EPIX ® XCAP V3.0 for Windows. Sono state effettuate misurazioni sulla parete anteriore e posteriore sia del tratto distale (pari ad 1 cm) dell'arteria carotide comune (CC) sia del bulbo carotideo di ciascun lato, utilizzando come repere anatomico lo sperone all'origine della biforcazione carotidea. In ogni esame, il sonografista ha usato diversi angoli di scannerizzazione (anteriore, laterale e posteriore) per identificare lo spessore massimo dell'IMT in ogni parete. Le immagini sono state registrate su cassette Super VHS per le analisi successive (22). Per la lettura

dell'IMT sono state selezionate le immagini che meglio evidenziavano il "doppio binario" dello spessore medio-intimale. Sono state effettuate 5 letture della parete carotidea destra anteriore, 5 letture della parete carotide destra posteriore, 5 letture della parete carotide sinistra anteriore, 5 letture della parete carotide sinistra posteriore (totale 20 letture). Analoga procedura è stata utilizzata per la lettura dello spessore medio-intimale a livello del bulbo carotideo. È stato definito come mean-mean CC la media dei valori di tutti gli spessori medio-intimale misurati (media di 20 valori), come mean-max CC la media dei singoli valori massimi di IMT per ciascun segmento (media di 4 valori), come T-max CC il massimo valore di spessore medio-intimale misurato tra tutte le pareti dell'arteria carotide comune di ciascun lato (valore singolo). Mean-mean bulbo, mean-max bulbo e T-max

bulbo sono i valori corrispondenti riferiti alle misurazioni effettuate a livello del bulbo carotideo. Mentre il mean-mean riflette l'estensione del processo aterosclerotico a livello carotideo, il T-max dà un'idea della severità dell'aterosclerosi carotidea. In particolare, nel presente studio un valore di T-max della CC ≥ 1.2 mm è stato considerato come placca della carotide comune, mentre un valore di T-max bulbo > 1.5 mm è stato scelto per la definizione di placca a livello del bulbo.

E' stato possibile ottenere le misurazioni dell'IMT della carotide comune e del bulbo carotideo in tutti i 228 soggetti reclutati nello studio. Dati di controllo qualità continuamente monitorizzati, derivanti da un grande trial multicentrico internazionale (Studio ELSA), condotto in quel periodo nella Division of Vascular Ultrasound Research (Wiston-Salem, NC, USA), hanno mostrato un coefficiente di riproducibilità

per l'IMT della carotide comune di 0,85. Questo parametro include la variabilità di strumentazione, sonografista, lettore (23).

ANALISI STATISTICA

L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando la versione 12.0 del programma SPSS (SPSS, Inc., Chicago, Illinois).

Le variabili continue sono state descritte come media o media geometrica e deviazione standard. Ai fini dell'analisi statistica i valori di HDL-C, LDL-C, IDL-C, VLDL-C sono stati stratificati per tertili. La presenza di placca a livello della carotide comune è stata definita per valori di T-max \geq 1.2 mm (mediana di T-max CC), a livello del bulbo per valori di T-max $>$ 1.5 mm (mediana di T-max bulbo).

La regressione lineare è stata usata per confrontare le variabili continue. La regressione logistica è stata utilizzata per testare la relazione tra i tertili di HDL-C, VLDL-C, IDL-C, LDL-C, TG e il rischio di placca alla carotide comune ed al bulbo carotideo. I risultati sono stati espressi attraverso gli Odds Ratio (OR) con gli intervalli di confidenza al 95% (95% CI). Sono state inserite come covariate età, fumo, pressione arteriosa sistolica, glicemia, IMC, HDL-C.

Valori di $p < 0.05$ sono stati considerati significativi.

RISULTATI

Le caratteristiche demografiche, cliniche e biochimiche della popolazione studiata sono illustrate nella tabella 1. Le donne costituenti il campione hanno un'età che va dai 43 agli 81 anni con un'età media di 63 anni, un IMC medio di 28.2 kg/m², valori medi di colesterolemia di 224 mg/dl.

La Figura 1 mostra l'associazione, statisticamente significativa ($r=0.86$, $p<0.001$), tra VLDL-C misurato nel nostro laboratorio con metodica Lipoprint e Remnant-colesterolo calcolato secondo la formula proposta da Varbo et al (24).

La Tabella 2 mostra che VLDL-C ha una correlazione positiva e statisticamente significativa con T-max CC ($r=0.26$, $p<0.001$). Tale associazione è confermata anche dopo

correzione per i principali fattori confondenti ($r=0.45$, $p<0.04$). LDL-C e IDL-C hanno un'associazione statisticamente significativa con T-max CC, ma questa associazione viene persa dopo correzione per i principali fattori confondenti. HDL-C non mostra alcuna associazione statisticamente significativa con T-max CC.

La Tabella 3 mostra un'associazione statisticamente significativa tra mean-mean CC con IDL-C e VLDL-C; tale associazione perde però la significatività statistica se vengono aggiunti nell'analisi i fattori di rischio confondenti.

Il II ed il III tertile di VLDL-C sono associati ad un rischio doppio rispetto al I tertile di presentare una placca carotidea alla carotide comune (rispettivamente OR 2.0, 95% CI 1.01 - 3.98, $p=0.047$ e OR 2.02, 95% CI 1.05 - 3.90, $p=0.034$) (Figura

2); a livello del bulbo il III tertile di VLDL-C presenta un rischio 2.3 volte superiore di placca rispetto al I tertile (OR 2.31, 95% CI 1.19 - 4.35, $p=0.013$) (Figura 3).

VLDL-C + IDL-C risultano significativamente associate con la presenza di placche alla carotide comune: in particolare il II tertile rispetto al primo presenta un OR di 2 (95% CI 1.01-3.89, $p=0.047$) ed il III tertile rispetto al I un OR di 2 (95% CI 1.05-3.90, $p=0.034$). Nella Figura 4 sono riportate le associazioni tra placca alla carotide comune e tertili di VLDL-C + IDL-C, dopo aggiustamento per età, pressione arteriosa sistolica, glicemia, fumo di sigaretta, IMC e HDL-C ed è possibile osservare come venga conservata la significatività statistica tra il terzo tertile ed il primo.

I trigliceridi anche presentano un'associazione con le placche alla carotide comune: il III tertile rispetto al I mostra un OR di 1.8 (95% CI 1.07-3.05, $p=0.027$), ma a differenza di quanto avviene per VLDL-C + IDL-C, questa significatività viene perduta dopo aggiustamento per età, pressione arteriosa sistolica, glicemia, fumo di sigaretta, IMC e HDL-C (Figura 5).

DISCUSSIONE

In letteratura non ci sono molti studi sull'associazione tra colesterolo delle diverse frazioni lipoproteiche ed IMT.

In un recente lavoro il nostro gruppo ha mostrato un'associazione statisticamente significativa tra le LDL piccole e dense (sdLDL, dosate con Lipoprint) e l'ispessimento medio-intimale carotideo

in donne post-menopausali; tale associazione persisteva anche dopo aggiustamento per età ed apoB (25).

In uno studio giapponese condotto su uomini apparentemente sani, le uniche frazioni lipoproteiche (misurate con HPLC) che si associavano ad IMT erano le "small" VLDL-C e le "large" e "very small" LDL-C; nessuna associazione era presente per HDL-C (26).

In uno studio su 156 uomini in apparente buona salute, condotto a Milano, le concentrazioni di colesterolo nelle lipoproteine ricche in trigliceridi (TGRL) e nelle sdLDL risultavano predittori indipendenti di IMT carotideo ed erano associate con un'attivazione pro-infiammatoria monocitaria ed endoteliale (27).

Nello studio MARS, le IDL erano le sole lipoproteine significativamente correlate con la progressione dell'IMT carotideo (28).

In uno studio su endoarteriectomie carotidee il contenuto in macrofagi delle placche si associava alla concentrazione plasmatica del colesterolo contenuto nelle VLDL, nelle IDL e nelle sdLDL, mentre non vi era alcuna correlazione con LDL-C, HDL-C e trigliceridemia (29).

Infine in uno studio condotto come il nostro in donne post-menopausali il contenuto in calcio delle coronarie si associava alle VLDL, alle sdLDL ma non alle LDL e tali risultati si confermavano anche dopo aggiustamento per età, fumo, pressione arteriosa, trigliceridi ed HDL-C (30).

Quindi negli studi in cui le diverse classi lipoproteiche sono state misurate e non calcolate le frazioni lipoproteiche più spesso associate con aterosclerosi sono state VLDL, IDL, sdLDL e non LDL nè HDL.

Il presente studio mostra l'esistenza di una correlazione statisticamente significativa e positiva tra colesterolo delle lipoproteine VLDL (VLDL-C) ed aterosclerosi subclinica, espressa come spessore medio-intimale carotideo (IMT). L'IMT, valutato mediante esame ultrasonografico B-mode, rappresenta il marker surrogato di aterosclerosi sistemica maggiormente studiato ed utilizzato; anche e soprattutto in relazione al fatto che la sua determinazione è non invasiva, sicura, facilmente ripetibile e poco costosa.

In particolare, si è evidenziata un'associazione statisticamente significativa tra VLDL-C e T max CC. E' emersa, altresì, una debole associazione tra T max CC ed il colesterolo delle lipoproteine LDL ed IDL, che però scompariva dopo la correzione per fattori confondenti. Lo studio non ha evidenziato l'esistenza di

una correlazione tra T max CC e HDL-C. E' stato osservato nel nostro studio che i pazienti con i valori più elevati di VLDL-C avevano un rischio doppio (rispetto a quelli con valori di VLDL-C più bassi) di avere una placca a livello dell'arteria carotide comune. Inoltre valori elevati di VLDL-C + IDL-C hanno mantenuto l'associazione statisticamente significativa con la presenza di placche alla carotide comune anche dopo correzione per i principali fattori di rischio cardiovascolari, compreso IMC e HDL-C, a differenza di quanto avvenuto per elevati valori di trigliceridemia.

E' noto come nella genesi della lesione aterosclerotica un ruolo preminente spetta a LDL-C, che costituisce un ormai consolidato fattore di rischio cardiovascolare; una riduzione del suo valore si associa ad una diminuzione del rischio di coronaropatia e di ictus.

Tra le LDL, sdLDL sono un riconosciuto fattore di rischio cardiovascolare ed un marker di aterosclerosi carotidea. Nella genesi della lesione aterosclerotica non sembrano essere invece direttamente coinvolte VLDL-C e IDL-C. Come è possibile allora spiegare la forte associazione di VLDL-C e, soprattutto, della somma di VLDL-C + IDL-C con le placche a livello carotideo, documentata sia in questo nostro studio sia in altri studi?

In un'analisi del Framingham Heart Study condotta su 1567 donne, il colesterolo delle particelle remnant (RLP-C) misurato a digiuno era significativamente associato con la malattia cardiovascolare, anche dopo aggiustamento per i principali fattori di rischio (31).

Il colesterolo-remnant è contenuto nelle lipoproteine ricche in trigliceridi (VLDL e IDL) nella fase di digiuno ed è presente in

queste 2 lipoproteine e nei chilomicroni remnant dopo aver mangiato (24).

Verosimilmente il dosaggio delle concentrazioni plasmatiche di VLDL-C + IDL-C rappresenta una stima di colesterolo-remnant di origine epatica, uno tra i fattori potenzialmente contribuenti al rischio cardiovascolare residuo. Nel nostro studio abbiamo documentato una fortissima correlazione tra il colesterolo-remnant calcolato con il metodo proposto da Varbo et al. (valido soprattutto nella fase post-prandiale) e il dosaggio di VLDL-C e VLDL-C + IDL-C con metodo Lipoprint. Varbo et al. hanno recentemente dimostrato come remnant-colesterolo rappresenti un fattore di rischio per cardiopatia ischemica e come elevati livelli si associno a cardiopatia ischemica e ad infiammazione sistemica di basso grado. Remnant-colesterolo negli studi condotti da questo gruppo danese, e' stato calcolato sottraendo al

colesterolo totale (CT), HDL-C + LDL-C, quest'ultimo definito dalla formula di Friedewald per valori di trigliceridi < 400 mg/dl (24).

Il vantaggio nel nostro studio è che i dati sono misurati con una metodica precisa ed affidabile e non calcolati con una formula indiretta.

In conclusione, il presente studio indica che elevati livelli di VLDL-C e di VLDL-C + IDL-C sono direttamente correlati ad aterosclerosi carotidea indipendentemente dai principali fattori di rischio cardiovascolari. Elevate concentrazioni di VLDL-C + IDL-C, a differenza di quanto avviene per elevati valori di TG, si associano in maniera indipendente al rischio di placca carotidea e il loro dosaggio rappresenta quindi un utile strumento per la quantificazione del rischio cardio-vascolare.

BIBLIOGRAFIA

1. Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation*. 2002; 106:3143–4211.

2. Grundy SM, Cleeman JI, Merz CN, Brewer HB Jr, Clark LT, Hunninghake DB, Pasternak RC, Smith SC Jr, Stone NJ; Coordinating Committee of the National Cholesterol Education Program. Implications of recent clinical trials for the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III Guidelines. *J Am Coll Cardiol*. 2004; 44:720–732.

3. Baigent C, Keech A, Kearney PM, Blackwell L, Buck G, Pollicino C, Kirby A, Sourjina T, Peto R, Collins R, Simes R;

Cholesterol Treatment Trialists' (CTT) Collaborators. Efficacy and safety of cholesterol lowering treatment: prospective meta-analysis of data from 90,056 participants in 14 randomised trials of statins. *Lancet*. 2005; 366: 1267–1278

4. Cannon CP, Braunwald E, McCabe CH, Rader DJ, Rouleau JL, Belder R, Joyal SV, Hill KA, Pfeffer MA, Skene AM; Pravastatin or Atorvastatin Evaluation and Infection Therapy-Thrombolysis in Myocardial Infarction 22 Investigators. Intensive versus moderate lipid lowering with statins after acute coronary syndromes. *N Engl J Med*. 2004; 350:1495-1504.

5. Sarwar N, Danesh J, Eiriksdottir G, Sigurdsson G, Wareham N, Bingham S, Boekholdt SM, Khaw KT, Gudnason

V. Triglycerides and the risk of coronary heart disease:

10,158 incident cases among 262,525 participants in 29

Western prospective studies. *Circulation*. 2007;115:450–458.

6. Amarenco P, Labreuche J, Touboul PJ. High-density lipoprotein-cholesterol and risk of stroke and carotid atherosclerosis: a systematic review. *Atherosclerosis*. 2008; 196:489–496.

7. Mazza A, Tikhonoff V, Schiavon L, Casiglia E. Triglycerides +high-density-lipoprotein-cholesterol dyslipidaemia, a coronary risk factor in elderly women: the Cardiovascular Study in the ELderly. *Intern Med J*. 2005; 35: 604–610.

8. Barter PJ, Caulfield M, Eriksson M, Grundy SM, Kastelein JJ, Komajda M, Lopez-Sendon J, Mosca L, Tardif JC, Waters DD, Shear CL, Revkin JH, Buhr KA, Fisher MR, Tall AR, Brewer B; ILLUMINATE Investigators. Effects of torcetrapib in patients

at high risk for coronary events. *N Engl J Med.* 2007;
357:2109-2122.

9. Keech A, Simes RJ, Barter P, Best J, Scott R, Taskinen MR, Forder P, Pillai A, Davis T, Glasziou P, Drury P, Kesäniemi YA, Sullivan D, Hunt D, Colman P, d'Emden M, Whiting M, Ehnholm C, Laakso M; FIELD study investigators. Effects of long-term fenofibrate therapy on cardiovascular events in 9795 people with type 2 diabetes mellitus (the FIELD study): randomised controlled trial. *Lancet.* 2005; 366:1849-1861.

10. Varbo A, Benn M, Tybjærg-Hansen A, Jørgensen AB, Frikke-Schmidt R, Nordestgaard BG. Remnant cholesterol as a causal risk factor for ischemic heart disease. *J Am Coll Cardiol.* 2013; 61: 427-436.

11. Lorenz MW, Markus HS, Bots ML, Rosvall M, Sitzer M. Prediction of clinical cardiovascular events with carotid

intima-media thickness: a systematic review and meta-analysis. *Circulation*. 2007; 115:459-467.

12. Polak JF, Pencina MJ, Pencina KM, O'Donnell CJ, Wolf PA, Sr D'Agostino RB. Carotid-wall intima-media thickness and cardiovascular events. *N Engl J Med*. 2011; 365:213-221.

13. Bots ML, Hoes AW, Koudstaal PJ, Hofman A, Grobbee DE. Common carotid intima-media thickness and risk of stroke and myocardial infarction the Rotterdam Study. *Circulation*. 1997; 6: 1432-1437.

14. Gentile M, Panico S, Jossa F, Mattiello A, Ubaldi S, Marotta G, Pauciullo P, Rubba P. Small dense LDL particles and metabolic syndrome in a sample of middle-aged women. Findings from Progetto Atena. *Clin Chim Acta*. 2008; 388:179-183.

15. Panico S, Dello Iacovo R, Celentano E, Galasso R, Muti P, Salvatore M, Mancini M. Progetto Atena, a study on the etiology of major chronic diseases in women: design, rationale and objectives. *Eur J Epidemiol.* 1992;8:601-608.

16. Siedel J, Schlumberger H, Klose S, Ziegenhorn J, Wahlefeld AW. Improved reagent for enzymatic determination of serum cholesterol. *J Clin Chem Biochem.* 1981;19:838-839.

17. Wahlefeld AW. Triglyceride determination after enzymatic hydrolysis, Bergmeyer H.U. (Ed.). *Methods of Enzymatic Analysis*, vol. 4, 2nd Ed (1974), Academic Press, NewYork. p.1831.

18. Lopes-Virella MF, Stone P, Ellis S, Colwell JA. Cholesterol determination in high-density lipoproteins separated by three different methods. *Clin Chem.* 1977;23:882-884.

19. Matthews DR, Hosker, JP, Rudenski, AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*. 1985;28:412-419.

20. Hoefner DM, Hodel SD, O'Brien JF, Branum EL, Sun D, Meissner I, McConnell JP. Quantitative method for LDL subfractionation with use of the Quantimetrix Lipoprint LDL System. *Clin Chem*. 2001;47:266-274.

21. Krauss RM, Burke DJ. Identification of multiple subclasses of plasma low-density lipoproteins in normal humans. *J Lipid Res*. 1982; 23:97-104.

22. De Michele M, Panico S, Iannuzzi A, Celentano E, Ciardullo AV, Galasso R, Sacchetti L, Zarrilli F, Bond MG, Rubba P. Association of obesity and central fat distribution with

carotid artery wall thickening in middle-aged women. *Stroke*. 2002; 33:2923-2928.

23. Tang R, Hennig M, Thomasson B, Sherz R, Ravinetto R, Catalini R, Rubba P, Zanchetti A, Bond MG. Baseline reproducibility of B-mode ultrasonic measurement of carotid artery intima-media thickness: the European Lacidipine Study on Atherosclerosis (ELSA). *J Hypertens*. 2000;18:197-201.

24. Varbo A, Benn M, Tybjaerg-Hansen A and Nordestgaard BG. Elevated Remnant Cholesterol Causes Both Low-Grade Inflammation and Ischemic Heart Disease, Whereas Elevated Low-Density Lipoprotein Cholesterol Causes Ischemic Heart Disease Without Inflammation. *Circulation*. 2013;128:1298-1309.

25. Gentile M, Panico S, Mattiello A, Ubaldi S, Iannuzzo G, De Michele M, Iannuzzi A, Rubba P. Association between small dense LDL and early atherosclerosis in a sample of menopausal women. *Clin Chem Acta*. 2013; 426:1-5.

26. Takahashi R, Taguchi N, Suzuki M, Cheng XW, Numaguchi Y, Tsukamoto H, Ikeda N, Murohara T, Okumura K. Cholesterol and triglyceride concentrations in lipoproteins as related to carotid intima-media thickness. *Int Heart J*. 2012; 53:29-34.

27. Norata GD, Raselli S, Grigore L, Garlaschelli K, Vianello D, Bertocco S, Zambon A, Catapano AL. Small dense LDL and VLDL predict common carotid artery IMT and elicit an inflammatory response in peripheral blood mononuclear and endothelial cells. *Atherosclerosis*. 2009; 206:556-562.

28. Hodis HN, Mack WJ, Dunn M, Liu C, Liu C, Selzer RH, Krauss RM. Intermediate-density lipoproteins and progression of carotid arterial wall intima-media thickness. *Circulation*. 1997; 95:2022-2026.

29. Zambon A, Puato M, Faggin E, Grego F, Rattazzi M, Pauletto P. Lipoprotein remnants and dense LDL are associated with features of unstable carotid plaque: a flag for non-HDL-C. *Atherosclerosis*. 2013; 230:106-109.

30. Mackey RH, Kuller LH, Sutton-Tyrrell K, Evans RW, Holubkov R, Matthews KA. Lipoprotein subclasses and coronary artery calcium in postmenopausal women from the healthy women study. *Am J Cardiol*. 2002; 90:71i-76i.

31. McNamara JR, Shah PK, Nakajima K, Cupples LA, Wilson PW, Ordovas JM, Schaefer EJ. Remnant-like particle (RLP) cholesterol is an independent cardiovascular disease risk

factor in women: results from the Framingham Heart Study.

Atherosclerosis. 2001; 154:229-236.

Tabella 1. Caratteristiche del campione (n=228).

	Media ± DS
Età (anni) [range]	63.1 ± 8.2 [43 - 81]
IMC (Kg/m ²)	28.1 ± 4.6
Colesterolemia Totale (mg/dL)	224.5 ± 38.4
Trigliceridemia (mg/dL)	101.0 ± 1.5*
HDL Colesterolemia (mg/dL)	57.8 ± 13.6
LDL Colesterolemia (mg/dL)	144.5 ± 34.4
Glicemia (mg/dL)	105.6 ± 25.0
Insulinemia (mU/mL)	6.92 ± 4.48
HOMA	1.77 ± 1.34
PCR (mg/dL)	2.66 ± 3.86
APO-B (g/L)	1.13 ± 0.23
Pressione Arteriosa Sistolica (mm Hg)	143.1 ± 21.2
Pressione Arteriosa Diastolica (mm Hg)	81.5 ± 8.9
Fumo di sigaretta (%)	Si 81 (35%)
	Ex 45 (20%)
	Mai 102 (45%)

DS: Deviazione Standard; * media geometrica

Tabella 2. Associazione tra colesterolo delle diverse frazioni lipoproteiche (Lipoprint) e T-max Carotide Comune.

Modelli	<u>HDL-C</u>			<u>LDL-C</u>			<u>IDL-C</u>			<u>VLDL-C</u>		
	r	R ²	P	r	R ²	p	r	R ²	p	r	R ²	p
Non corretto	0.08	0.01	0.23	0.14	0.02	0.04	0.15	0.02	0.02	0.26	0.07	0.0001
Modello 1	0.43	0.19	0.29	0.44	0.20	0.07	0.44	0.19	0.21	0.46	0.21	0.013
Modello 2	0.44	0.19	0.37	0.44	0.20	0.11	0.44	0.19	0.35	0.45	0.20	0.043

Modello 1: corretto per età + pressione arteriosa sistolica, fumo, glicemia.

Modello 2: corretto per variabili Modello 1 + IMC.

Tabella 3. Associazione tra colesterolo delle diverse frazioni lipoproteiche (Lipoprint) e mean-mean Carotide Comune.

Modelli	<u>HDL-C</u>			<u>LDL-C</u>			<u>IDL-C</u>			<u>VLDL-C</u>		
	r	R ²	p	r	R ²	p	r	R ²	p	r	R ²	p
Non corretto	0.03	0.01	0.67	0.11	0.01	0.09	0.15	0.02	0.02	0.25	0.06	0.001
Modello 1	0.52	0.27	0.89	0.53	0.28	0.20	0.53	0.28	0.24	0.53	0.28	0.052
Modello 2	0.53	0.28	0.76	0.53	0.28	0.32	0.53	0.28	0.30	0.54	0.29	0.13

Modello 1: corretto per età + pressione arteriosa sistolica, fumo, glicemia.

Modello 2: corretto per variabili Modello 1 + IMC.

Figura 1. Associazione tra VLDL-C dosato con metodica Lipoprint e Remnant-colesterolo calcolato con formula proposta da Varbo et al.

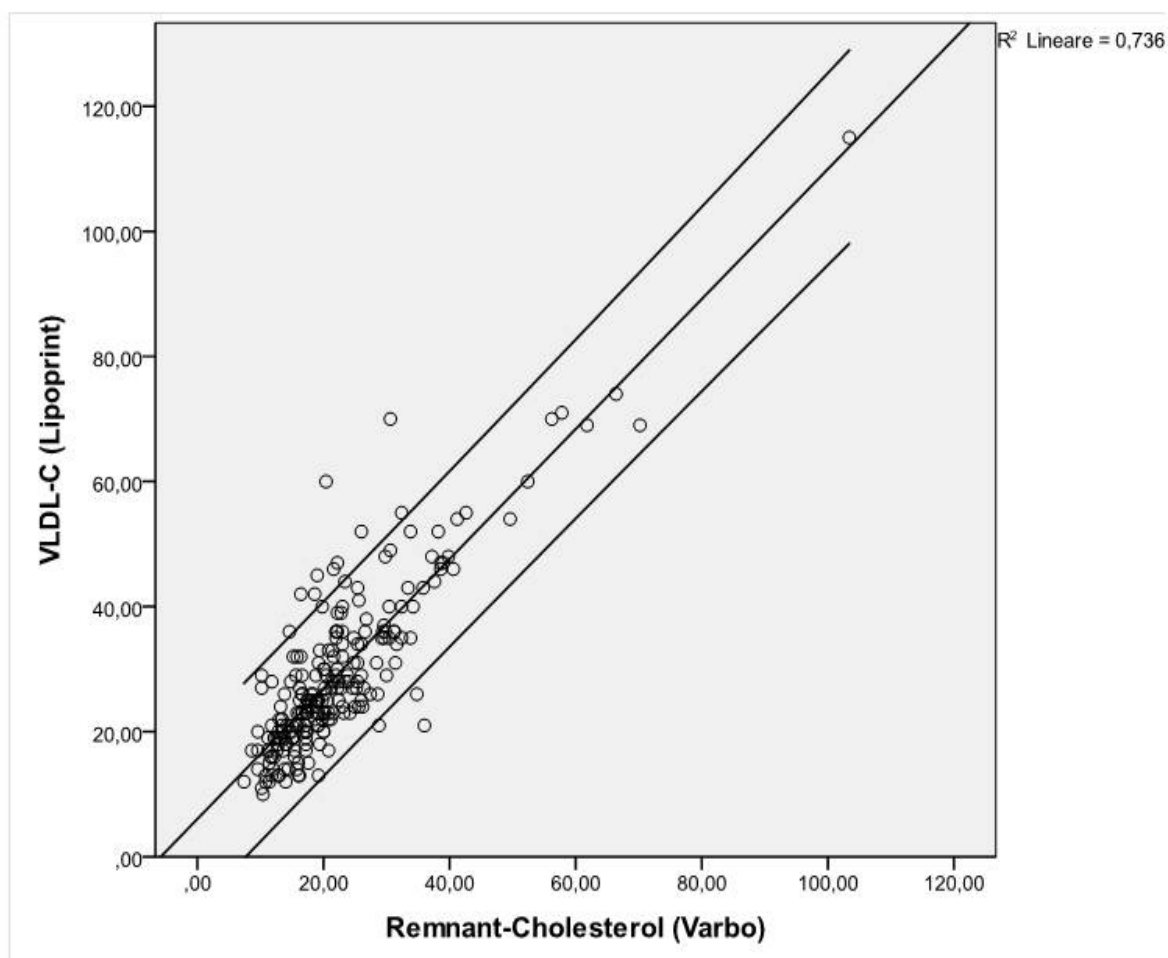
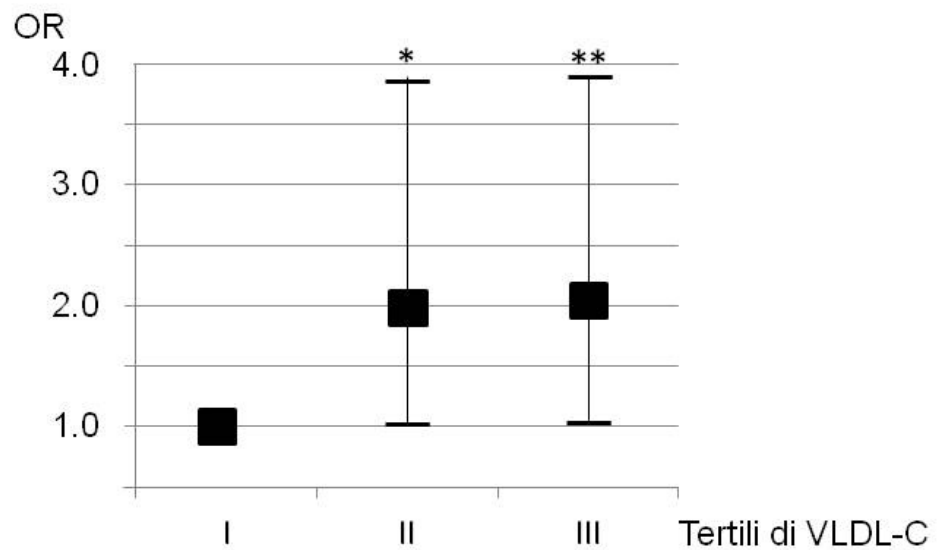


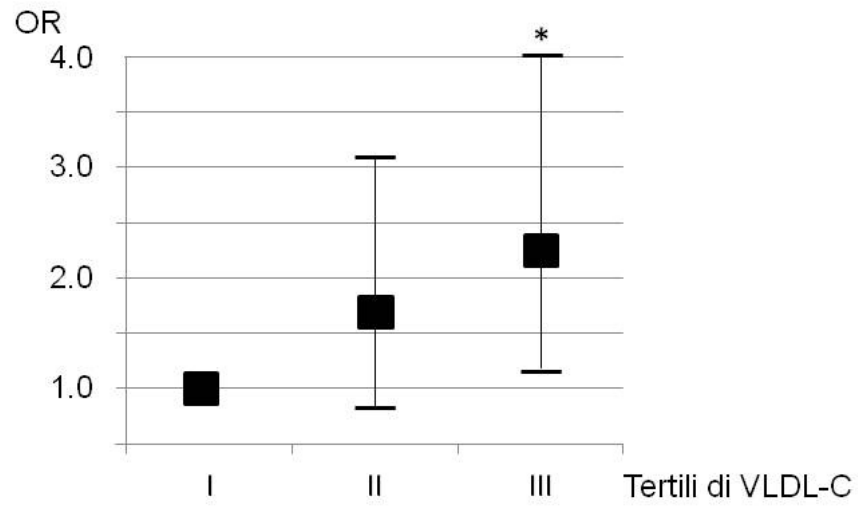
Figura 2. Rischio di placca alla Carotide Comune stratificato per Tertili di VLDL-C.



* P =0.047 (II vs I tertile)

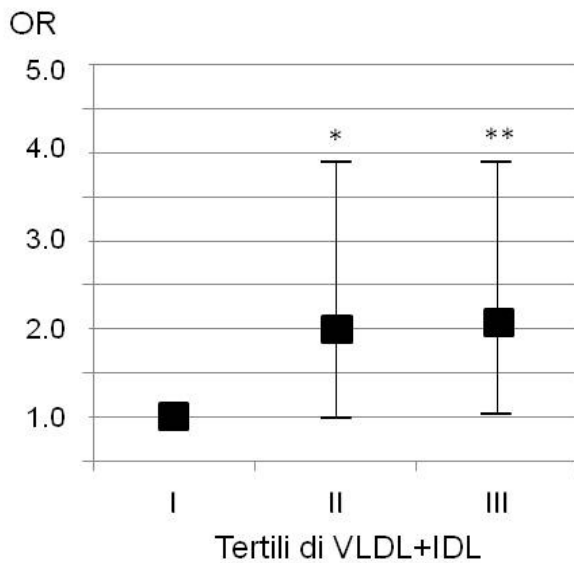
** P=0.034 (III vs I tertile)

Figura 3. Rischio di placca al Bulbo stratificato per Tertili di VLDL-C.

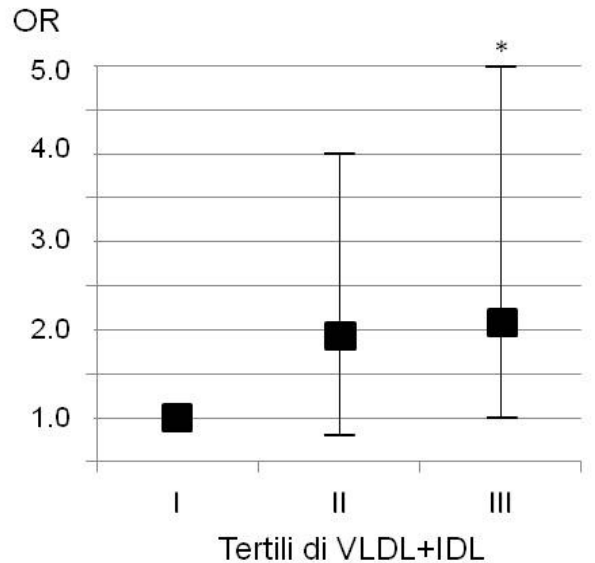


* P =0.013 (III vs I tertile)

Figura 4. Rischio di placca alla Carotide Comune stratificato per tertili di VLDL-C+IDL-C .

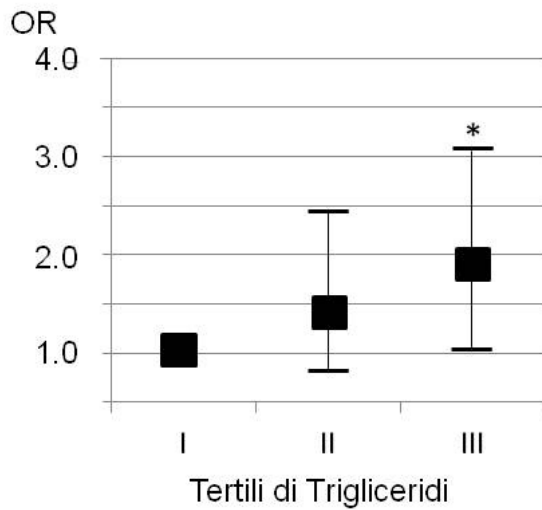


*P =0.047 (II vs I tertile)
** P=0.034 (III vs I tertile)

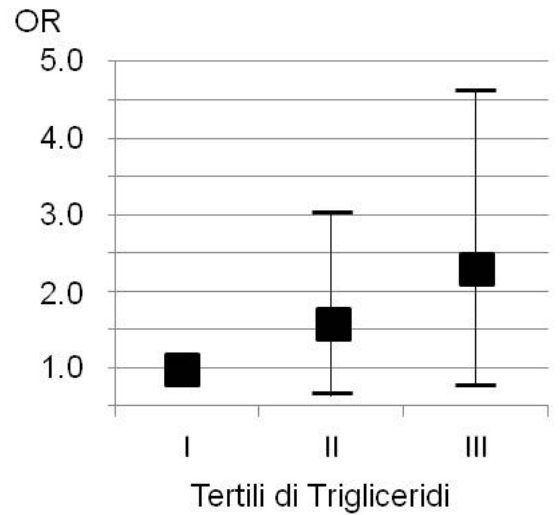


*P =0.046 (III vs I tertile)
Modello aggiustato per età, pressione arteriosa sistolica, fumo, glicemia, BMI, HDL

Figura 5. Rischio di placca alla Carotide Comune stratificato per tertili di Trigliceridi.



* P =0.027 (III vs I tertile)



Modello aggiustato per età, pressione arteriosa sistolica, fumo, glicemia, BMI, HDL.