

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II**

**DOTTORATO DI RICERCA  
IN  
BIOLOGIA APPLICATA**

**-XX CICLO-**

**Il trasporto inverso del colesterolo in conigli alimentati con  
dieta aterogena ed in topi infiammati con carragenina**

**Tutore**

**Prof. Paolo Abrescia**

**Candidato**

**Dr. Alessandro Carlucci**

**Coordinatore**

**Prof.ssa Amalia Virzo De Santo**

# INDICE

<b>1</b>	<b>INTRODUZIONE.....</b>	<b>3</b>
1.1	RUOLO E REGOLAZIONE DEL COLESTEROLO CELLULARE.....	3
1.2	LE LIPOPROTEINE PLASMATICHE.....	5
1.3	HDL E TRASPORTO INVERSO DEL COLESTEROLO (RCT).....	6
1.4	LECITINA-COLESTEROLO ACILTRANSFERASI (LCAT).....	10
1.5	APOLIPOPROTEINA A-I (APO A-I).....	12
1.3	APOLIPOPROTEINA E (APO E).....	14
1.4	APTOGLOBINA (HPT).....	16
1.5	ATEROSCLEROSI ED INFIAMMAZIONE.....	20
<b>2</b>	<b>MATERIALI E METODI.....</b>	<b>26</b>
2.1	MATERIALI.....	26
2.2	METODI.....	27
2.2.1	<i>Animali e programma di lavoro.....</i>	<i>27</i>
2.2.2	<i>Raccolta dei campioni di sangue e preparazione del plasma.....</i>	<i>28</i>
2.2.3	<i>Saggio colorimetrico per la determinazione della concentrazione proteica totale.....</i>	<i>29</i>
2.2.4	<i>Cromatografia di affinità con Eparina-Sefarosiso.....</i>	<i>30</i>
2.2.5	<i>Elettroforesi.....</i>	<i>31</i>
2.2.6	<i>Procedura ELISA per la titolazione di Hpt, Apo A-I ed Apo E.....</i>	<i>32</i>
2.2.7	<i>Saggio dell'attività di LCAT.....</i>	<i>33</i>
2.2.8	<i>Titolazione del colesterolo libero (C) e degli esteri del colesterolo (CE) nel plasma. Determinazione del rapporto CE/C.....</i>	<i>35</i>
2.2.9	<i>Legame del peptide P2a (sequenza 141-164 di Apo A-I) alle HDL.....</i>	<i>37</i>
2.2.10	<i>Stabilità del peptide P2a nel plasma dei topi infiammati.....</i>	<i>37</i>
2.2.11	<i>Tecniche per l'analisi istologica ed immunoistochimica dell'arco aortico di coniglio.....</i>	<i>38</i>
2.2.12	<i>Analisi statistica.....</i>	<i>40</i>
<b>3</b>	<b>SCOPO E RATIONALE DEL LAVORO.....</b>	<b>41</b>
<b>4</b>	<b>RISULTATI E INTERPRETAZIONE DEI DATI.....</b>	<b>43</b>
4.1	PREMESSA ALLO STUDIO DEL RCT NEI CONIGLI.....	43
4.1.1	<i>Attività di LCAT nel plasma dei conigli sottoposti a dieta normale o arricchita in colesterolo.....</i>	<i>44</i>
4.1.2	<i>Titolazione di Apo A-I, Apo E ed Hpt nel plasma dei conigli.....</i>	<i>47</i>
4.1.3	<i>Analisi delle sottofrazioni di HDL.....</i>	<i>51</i>
4.1.4	<i>Determinazione del rapporto CE/C nelle sottofrazioni di HDL.....</i>	<i>53</i>
4.1.5	<i>Analisi morfologica del fegato ed istologica dell'arco aortico.....</i>	<i>55</i>
4.1.6	<i>Rilevazione immunoistochimica di Apo A-I, Apo E e macrofagi nella parete arteriosa dell'arco aorico di coniglio.....</i>	<i>56</i>
4.1.7	<i>Commenti e considerazioni.....</i>	<i>58</i>
4.2	PREMESSA ALLO STUDIO DEL RCT NEI TOPI: PIANIFICAZIONE DELL'ESPERIMENTO.....	62
4.2.1	<i>Attività di LCAT nel plasma dei topi.....</i>	<i>63</i>
4.2.2	<i>Determinazione del rapporto CE/C nelle HDL.....</i>	<i>64</i>
4.2.3	<i>Effetti della carragenina sulla concentrazione di Hpt.....</i>	<i>65</i>
4.2.4	<i>Titolazione di Apo A-I ed Apo E nel plasma dei topi.....</i>	<i>66</i>
4.2.5	<i>Correlazione tra Hpt/Apo A-I ed esterificazione del colesterolo.....</i>	<i>68</i>
4.2.6	<i>Legame del peptide P2a sulle HDL.....</i>	<i>69</i>
4.2.7	<i>Stabilità del peptide P2a nel plasma dei topi infiammati.....</i>	<i>71</i>
4.2.9	<i>Commenti e considerazioni.....</i>	<i>72</i>
<b>5</b>	<b>CONCLUSIONI.....</b>	<b>75</b>
<b>6</b>	<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>77</b>
	<b>ABBREVIAZIONI.....</b>	<b>89</b>

# 1. INTRODUZIONE

## 1.1 Ruolo e regolazione del colesterolo cellulare

Il colesterolo (C) è un composto a 27 atomi di carbonio (Fig. 1), la cui via biosintetica è finemente regolata, onde mantenere un equilibrio ottimale tra la forma endogena, prodotta dagli epatociti e dagli enterociti, e quella esogena, introdotta con la dieta.

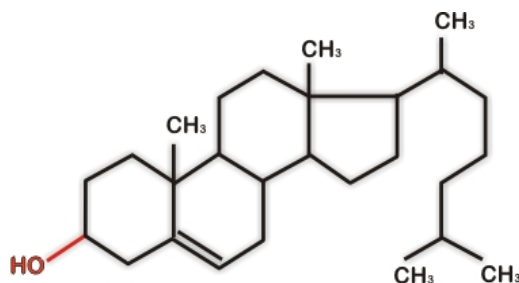


Fig. 1: Struttura della molecola di colesterolo

La rilevanza biologica di questo lipide è legata al fatto che, oltre ad essere il precursore di molecole importanti, quali vitamina D<sub>3</sub>, sali biliari e ormoni steroidei (aldosterone, cortisolo, progesterone, androgeni e estrogeni), è un importante costituente della membrana plasmatica. Quest'ultima, essendo l'interfaccia tra l'ambiente cellulare e quello extracellulare, svolge importanti funzioni di omeostasi, trasporto, selezione, trasduzione del segnale e, infine, riconoscimento e stabilizzazione di interazioni con matrice extracellulare o altre cellule.

La membrana plasmatica, se fosse troppo fluida o troppo rigida, non potrebbe svolgere in modo ottimale i suoi molteplici compiti: il ruolo del C è svolto in questo contesto; infatti esso, per la sua rigidità strutturale, crea disordine tra i fosfolipidi e impedisce che la membrana assuma una struttura paracristallina mentre, grazie alla sua apolarità, coordina i fosfolipidi ostacolandone i movimenti, che sono alla base della fluidità del doppio strato lipidico. Da ciò si può intuire, quindi, come, in caso di eccesso di questo lipide nella membrana plasmatica, questa divenga più rigida (e

fragile) e la cellula possa andare incontro a necrosi, scatenando fenomeni infiammatori, essenzialmente per l'esposizione di antigeni non-self e la liberazione di enzimi litici.

La regolazione della sintesi e dello smaltimento di questa molecola, in un organismo animale, è affidata al fegato e all'intestino. Infatti, gli altri tessuti, pur avendo una bassa capacità di sintetizzare *ex novo* il C, sono incapaci di degradarlo. L'enzima limitante la lunga e complessa via biosintetica del C è la **3, idrossi-3, metilglutaril-CoA riduttasi** (HMGCoA-riduttasi), che catalizza il passaggio del HMGCoA a Mevalonato, ovvero la tappa più lenta per la sintesi di questo lipide. Oltre all'insulina, che ne favorisce la biosintesi, ed al glucagone, che la inibisce, è lo stesso C che, se presente in eccesso, inibisce la propria sintesi. Il livello intracellulare di C controlla, inoltre, anche l'apporto di colesterolo dal plasma tramite le LDL. Infatti, è la stessa quantità di C intracellulare che regola, con un meccanismo ancora sconosciuto, la sintesi dei recettori per le LDL. Queste, dopo essere state endocitate, vengono subito idrolizzate negli endolisosomi (formati dalla fusione delle vescicole endosomiche tardive e dei lisosomi) ed il colesterolo esterificato (CE), in esse contenuto, viene idrolizzato (in C e acido grasso) e usato dalla cellula. In caso di eccesso intracellulare di C libero, questo viene nuovamente esterificato dalla AcilCoA-colesteroloaciltrasferasi (ACAT) e depositato in appositi compartimenti. Quando, però, la concentrazione di C supera una soglia di contenimento in questi organelli di deposito, esso inibisce la sintesi dei recettori per le LDL e si accumula nel doppio strato lipidico della membrana plasmatica, alterandone la fluidità e, di conseguenza, la funzione di trasporto o la comunicazione con cellule e matrice extracellulare. L'accumulo di C nella cellula, come già accennato, può provocare la **necrosi** (e, quindi, la comparsa di lesioni tissutali), causando fratture nel doppio strato lipidico superficiale e formando cristalli all'interno della cellula. Le lesioni all'endotelio vasale o discontinuità giunzionale tra cellule endoteliali vascolari (prodotte da citochine infiammatorie) sono alcune delle cause dell'infiltrazione di LDL che, se ossidate, possono essere captate dai macrofagi, che sono così stimolati a

differenziarsi in cellule schiumose (*foam cell*), suscitando la deposizione di collagene dai fibroblasti nella matrice extracellulare e la proliferazione dei miociti perivascolari ed instaurando, quindi, il processo alla base della formazione di strie lipidiche e placche ateromatose (“ateromi”).

Le cellule periferiche, come tutte le cellule non intestinali o epatiche, non sono in grado di degradare il C in eccesso (Johnson et al., 1991); perciò, è essenziale, per l’omeostasi cellulare, un meccanismo mediante il quale le molecole di C possano essere rimosse dalle cellule (Ginsberg et al., 1998). Questo meccanismo, finalizzato al recupero epatico del C periferico in eccesso, è detto “trasporto inverso del colesterolo” (RCT: reverse cholesterol transport).

## ***1.2 Le lipoproteine plasmatiche.***

I lipidi sono presenti nel sangue o sotto forma di acidi grassi liberi, cioè associati a proteine solubili come l’albumina, o in forma esterificata, cioè associati ad altre proteine, in aggregati micellari detti comunemente lipoproteine plasmatiche. Esistono vari tipi di lipoproteine, differenziate soprattutto per la loro composizione lipidica e relativa densità; esse hanno una densità tanto minore quanto maggiore è la percentuale di lipidi trasportata e vengono classificate, in ordine di densità crescente, come segue: chilomicroni, lipoproteine a bassissima densità o VLDL (*Very Low Density Lipoprotein*), lipoproteine a bassa densità o LDL (*Low Density Lipoprotein*), lipoproteine a densità intermedia o IDL (*Intermediate Density Lipoprotein*), lipoproteine ad elevata densità o HDL (*High Density Lipoprotein*).

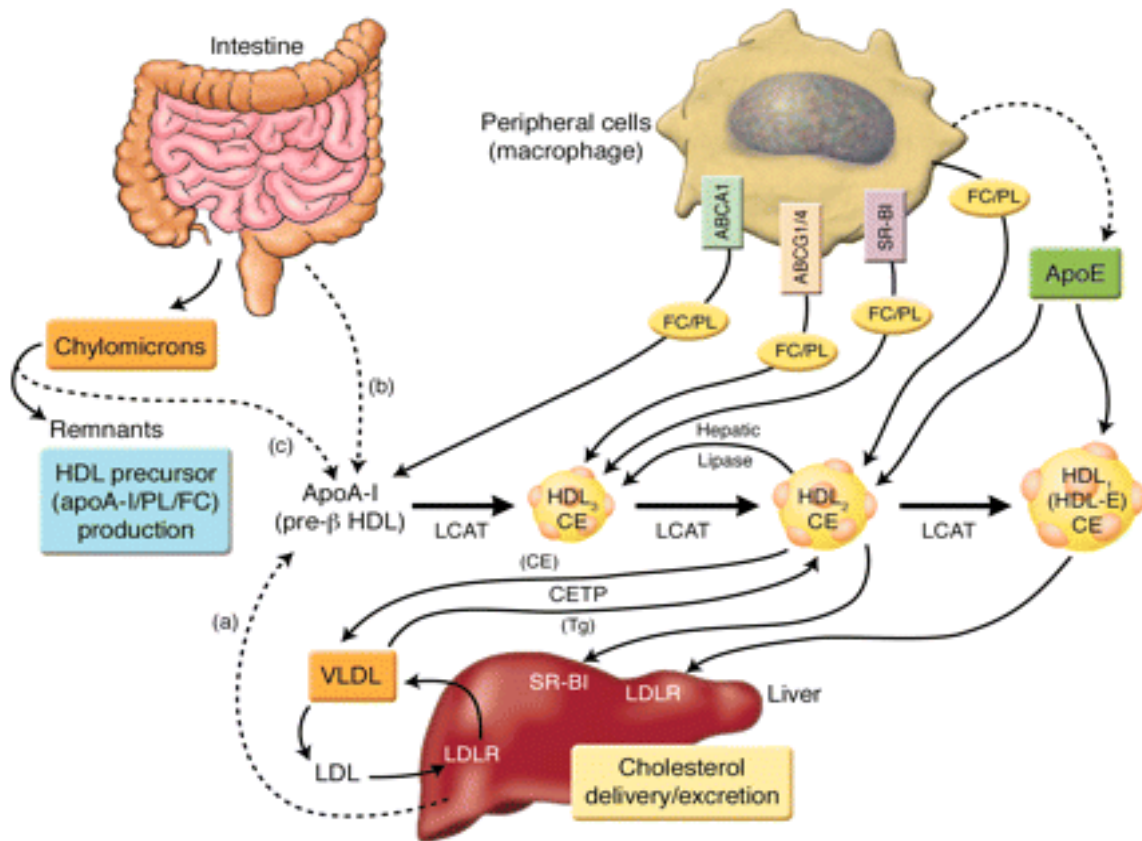
Grazie alla loro particolare struttura micellare, le lipoproteine possono trasportare molecole apolari come colesterolo esterificato ed acil-gliceroli in una soluzione acquosa quale il plasma. Presentano, infatti, in superficie, apolipoproteine, C libero e fosfolipidi, che sono molecole anfipatiche, e in una zona centrale, detta *core*, i lipidi apolari (CE e trigliceridi). Le lipoproteine vengono secrete dalle cellule epatiche ed intestinali in forma immatura e subiscono, in seguito, cambiamenti strutturali nel plasma. I chilomicroni trasportano i lipidi esogeni dall’intestino ai tessuti deputati

alla loro conservazione e degradazione. Invece, i lipidi di origine endogena, secreti a livello epatico, vengono trasportati dalle VLDL, che, una volta rilasciate nel plasma, perdono gli acidi grassi ad opera di enzimi endoteliali, riducendosi in lipoproteine a diametro minore dette IDL, che poi vengono in parte captate dal fegato, in parte trasformate in LDL. Le LDL hanno il compito di trasportare il C, presente soprattutto in forma esterificata, dal fegato ai tessuti periferici. I recettori per le LDL sono glicoproteine di superficie che mediano un processo di endocitosi selettiva (Brown et al., 1983).

Le HDL sono le più piccole lipoproteine plasmatiche (diametro 5-17 nm) e contengono CE, C e fosfolipidi, scarso contenuto in trigliceridi ed elevato contenuto proteico. Sono caratterizzate da una elevata densità ( $>1.063$  g/ml). Queste lipoproteine sono fondamentali per il RCT.

### ***1.3 HDL e RCT.***

Le HDL e l'enzima lecitina-colesterolo aciltrasferasi (LCAT) svolgono un ruolo chiave nel RCT (Glomset et al., 1966). Il C, accumulato nella membrana plasmatica, viene, infatti, rimosso ad opera di HDL e LCAT (Fig. 2). In particolare, LCAT, attivato dall'interazione con un'apolipoproteina presente sulle HDL (Apo A-I), trasferisce un gruppo acilico dal C-2 del glicerolo della fosfatidilcolina (presente sulle HDL) al C-3-OH del colesterolo, formando CE (che vengono internalizzati nel *core* delle HDL) e lisofosfatidilcolina (Chen e Albers, 1982).



**Fig. 2 Trasporto inverso del colesterolo**

Le HDL veicolano, attraverso il circolo, il C ed i suoi esteri (CE) al tessuto epatico o ai tessuti steroidogenici. Questi tessuti, possono eliminare il colesterolo attraverso la bile (fegato) o usarlo come precursore degli ormoni steroidei (tessuti steroidogenici), oltre che per la sintesi delle membrane.

Come già accennato sopra, le HDL vengono prodotte dal fegato e dall'intestino e sono costituite essenzialmente da fosfolipidi e apolipoproteine (Apo A-I, Apo A-II, Apo E, in minor misura Apo C). Esse svolgono una funzione di supporto del metabolismo delle altre lipoproteine, scambiando con esse apolipoproteine, fosfolipidi e CE (Francone and Fielding, 1990). L'avidità delle HDL per il C è legata, in massima parte, proprio alle proteine che espongono in superficie. LCAT, infatti, utilizza Apo A-I come principale cofattore per esterificare il C e permetterne l'inclusione (come CE) nel nucleo lipidico delle HDL. Non di minore importanza è la presenza di Apo E sulle HDL, di cui, in passato (Zorich et al., 1985), si è scoperto lo

stesso ruolo di Apo A-I nella funzione stimolatoria di LCAT. Durante il loro metabolismo, quindi, le HDL subiscono delle grandi modificazioni nelle percentuali lipidiche, dipendenti, in massima parte, dall'eccesso o dalla richiesta cellulare di C. Infatti, le HDL, man mano che internalizzano il C, passano dalla forma immatura discoidale, detta pre- $\beta$  (forma preferita da LCAT come substrato), a forme sferiche via via più grandi e leggere, dette HDL<sub>3</sub>- HDL<sub>2</sub>-HDL<sub>1</sub> (Anderson DW et al., 1987). Nel plasma dei cani, in seguito alla somministrazione di una dieta arricchita in C, è stata riportata la presenza di HDL arricchite in CE, aumentate in dimensioni e senza Apo A-I (Gordon et al., 1983). Queste grandi HDL (18 nm di diametro), riportate come HDL<sub>c</sub> (la "c" indica l'induzione della loro formazione in seguito a dieta arricchita in colesterolo), contengono più del 50% di C, nessuna Apo A-I e quasi esclusivamente Apo E. Queste HDL sono state trovate, successivamente, sia nell'uomo (Wilson et al., 1992) sia nel plasma dei conigli (Fragoso et al., 1996), dove si formano in seguito a dieta supplementata con C.

Nelle modificazioni associate all'aumento di carico delle HDL sono coinvolti, oltre ad LCAT, enzimi quali LTP I e II (*Lipid Transfer Protein I e II*) che permettono lo spostamento del CE verso l'interno della lipoproteina (Tollefson et al., 1986), facendone aumentare il volume e diminuire la densità. Esistono, inoltre, enzimi che catalizzano il trasferimento di CE dalle HDL<sub>2</sub> ad altre lipoproteine (VLDL e LDL), in scambio con triacilgliceroli (*Cholesteryl Ester Transfer Protein: CETP*), o catalizzano il trasferimento dei fosfolipidi dalle VLDL e dai chilomicroni alle HDL (*Phospholipid Transfer Protein: PLTP*). I trigliceridi contenuti nelle HDL<sub>2</sub>, inoltre, sono substrato della lipasi epatica (HL) o della lipoproteina-lipasi (LPL), che contribuiscono a riconvertire le HDL<sub>2</sub> in HDL<sub>3</sub>, consentendo, in tal modo, un nuovo ciclo di recupero del C (Eisenberg et al., 1986). Sembra, come sarà in seguito dettagliato, che maggior rilevanza nel riciclo delle HDL abbia la presenza di recettori di ancoraggio (noti come SR-B), che trattengono le HDL sulla superficie cellulare epatica e promuovono il trasferimento di CE dalle HDL alla cellula, modificando così contenuto e forma della lipoproteina, che viene poi rilasciata per il riciclo. Il risultato



netto del ciclo delle particelle di HDL è, pertanto, quello di aumentare la velocità di rimozione dei trigliceridi dal plasma e regolare la quantità ed il rapporto plasmatico tra C e CE. I CE accumulati nelle HDL possono andare incontro a vari destini: come già accennato, una parte cospicua viene selettivamente prelevata dal fegato e dai tessuti steroidogenici tramite recettori di tipo *scavenger* (SR, *Scavenger Receptor*: Recettore Spazzino).

Benché, a seconda delle cellule e delle condizioni sperimentali, sia stato evidenziato che il trasferimento del C, dalle cellule periferiche alle HDL, possa avvenire sia per diffusione in fase acquosa (Rothblat et al., 1992) sia per interazione con trasportatori specifici di membrana (Oram et al., 1996), è sempre più chiaro il ruolo svolto da un tipo particolare di recettore che riconosce con alta affinità le HDL. Questo recettore, presente su alcuni tipi cellulari, fa parte della famiglia degli SR e può mediare la rimozione del colesterolo dalle cellule (Wang et al., 2000) proprio favorendo il riconoscimento di lipoproteine “navetta” tra cellula e cellula. E’ denominato *SR-BI* (SR di classe B e di tipo I): il suo ruolo è quello di ancorare le HDL (legame mediato essenzialmente da Apo A-I) sulla membrana cellulare (Acton et al., 1996). Sebbene l’unione a questo recettore sia solo una delle possibili vie attraverso cui le HDL possano agganciarsi alle cellule periferiche, è stato dimostrato che la sua assenza è devastante per le arterie. Infatti, questo recettore non lega solo le HDL, ma anche le LDL ossidate (ox-LDL); inoltre, è stato individuato anche per la forte omologia con il recettore CD36 che, oltre a legare le ox-LDL partecipa alla fagocitosi delle vescicole che gemmano dalle cellule apoptotiche. Tali eventi, come vedremo, sono alla base del danno aterosclerotico.

Se presenti in elevati livelli nel plasma, le HDL sembrano svolgere un ruolo protettivo contro l’insorgenza dell’aterosclerosi (Assmann et al., 2004). Tra l’altro, le HDL prevengono, *in vitro*, l’attività citotossica svolta dalle ox-LDL sulle cellule endoteliali; in più, esse inibiscono l’ossidazione delle LDL, grazie all’elevato contenuto di antiossidanti presenti in superficie tra cui Apo A-I, che protegge sia fosfolipidi che CE dall’attacco di radicali, e numerosi enzimi come la *paraoxonasi*

(PON), il *fattore attivante le piastrine acetil-idrossilasi* (PAF-AH) e la *glutazione perossidasi* (GPX), che prevengono l'ossidazione delle LDL e degradano i suoi prodotti bioattivi. Ma le HDL prevengono anche la formazione, mediata da enzimi quali la *12-lipossigenasi*, di idroperossidi lipidici (Assmann et al., 2004).

Come vedremo, però, alcune attività protettive svolte dalle HDL vengono a mancare con l'insorgenza di fenomeni infiammatori. Questo deficit lascia campo libero alla nascita e alla progressione di un ateroma ed è correlato all'incidenza di danni cardiovascolari (Miller et Miller, 1975; Gordon et Rifkind, 1989).

#### **1.4 Lecitina-colesterolo aciltrasferasi.**

L'enzima LCAT (E.C. 2.3.1.43), prodotto dal fegato, è presente nel plasma di tutte le specie di mammiferi. Esso contiene, all'incirca, il 25% di carboidrati e ha un peso molecolare, stimato per elettroforesi, in un intervallo compreso tra 66 e 68 kDa (Fielding, 1986).

Come precedentemente accennato, questo enzima esterifica il C (rimosso dalla superficie cellulare) con un acido grasso, rimosso dalla posizione 2 del C del glicerolo della fosfatidilcolina presente sulle HDL. Questa attività non è limitata solo all'esterificazione del C cellulare, ma anche a quella del C delle HDL: questa esterificazione è funzionale al passaggio di C dalle HDL alle LDL.

LCAT è principalmente stimolato da Apo A-I (Glomset et al., 1966), ma anche da altre apolipoproteine, inclusa l'apolipoproteina E (Apo E) (Zorich et al., 1985), una proteina presente sulla superficie delle lipoproteine, incluse le HDL (Wilson et al., 1992; Fragoso and Skinner, 1996). In particolare Apo E presenta un'efficienza nella stimolazione di LCAT pari al 18% (Zorich et al., 1985) o, secondo altri Autori (Chen CH and Albers JJ; 1985) al 40% di Apo A-I.

LCAT è dotato di due distinte attività catalitiche: un'**attività fosfolipasica** (basata su un sito contenente un gruppo alcolico serinico) che stacca l'acido grasso dalla fosfatidilcolina e un'**attività transacetilasica** (basata su un sito la cui struttura dipende da un gruppo tiolico vicinale) che esterifica il colesterolo con l'acido grasso.

Queste due attività rappresentano la causa principale della formazione di CE nel plasma umano.

LCAT è influenzato dallo stress ossidativo: esso, infatti, può essere inibito da agenti ossidanti, come è stato dimostrato dal trattamento con ioni rame (Bielicki et al., 1995 (a)) o con estratti di fumo di sigaretta (Bielicki et al., 1995 (a), 1995 (b); McCall et al., 1994). L'enzima può essere, inoltre, inibito dall'incubazione con perossinitrito (Graham et al., 1998), con idroperossidi (Bielicki et al., 1999 (a)), con radicali perossidici (Chen et al., 1995) o per ossidazione dei residui di cisteina vicini al sito attivo (Bielicki et al., 1995 (b); Wang et al., 2000). E' noto, inoltre, che le mm-LDL (*minimally oxidized* LDL), un prodotto intermedio dell'ossidazione delle LDL, sono potenti inibitori dell'attività di LCAT (Bielicki J.K. et al., 1996). Esse possono inibire direttamente l'enzima o alterare il suo attivatore Apo A-I (McCall et al., 1995; Subbaiah et al., 1996; Bielicki et al., 1996). Le condizioni redox del plasma influenzano, quindi, in maniera significativa il RCT; in particolare, gli antiossidanti prevengono le modificazioni ossidative strutturali e funzionali, indotte dai ROS (specie reattive dell'ossigeno) e dalle ox-LDL. E' stato, infatti dimostrato che l'attività LCAT è positivamente correlata con alti livelli di vitamina C (*ascorbato*) e di vitamina E ( *$\alpha$ -tocoferolo*) (Cigliano et al., 2002).

LCAT non è soltanto e semplicemente un bersaglio dei ROS, ma può svolgere un ruolo attivo nel controllo dello stato redox. Infatti, diversi studi (Goyal et al., 1997; Vohl et al., 1999) hanno dimostrato che l'enzima è attivamente implicato nella rigenerazione di lipoproteine ossidate: esso diminuisce la carica netta negativa assunta dalle ox-LDL svolgendo attività fosfolipasica, cioè staccando residui acilici perossidati o ossidati (chetoacidi) dalla fosfatidilcolina presente su queste lipoproteine e sostituendoli con residui acilici integri.

Altri studi hanno confermato che LCAT rappresenta un enzima dalle spiccate proprietà antiaterogeniche. Infatti, conigli transgenici, in cui è stata indotta una superespressione di LCAT, che sono stati sottoposti ad una dieta ricca di C, hanno mostrato un aumento significativo nelle concentrazioni di Apo A-I e di C delle HDL:

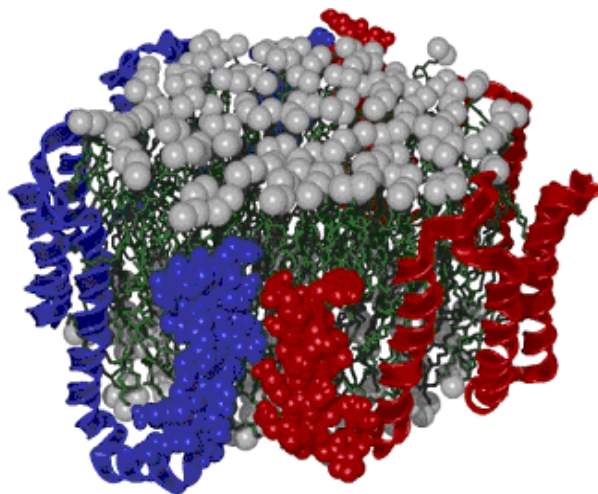
questo profilo lipoproteico è stato trovato associato ad una diminuzione significativa delle lipoproteine cosiddette “aterogeniche” (VLDL e LDL) (Hoeg et al., 1996; Taylor et al., 1997; Brousseau et al., 1997). Inoltre, la superespressione di LCAT ha portato ad una riduzione dell’aterosclerosi in questi animali, poiché l’analisi dell’aorta ha rivelato una riduzione dell’86% della dimensione della placca aterosclerotica, rispetto ad animali di controllo.

Questi risultati indicano che la regolazione dell’attività di LCAT gioca un ruolo chiave nell’omeostasi cardiovascolare in termini di prevenzione dell’aterosclerosi e rappresenta un nuovo bersaglio per lo sviluppo di strategie terapeutiche, farmacologiche e geniche.

### ***1.5 Apolipoproteina AI***

Apo A-I, la maggiore proteina attivatrice di LCAT e principale costituente proteico delle HDL, è costituita da 243 aminoacidi e contiene 10  $\alpha$ -eliche anfipatiche (8 di 22 aminoacidi e 2 di 11) disposte in tandem, che costituiscono circa l’80% della massa totale della proteina. Questi domini ad  $\alpha$ -elica sono responsabili sia dell’interazione dell’apolipoproteina con la componente lipidica che dell’attivazione di LCAT (Sorci-Thomas, 1997). Le  $\alpha$ -eliche sono unite grazie a corte e flessibili anse con struttura  $\beta$ , contenenti un residuo di prolina. Apo A-I in forma libera (cioè non associata ai lipidi) può funzionare da proteina segnale, poiché, con i siti di legame sulla membrana plasmatica, avvia la mobilizzazione del colesterolo libero (*Free Cholesterol*, CF) dalle membrane intracellulari e dagli esteri del colesterolo cellulari verso la membrana plasmatica, in base a segnali mediati dalla proteina chinasi C (PKC) (Oram et al., 1991; Mendez et al., 1991). Di recente è stato scoperto che la carenza genetica di un trasportatore del tipo ATP-binding cassette (ABCA1) causa la malattia di Tangier (Orso et al., 2000; McNiesh et al., 2000). Questa proteina, quindi, è probabilmente un recettore di Apo A-I (Bortnick et al., 2000; Mendez et al., 2001) e, poiché promuove l’efflusso di C cellulare, sarebbe necessaria per l’attività di LCAT, che pure risulterebbe associato ad Apo A-I. Alcuni autori hanno proposto che ci sia

un'interazione diretta tra Apo A-I e ABCA-1 (Wang et al., 2000; Oram et al., 2000); altri hanno ipotizzato che ABCA1 non leghi Apo A-I direttamente, ma abbia un ruolo nel modificare la distribuzione dei lipidi di membrana, creando il microambiente biofisico richiesto da Apo A-I per l'interazione con la superficie cellulare (Hamon et al., 2000; Chambenoit et al., 2001). Inoltre, diminuiti livelli di HDL sono associati con accumulo di C nei tessuti periferici e/o aterosclerosi, in uomini ed animali deficienti di Apo A-I o ABCA-1 (Marcil et al., 1999; Hovingh et al., 2003). È stato proposto che le eliche anfipatiche di Apo A-I, nelle HDL discoidali, siano orientate parallelamente alla superficie del monostrato fosfolipidico, con i residui aminoacidici idrofobici a contatto con le catene aciliche degli acidi grassi dei fosfolipidi; mentre i residui idrofilici interagirebbero con i gruppi polari dei fosfolipidi e con la fase acquosa (Fig. 3), (Segrest et al., 1992).



**Fig. 3** Struttura di Apo A-I nelle HDL. Sono rappresentate due molecole di Apo A-I (in blu e rosso) le cui  $\alpha$ -eliche sono orientate parallelamente alle catene dei fosfolipidi (in verde). In grigio sono rappresentate le teste polari dei fosfolipidi.

Sembra ormai accertato che Apo A-I non soltanto attivi LCAT, ma organizza la formazione stessa delle HDL e, inoltre stimola l'efflusso di C dalla cellula. Infatti, Apo A-I presenta una conformazione altamente flessibile, la quale può giocare un

ruolo nell'interazione e nello scambio di lipidi delle HDL con le membrane plasmatiche. Sembra, infatti, che l'interazione delle HDL discoidali con le membrane plasmatiche possa avvenire non solo mediante ABCA-1, ma direttamente, tramite specifiche eliche di Apo A-I che si sposterebbero dalla superficie delle HDL per inserirsi nel doppio strato fosfolipidico della membrana cellulare, facilitando così l'efflusso di C (Johnson, 1991). Nelle HDL sferiche, invece, questo dominio di Apo A-I è impegnato dalle particelle lipidiche a tal punto che non è capace di interagire con le membrane cellulari (Rothblat et al., 1992).

La stimolazione di Apo A-I su LCAT non solo è molto efficiente, poiché l'attività enzimatica è molto ridotta in sua assenza, ma sembra ben conservata nell'evoluzione: infatti, è stato dimostrato che Apo A-I ha un'azione eterospecifica, ovvero che, purificata da una certa specie animale, sia in grado di attivare LCAT di specie diverse (Chen e Albers, 1983). La dimostrazione dello stretto rapporto tra Apo A-I ed LCAT, è dato da un marcato catabolismo della prima proteina in caso di deficienza della seconda (Reader et al., 1994).

Da esperimenti condotti su topi transgenici, in cui era stato trasferito il gene per Apo A-I umana, è stato dimostrato che la sovraespressione di questa proteina ha prodotto l'aumento dei livelli delle HDL in circolo (Benoit et al., 1999), facendo così diminuire il rischio di aterosclerosi.

Come già esposto, Apo A-I è fondamentale per l'attivazione di LCAT nel RCT. Tale interazione può essere ostacolata dalla presenza di Aptoglobina (*Hpt*), una proteina della fase acuta dell'infiammazione, che lega Apo A-I, impedendo l'attivazione di LCAT e inibendo, di conseguenza, l'esterificazione del colesterolo (Balestrieri et al., 2001). Di questa proteina verrà discusso più avanti.

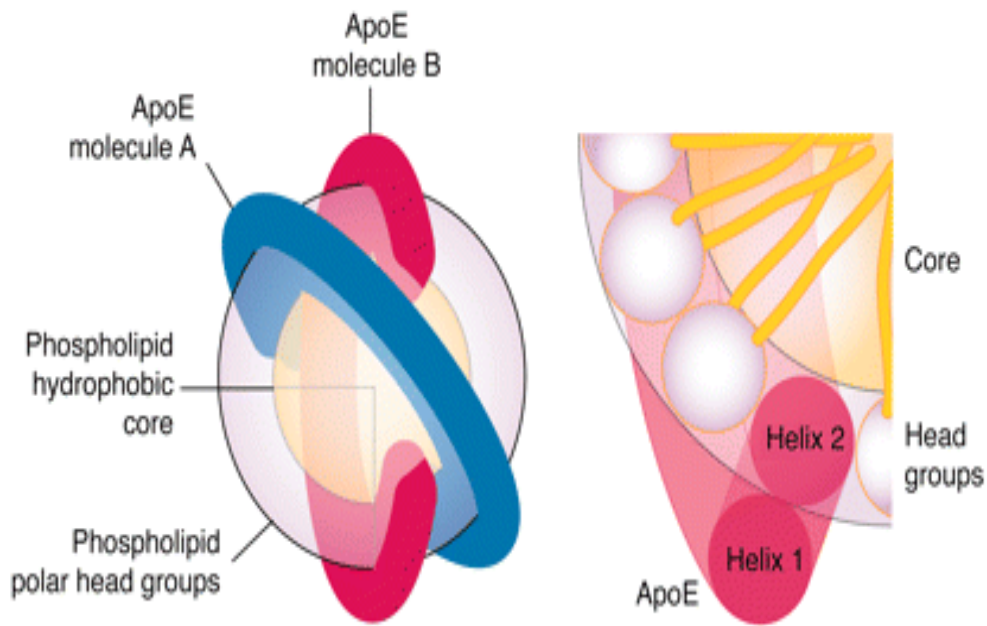
## ***1.6 Apolipoproteina E***

L'apolipoproteina E (Apo E) è una proteina dalle molteplici funzioni che ha peso molecolare di 34 kDa. Essa è prodotta principalmente dal fegato, ma il 20-40% del totale deriva anche da fonti extra-epatiche, come il cervello, la milza, i polmoni, le

ovaie, i reni, i muscoli ed i macrofagi (Greenow K et al., 2005). Questa apolipoproteina è coinvolta nell'efficiente assorbimento epatico di particelle lipoproteiche, nella stimolazione dell'efflusso di C dai macrofagi attivati e dalle *foam cell* nella lesione aterosclerotica e, infine, nella regolazione della risposta immunitaria e infiammatoria. Apo E, inoltre, presenta un'efficienza nella stimolazione di LCAT pari al 18% (Zorich et al., 1985) o, secondo altri Autori (Chen CH and Albers JJ; 1985), al 40% di quella di Apo A-I.

La sintesi e la secrezione di Apo E sono regolate da numerosi fattori. L'espressione del gene di Apo E ha una regolazione tessuto-specifica che risponde a cambiamenti funzionali cellulari e a diversi altri fattori intracellulari ed extracellulari. Per esempio, il differenziamento dei monociti in macrofagi è accompagnato dall'aumento nell'espressione di Apo E (Auwerx et al., 1988). Inoltre, la fagocitosi, da parte dei macrofagi, di C ossidato (LDL acetilate) e, la presenza di Apo A-I, fanno aumentare la trascrizione del gene (Rees et al., 1999). Infine, l'infiammazione può essere un segnale inibente: in presenza di IL-1 o di lipopolisaccaridi (LPS), l'espressione del gene, nei macrofagi, diminuisce (Greenow et al., 2005).

Come già descritto in precedenza, per completare il trasporto dalle HDL al fegato, i CE sono trasferiti, da CETP, alle LDL, che poi rilasciano il loro carico di lipidi, attraverso l'endocitosi regolata da recettori, nel fegato. E' stata, in passato, riportata l'esistenza di una eminente sottoclasse di HDL, ricca in Apo E, in diverse specie animali (compreso l'uomo) (Gordon et al., 1983). Poiché Apo E è un efficiente ligando per i recettori delle LDL, le HDL ricche di Apo E possono rilasciare al fegato il C acquisito dalla periferia anche in assenza di CETP (Matsuura et al., 2006; Mahley et al., 2006). Le specie deficienti di CETP sono particolarmente resistenti all'aumento dei livelli plasmatici di C, indotti dalla dieta, dimostrando che esse posseggono un efficiente RCT. Inoltre, è stato dimostrato che una dieta ricca di C, nei cani, porta ad un ingrandimento delle HDL con Apo E, attraverso un aumento della quantità di CE nel *core*. Ciò è spiegato dal modo in cui Apo E è disposta sulle HDL: essa è piegata a metà, formando 2 fasce circolari a forma di ferro di cavallo (Fig. 4).



**Fig. 4:** A sinistra è rappresentata la disposizione di Apo E sulle HDL. A destra si osserva una sezione di una regione della particella che mostra la relazione tra 2 eliche di Apo E con le teste dei fosfolipidi e il core.

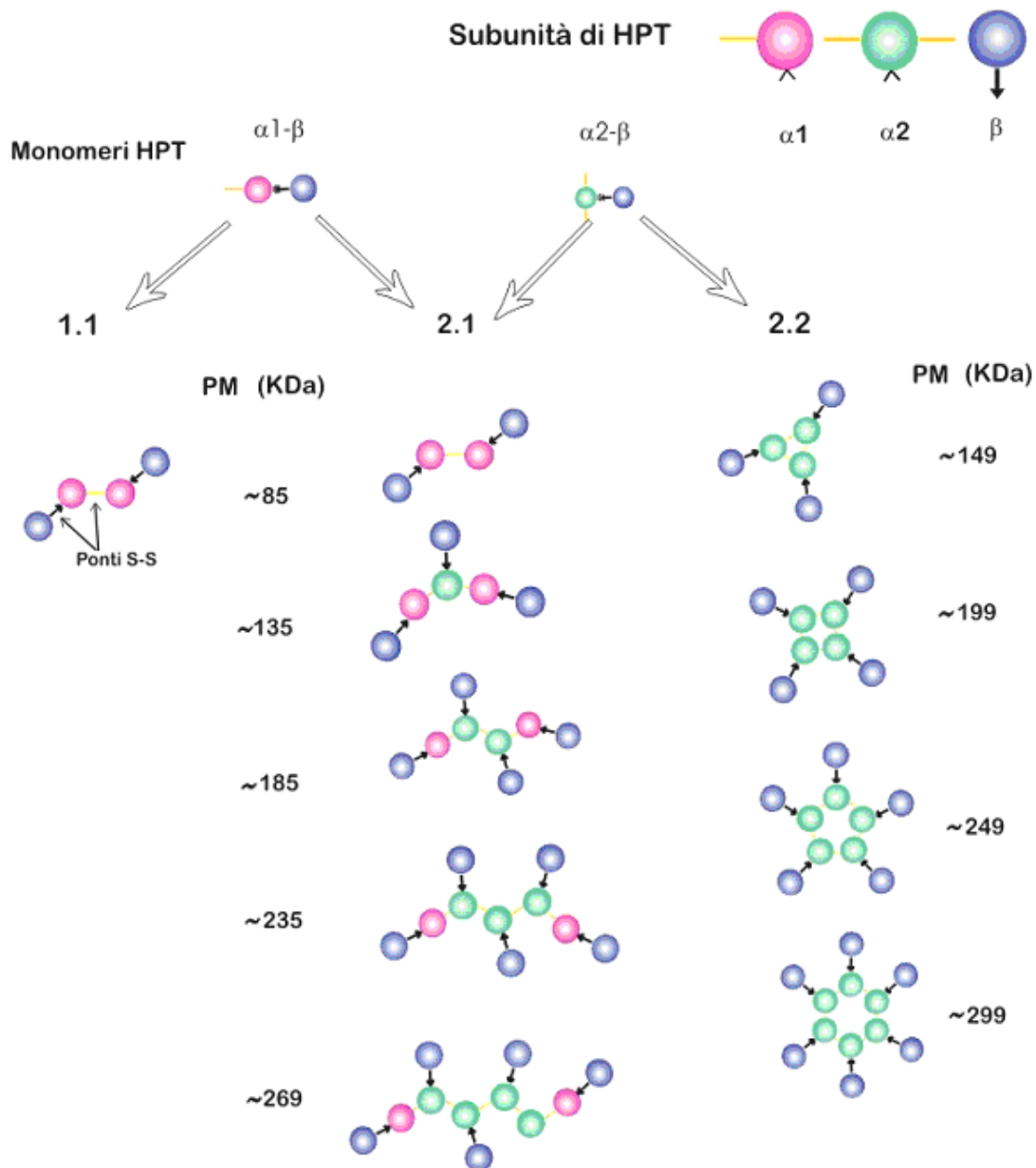
Mentre la faccia idrofobica dell'elica anfipatica di Apo A-I interagisce con le catene aciliche degli acidi grassi dei fosfolipidi, le facce polari di Apo E interagiscono con i gruppi polari delle teste dei fosfolipidi. Le facce idrofobiche di Apo E sono coinvolte nell'impacchettamento elica-elica e non interagiscono con le catene aciliche nel core (Mahley et al., 2006). In breve, Apo E ha una struttura (con lunghezza superiore ad Apo A-I) che consente alla componente lipidica della lipoproteina di espandersi mantenendo compattezza e stabilità.

### **1.7 Aptoglobina**

L'Aptoglobina (Hpt) è una proteina della fase acuta dell'infiammazione, ed è una  $\alpha$ 2-sialoglicoproteina, che, in condizioni fisiologiche, è presente nel plasma a basse concentrazioni. I valori fisiologici variano da 0,5 mg/ml a circa 2 mg/ml (Langlois et al., 1996). Essa è sintetizzata principalmente dal fegato sotto lo stimolo di vari fattori, tra cui IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ .. Queste citochine sono prodotte dai macrofagi o altre cellule (come, ad esempio, i fibroblasti di tessuti con alterazioni strutturali) durante le



prime fasi di un'inflammatione (Spooner et al., 1971): ciò rende conto degli aumentati livelli di Hpt nel plasma, durante tale evento (Sadrzadeh and Bozorgmehr, 2004). Hpt presenta tre fenotipi nell'uomo (**Hpt 1-1, Hpt 1-2 e Hpt 2-2**) (Smithies O. (1955); Craig et al. 1991): essa è una proteina oligomerica, con ciascun monomero costituito da una subunità pesante (detta  $\beta$ ) ed una subunità leggera (detta  $\alpha_1$  o  $\alpha_2$ ). Mentre la catena  $\beta$ , che ha un PM di 40 kDa (Kurosky et al., 1980), è invariante, la catena  $\alpha$  è prodotta da almeno tre alleli:  $Hpt^{1F}$ ,  $Hpt^{1S}$ ,  $Hpt^2$ . Le due subunità  $\alpha_1F$  (fast) e  $\alpha_1S$  (slow) differiscono solo per l'aminoacido in posizione 54, che può essere, rispettivamente, un residuo di lisina o glutammato; il loro PM è di circa 8.9 kDa (Bowman, 1993). La subunità  $\alpha_2$ , invece, risulta dalla fusione delle due catene leggere (fast e slow), probabilmente a causa di un *crossing-over* eterologo (Bowman e Kurosky, 1982) ed ha un PM di 16 kDa. Il monomero  $\alpha\beta$  si forma tramite un ponte disolfuro tra le due diverse subunità, mentre il dimero  $\alpha\beta-\alpha\beta$  è dovuto ad un ponte disolfuro tra le due catene  $\alpha$ . Mentre  $\alpha_1F$  e  $\alpha_1S$  sono monovalenti, cioè possono formare un solo ponte disolfuro con un'altra catena,  $\alpha_2$  è bivalente. A seconda del fenotipo espresso (Hpt 1-1 o Hpt 2-2, in omozigosi, e Hpt 1-2 in eterozigosi), si potranno avere diversi tipi di molecole. Mentre il dimero (86 kDa) è l'unica forma di Hpt che si può ritrovare nei plasmi di persone con fenotipo Hpt 1-1, nei plasmi Hpt 1-2 e, soprattutto, in quelli con Hpt 2-2 saranno presenti un gran numero di isoforme a diverso PM. Inoltre, a causa del fatto che  $\alpha_1$  è monovalente e  $\alpha_2$  è bivalente, le isoforme dell'Hpt 1-2 sono dei polimeri lineari, mentre quelle dell'Hpt 2-2 sono polimeri circolari (Fig. 5)



**Fig. 5 Differenze strutturali tra i fenotipi di Hpt.**

Nel siero di numerosi mammiferi, tra cui i conigli ed i topi, Hpt è stata ritrovata con struttura dimerica simile a quella dell'aplotipo umano Hpt 1-1; il PM della catena  $\alpha$ , nei conigli e nei topi, è di 16.3 kDa, quello della catena  $\beta$  è di 38.5 kDa, mentre quello della struttura quaternaria di Hpt è 111.2 kDa (Hoffman et al., 1996).

La struttura del dimero di aptoglobina (Hpt 1-1) è simile a quelle delle immunoglobuline, ma ha anche un'alta omologia con la struttura di proteasi seriniche come tripsina, chimotripsina, trombina plasmina ed elastasi, ma con perdita

(evolutiva) di attività proteasica. Con l'evoluzione, la funzione di Hpt si è diversificata non solo da quella delle proteasi, ma anche da quella delle immunoglobuline; infatti Hpt ha acquisito un'alta affinità ( $K_a > 10^5$  molare<sup>-1</sup>) per l'emoglobina (Hb). La funzione principale di Hpt è, dunque, quella di catturare Hb libera, rilasciata durante l'emolisi (elevata in seguito all'infiammazione), per trasportarla al fegato, così da ridurre la potenziale tossicità del ferro, che viene riciclato per l'emopoiesi. Infatti, Hb ha un'intensa attività ossidante: essa è in grado di produrre, grazie allo ione ferroso, radicali ossidrilici a partire da H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Hallywell et al., 1992; Sutton et al., 1989). Hpt è anche in grado di inibire il trasferimento dell'eme (contenuto nell'Hb) dall'Hb alle LDL (Bamm et al., 2004). Il legame Hb-Hpt evita la perdita di Hb attraverso i glomeruli renali: il complesso Hb-Hpt è troppo grande, infatti, per passare o restare imprigionato attraverso le maglie del setaccio glomerulare. Tramite questo complesso, in cui è impiegato presumibilmente appena il 50% di Hpt plasmatica, viene catabolizzata circa 1g di Hb al giorno (ovvero 1/6 del totale turnover di Hb).

Oltre che nel fegato, Hpt è anche espressa in vari tessuti, come polmone, rene, pelle e cuore (Haugen et al., 1981; Kalmovarin et al., 1991). In particolare, Hpt è anche localmente espressa nella parete arteriosa, dove gioca un importante ruolo durante la migrazione cellulare nel rimodellamento (o riparazione) delle arterie (Smeets et al., 2003). La sintesi e la secrezione di forme di aptoglobina extraepatica differenzialmente glicosilate aumenta durante l'infiammazione (Glibetic et al., 1986; Sadrzadeh and Bozorgmehr, 2004) e nelle lesioni tissutali (Stahl WM, 1987). In varie malattie, infatti, si osservano variazioni nella glicosilazione di questa proteina (Turner GA, 1995); in casi di cancro, artrite reumatoide o cirrosi, la catena  $\beta$  dell'aptoglobina è sottoposta ad un'abnorme fucosilazione. Questa glicosilazione può modificare la struttura e la funzione della proteina (Ervasti et al., 1997). Hpt può legare Apo A-I nel sangue (Kunitake et al., 1994) e nel fluido follicolare (Porta et al., 1999). Tale legame coinvolge, probabilmente per ingombro sterico, il sito di Apo A-I responsabile della stimolazione di LCAT. Tale legame sembra favorire, sia in

condizioni fisiologiche che durante la fase acuta dell'inflammatione, una protezione di Apo A-I da parte di Hpt nei confronti dei radicali ossidrilici (Salvatore et al., 2007). Tuttavia, mentre nel primo caso il legame potrebbe non compromettere la stimolazione di LCAT (dato che la quantità di Apo A-I libera da Hpt dovrebbe essere sufficiente per tale attività), durante l'inflammatione gli aumentati livelli di Hpt potrebbero legare una maggiore quantità di Apo A-I compromettendo, temporaneamente, la stimolazione enzimatica. E' stato suggerito che ciò potrebbe essere finalizzato a prolungare la vita delle HDL (Salvatore et al., 2007); tuttavia solo una condizione di inflammatione non protratta nel tempo limiterebbe i danni sul RCT.

### ***1.8 Aterosclerosi ed inflammatione***

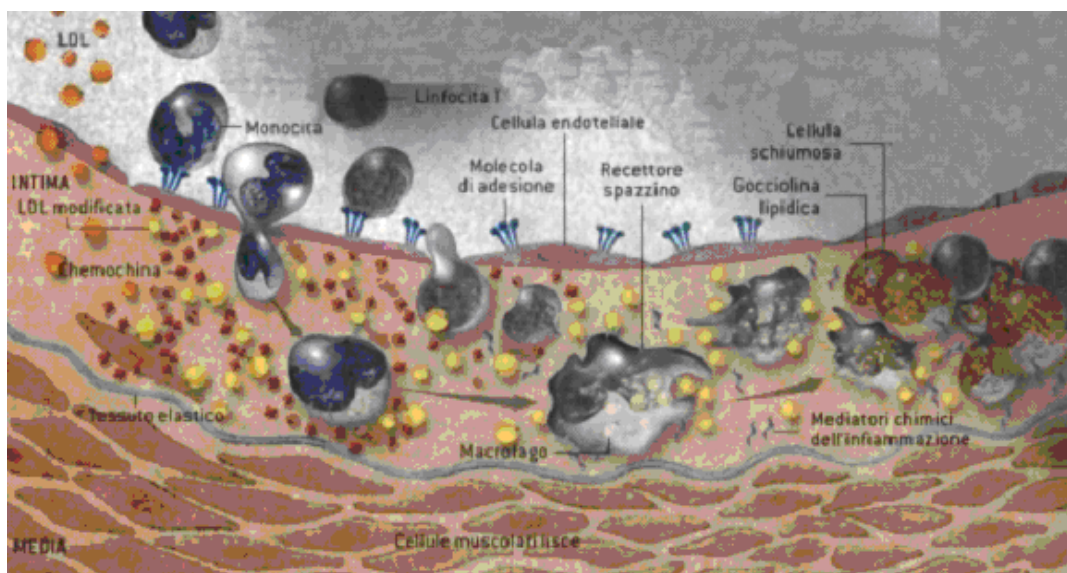
Le arterie sono i vasi adibiti al trasporto del sangue ossigenato ai vari distretti dell'organismo (con l'unica eccezione delle arterie polmonari). Esse sono costituite da tre tuniche stratificate: intima, media e avventizia (Fig. 6).



**Fig. 6 Sezione trasversale di un'arteria con progressiva formazione della placca aterosclerotica.**

L'aterosclerosi è una patologia che interessa la tunica intima delle arterie di grande e medio calibro (aorta, coronarie, carotidi, femorali e iliache). Sebbene si tratti di una patologia associata ad un gran numero di fattori di rischio (obesità, ipertensione, età, iperglicemia, fumo, ipercolesterolemia), la causa di gran lunga più comune sembra essere l'eccessivo accumulo di C nelle cellule e nel plasma (dove esso è localizzato maggiormente nelle LDL). Un eccesso di colesterolo cellulare comporta l'inibizione della sintesi dei recettori per le LDL, una maggiore persistenza di queste ultime a livello plasmatico (quindi, una maggiore probabilità di ossidazione), l'esposizione, a livello endoteliale, di molecole di adesione (VCAM-1 ed ICAM) per i monociti circolanti (Cybulsky e Gimbrone, 1991) e, in casi estremi, necrosi. Questo tipo di morte cellulare "non programmata" è un evento provocato dalla forza di taglio del flusso ematico su membrane cellulari endoteliali, irrigidite dall'eccesso di colesterolo, o da danni ossidativi alle membrane stesse (Yeagle, 1991; Schroeder et al., 1991). Quando ciò succede, in zone di forte turbolenza emodinamica (quali le biforcazioni del tessuto arterioso) o velocità di flusso (come l'aorta), il monostrato endoteliale vascolare può trovarsi nell'incapacità di riparare l'eventuale lesione. La lesione (o la disfunzione endoteliale, che provoca fenestrazione), permette l'infiltrazione di LDL e ox-LDL dando inizio alla serie di eventi che portano alla formazione dell'ateroma. Finché sono presenti nel sangue in concentrazioni normali, le LDL possono attraversare nei due sensi l'intima, che è composta principalmente dalle cellule endoteliali di rivestimento delle pareti vasali, dalla matrice extracellulare sottostante (tessuto connettivo) e da uno strato di cellule muscolari lisce (che protrudono verso la matrice). Quando sono eccessivamente concentrate, le LDL tendono a depositarsi nella matrice. Via via che esse si accumulano, sia i lipidi che le proteine di cui sono composte vanno incontro ad ossidazione, provocata da specie reattive dell'ossigeno o dell'azoto, rilasciate dal metabolismo cellulare: quindi, nell'intima arrivano LDL già ossidate (se le difese antiossidanti plasmatiche non sono state sufficienti a prevenire l'attacco di radicali) e LDL non ossidate (che si ossidano localmente per la scarsità di difese antiossidanti). Sembra che le cellule, nelle pareti

dei vasi, interpretino la presenza di ox-LDL come un segnale di pericolo, per cui sono indotte a richiamare i componenti del sistema immunitario. In particolare, sulla superficie a contatto con il sangue, le cellule endoteliali vascolari espongono recettori per i monociti circolanti (cellule infiammatorie quiescenti), che si fissano, così, alle pareti arteriose. Oltre a ciò, le LDL modificate, quali le acetil-LDL o le ox-LDL, inducono le cellule endoteliali e muscolari lisce a secernere citochine, che attraggono i monociti nell'intima, attraverso un meccanismo di chemiotassi. A questo punto, citochine e altre sostanze (elaborate anch'esse dalle cellule endoteliali e muscolari lisce) inducono i monociti a moltiplicarsi e a maturare, divenendo macrofagi attivati. Questi, in risposta agli stimoli ricevuti, espongono SR, che cattura le LDL modificate, tramite un meccanismo di endocitosi. Poiché SR non è regolato dal C intracellulare, le LDL endocitate si accumulano. In questo modo, i macrofagi si riempiono di goccioline lipidiche e assumono il caratteristico aspetto di cellule schiumose (*foam cell*). Queste cellule, assieme ai linfociti T, richiamati anch'essi dalle citochine, costituiscono la “*stria lipidica*” dalla quale si originerà la placca aterosclerotica che, in un secondo tempo, deformerà l'arteria (Fig. 7).



**Fig. 7 Schema generale di formazione della placca aterosclerotica.**

Contro strie ed ateromi insorge un meccanismo di difesa basato sulla proliferazione delle cellule muscolari lisce della parete, probabilmente indotta da un fattore che si libera dalle piastrine che aderiscono al subendotelio (PDGF). Tale meccanismo ha lo scopo di isolare la regione danneggiata, piuttosto che rimuovere il C accumulato. Il C, infatti, è così insolubile che non può essere eliminato dal punto della lesione, ma può solo continuare ad accumularsi provocando una lenta ma progressiva crescita della placca ateromatosa e delle strie lipidiche (Paoletti et al., 1997). Le molecole infiammatorie possono promuovere l'ulteriore crescita della placca e la formazione di un *cappuccio fibroso* sopra l'ammasso lipidico. Il cappuccio si sviluppa quando le citochine inducono le cellule muscolari lisce della tunica media a migrare alla superficie dell'intima, a moltiplicarsi e a produrre una matrice spessa e fibrosa (accumulo di collagene e fibronectina) che immobilizza e compatta le cellule fra loro. Il cappuccio accresce le dimensioni della placca ma, allo stesso tempo, la avvolge isolandola dal flusso sanguigno. Man mano che il cappuccio matura, la regione sottostante subisce alcune modificazioni, la più evidente delle quali è la morte di parte delle *foam cell*, che liberano i lipidi ossidati e causano la necrosi del tessuto sottostante.

Le placche ateromatose, per gran parte della loro esistenza, si espandono all'esterno dell'arteria anziché infiltrarsi nel lume, senza causare nessun danno evidente. Quando le placche si espandono contro la membrana basale endoteliale, si ha una notevole riduzione dell'elasticità della parete vasale ed un restringimento del lume del vaso, causandone la stenosi ed ostacolando il flusso ematico verso i tessuti, fino a provocare l'occlusione vasale (ischemia) (Fig. 6). Successivamente, le sostanze infiammatorie prodotte dalle *foam cell* possono indebolire il cappuccio, producendo enzimi proteolitici capaci di digerire il collagene ed impedendo alle cellule muscolari lisce di produrne altro. In queste condizioni, il cappuccio non può essere più riparato e linee di frattura si generano nella placca: allora il fattore tissutale, un potente procoagulante (prodotto dalle *foam cell* stimulate dai linfociti T), viene a contatto col plasma determinando la formazione di trombi. I trombi perturbano il flusso laminare

ematico, trasformandolo in flusso vorticoso. Tale flusso agisce meccanicamente sui trombi, causando il loro distacco e la loro migrazione. Se il trombo è sufficientemente grande, può bloccare il flusso capillare e, quindi, il ritorno di sangue verso il cuore provocando infarto del miocardio, cioè la morte del tessuto cardiaco (Libby, 2002).

Diversi studi (Ross, 1999; Libby et al., 2002; Fan and Watanabe, 2003) hanno dimostrato il ruolo dell'infiammazione in tutte le tappe dell'aterosclerosi. Essa viene considerata, frequentemente, una malattia infiammatoria cronica della parete arteriosa, mediata da ox-LDL e da altri agenti proinfiammatori, come citochine, metalloproteasi e fosfolipasi prodotti da macrofagi e *foam cells* (Rohrer L et al., 2004; Kontush A e Chapman MJ 2006). Durante la fase acuta dell'infiammazione ed anche durante quella cronica si assiste, infatti, ad un profondo squilibrio tra i livelli delle lipoproteine aterogeniche circolanti (LDL, VLDL e IDL) rispetto a quelle antiaterogeniche (HDL). Tale squilibrio è associato a disfunzione endoteliale, la quale a sua volta è profondamente correlata a infiammazione e stress ossidativo. I danni endoteliali comportano l'eccessiva penetrazione e ritenzione intimale di LDL insieme al reclutamento di monociti e attivazione e differenziazione di macrofagi nei vasi arteriosi: la diretta conseguenza di ciò è l'eccessiva produzione di ossidanti come le specie reattive dell'ossigeno, dell'azoto e del cloro. L'analisi della composizione della placca ha rilevato l'accumulo di prodotti di proteine e lipidi ossidati, compatibili con la presenza di stress ossidativo locale. Le ox-LDL hanno proprietà proaterogeniche multiple, che includono potenti attività proinfiammatorie, immunogeniche, apoptotiche e citotossiche. La maggior parte delle proprietà proinfiammatorie delle ox-LDL sono dovute ai prodotti bioattivi della perossidazione dei lipidi delle LDL. Come risultato, le ox-LDL propagano ulteriormente il processo infiammatorio nei vasi arteriosi, accelerando l'aterogenesi. Durante le fasi dell'infiammazione si verificano, inoltre, profonde modificazioni strutturali e funzionali a carico delle HDL. Le principali modificazioni proteiche riguardano la diminuzione del livello di Apo A-I e la sua sostituzione con una proteina della fase acuta dell'infiammazione, chiamata amiloide serica A, e la diminuzione degli enzimi



associati alle HDL, inclusi la paraoxonasi 1 e LCAT. Anche la composizione lipidica delle HDL può essere alterata: la più frequente alterazione è associata all'arricchimento in trigliceridi delle HDL, come conseguenza dell'elevata attività di CETP. Tali modificazioni comportano alterazioni delle proprietà antinfiammatorie e antiossidanti delle HDL. L'attività antiossidante delle HDL è tipicamente associata ad inibizione dell'ossidazione delle LDL: Apo A-I è il maggior componente dell'attività antiossidante delle HDL e può prevenire l'ossidazione delle LDL promuovendo la rimozione dei fosfolipidi ossidati dalle LDL; LCAT può invece direttamente idrolizzare i fosfolipidi ossidati delle LDL. Durante l'infiammazione, quindi, le particelle di HDL sono insufficienti a provvedere alla protezione delle LDL contro lo stress ossidativo nei tessuti ed in circolo attraverso la rimozione dei lipidi ossidati dalle LDL.

L'attività antinfiammatoria delle HDL si esplica attraverso la diminuzione dell'espressione delle citochine che mediano l'esposizione delle molecole di adesione, la diminuzione dell'infiltrazione dei neutrofilo ed una ridotta formazione di specie reattive dell'ossigeno. In vitro, le HDL efficacemente inibiscono l'espressione ed esposizione di VCAM-1 (*vascular-cell-adhesion molecule 1*), ICAM-1 (*intercellular-adhesion molecule 1*) e selectina E sulle cellule endoteliali, che avviene in risposta a TNF- $\alpha$  (*tumor-necrosis factor- $\alpha$* ), interleuchina 1, Proteina C o endotossine (Rohrer et al., 2004). L'abilità delle HDL ad inibire l'espressione delle molecole di adesione sembra essere mediata particolarmente da Apo A-I, ma anche da fosfolipidi, inclusi la sfingosina-1-fosfato e la sfingosilfosforilcolina. Tutte le alterazioni, nella composizione delle HDL, che possono ridurre le attività anti-infiammatorie ed anti-ossidante delle HDL (cioè diminuzione di esteri del colesterolo, di Apo A-I e di LCAT, aumento di trigliceridi e amiloide serica A) sono state osservate durante l'infiammazione (Kontush e Chapman, 2006). Inoltre, durante la fase acuta dell'infiammazione, gli elevati livelli circolanti di Hpt alterano RCT interferendo nella stimolazione di LCAT da parte di Apo A-I (Cigliano et al., 2005; Spagnuolo et al., 2005).

## 2. MATERIALI E METODI

### 2.1 *Materiali*

Per la procedura ELISA sono state utilizzate micropiastre da 96 pozzetti (del tipo “easy wash”) della NUNC (Roskilde, Danimarca). Presso la Sigma-Aldrich (agenzia di Milano) sono stati acquistati i seguenti prodotti: albumina di siero bovino (BSA); Eukitt;  $\lambda$ -carragenina; anticorpi contro la regione Fc degli anticorpi di pecora, coniugati con perossidasi di rafano (IgG policlonali di asino, da ora denominati Ab DAS-HRP); anticorpi contro la regione Fc degli anticorpi di topo, coniugati con perossidasi di rafano (IgG policlonali di capra, da ora denominati Ab GAM-HRP); anticorpi contro la regione Fc degli anticorpi di capra, coniugati con perossidasi di rafano (IgG policlonali di coniglio, da ora indicati come Ab GAR-HRP); dicloruro di o-fenilendiammina (OPD); perossido di idrogeno. La proteina Apo E umana è stata acquistata presso la Calbiochem (La Jolla, CA, USA). Dalla Chemicon International sono stati acquistati anticorpi anti-Apo E umana (IgG policlonali di capra, da ora denominati Ab anti-Apo E). Dalla Serotec sono stati acquistati anticorpi anti-Hpt umana (IgG policlonali di pecora, da ora denominati Ab anti-Hpt), anticorpi anti-Apo A-I umana (IgG policlonali di pecora, da ora denominati Ab anti-Apo A-I). Dalla DAKO (Carpenteria, CA, USA) sono stati acquistati anticorpi anti-RAM 11 (IgG monoclonali di topo, da ora denominati Ab anti-RAM 11). Il peptide biotinilato Biot-LSPLGEEMRDRARAHVDALRTHLA-NH<sub>2</sub> (sequenza aminoacidica 141-164 di Apo A-I; Biot= biotina), da ora denominato P2a, è stato acquistato presso l'INBIOS (Pozzuoli, Napoli). Dalla Millipore (agenzia di Milano) sono stati acquistati filtri di nitrocellulosa (0,45  $\mu$ ) per filtrare le soluzioni. Per i saggi LCAT è stato utilizzato colesterolo triziato [ $1\alpha, 2\alpha(n) - ^3\text{H} - \text{cholesterol}$ ] (45 Ci/mmole), acquistato dalla Perkin Elmer (Boston, MA, USA). Le lastre di silice Sil-G, per la cromatografia su strato sottile (spessore di 0.25 mm), sono state acquistate dalla Macherey-Nagel (Düren Germany). Tutti gli standard e le colonne Supelcosil LC-18 (5  $\mu\text{m}$ , 250 x 4.6 mm), per l'analisi mediante HPLC, sono stati acquistati dalla Sigma. I solventi

organici della massima purezza, per l'analisi HPLC, sono stati forniti dalla Delchimica (agenzia di Napoli). Materiale monouso, sali ed altre sostanze chimiche, per la preparazione e la manipolazione di reattivi e soluzioni, sono stati acquistati da rivenditori di Napoli.

## **2.2 Metodi**

### **2.2.1 Animali e programma di lavoro**

I conigli, utilizzati in questo lavoro di tesi, sono stati stabulati presso il centro di Biotecnologie dell'Azienda Ospedaliera "A. Cardarelli" di Napoli.

Ogni esperimento è stato condotto su 12 conigli, di razza *New Zealand* (peso: 1.2 - 1.5 kg). Essi sono stati divisi in due gruppi (di 6 conigli ciascuno), a seconda del tipo di dieta a cui sono stati sottoposti. Un gruppo è stato alimentato con una dieta normale, mentre l'altro è stato alimentato con una dieta arricchita al 2% di colesterolo. Entrambi i tipi di mangime sono stati acquistati dalla Ditta Harlan (Bologna).

Il trattamento è durato 8 settimane, durante le quali sono stati effettuati prelievi ematici settimanali, dalla vena marginale dell'orecchio. Tali prelievi sono stati accompagnati da esame ecocardiografico e controllo della frequenza cardiaca: tali controlli hanno permesso di monitorare, periodicamente, lo stato dei conigli.

Sui campioni ematici sono state eseguite analisi, per osservare le variazioni plasmatiche dei seguenti parametri: l'attività dell'enzima LCAT, la concentrazione del colesterolo libero (C) e di quello totale (CT) nelle HDL, il rapporto tra gli esteri del colesterolo (CE) ed il colesterolo libero nelle HDL (CE/C), la concentrazione plasmatica di Apo A-I e Hpt e, infine, la concentrazione di Apo E nel plasma deprivato di VLDL e LDL. Dopo 2 mesi di dieta supplementata con colesterolo, i conigli sono stati sacrificati ed è stato effettuato il prelievo dell'arco aortico, per indagini di tipo immunoistochimico, e l'espianto del fegato per una valutazione approssimativa anatomo-patologica.

I topi utilizzati sono stati acquistati dalla Charles River (Italia) e stabulati presso il Dipartimento di Farmacologia Sperimentale della Facoltà di Farmacia dell'Università Federico II di Napoli. Ogni esperimento è stato condotto su 45 topi maschi (CD-1) di peso compreso tra i 32-34 g. Essi sono stati suddivisi in 9 gruppi di 5 topi ciascuno. Un gruppo non è stato sottoposto a trattamento (gruppo controllo); gli altri sono stati sottoposti ad iniezione di 50 µl di 1% carragenina in soluzione fisiologica e sacrificati a tempi diversi (2, 4, 6, 24, 48, 72, 96 e 144 ore). Il trattamento è durato complessivamente 6 giorni; a tempi diversi dalla somministrazione della carragenina i topi sono stati sacrificati mediante diossido di carbonio. Prima del sacrificio sono stati effettuati prelievi ematici mediante puntura cardiaca. Sui campioni ematici sono state eseguite analisi per osservare le variazioni plasmatiche dei seguenti parametri: l'attività dell'enzima LCAT, la concentrazione del colesterolo libero (C) e di quello totale (CT) nelle HDL, il rapporto tra gli esteri del colesterolo (CE) ed il colesterolo libero nelle HDL (CE/C), la concentrazione plasmatica di Apo A-I, Apo E ed Hpt.

### ***2.2.2 Raccolta dei campioni di sangue e preparazione del plasma***

Il sangue, prelevato dalla vena marginale dell'orecchio del coniglio o mediante puntura cardiaca per i topi, è stato raccolto in tubi eparinizzati, per la preparazione del plasma mediante centrifugazione (800 g; 15 min; 4°C). Aliquote di plasma sono state raccolte e conservate a -20°C per le analisi. Le HDL sono state isolate da un pool di plasma, ottenuto, dopo 8 settimane di trattamento, sia dai conigli alimentati normalmente sia da quelli trattati con colesterolo: VLDL, LDL e HDL sono state preparate mediante ultracentrifugazione a densità 1.020, 1.055 e 1.250 g/ml (ottenute con aggiunte di KBr al plasma) rispettivamente, per 16, 16 e 40 h a 105400 g in una ultracentrifuga Beckman modello L8-55M con un rotore SW28 (Fragoso et al., 1995). I chilomicroni, le VLDL e le LDL sono state rimosse, mentre le HDL sono state recuperate e dializzate (contro 50 mM NaCl, 5 mM Tris-HCl, pH 7.4), prima di essere sottoposte alla cromatografia per affinità con una colonna di Eparina-Sefarosio.

### ***2.2.3 Saggio colorimetrico per la determinazione della concentrazione proteica totale***

La concentrazione proteica degli standard di Hpt ed Apo A-I è stata determinata per mezzo di microsaggi colorimetrici, secondo una metodica pubblicata (Bradford, 1976). E' stata approntata una calibrazione, in base a soluzioni a concentrazione nota di BSA (per Apo A-I) o IgG (per Hpt) in TBS (20 mM Tris-HCl, 130 mM NaCl, pH 7,3): sono state utilizzate otto soluzioni standard a concentrazione crescente. Gli standard sono stati diluiti in TBS e da queste diluizioni sono state prelevate un'aliquota di 10 µl ed una di 5 µl cui sono stati aggiunti, rispettivamente, 390 µl e 395 µl di TBS (20 mM Tris-HCl, 130 mM NaCl, pH 7,3). Ogni aliquota è stata analizzata in triplicato. Infine, sia alle soluzioni standard, sia ai campioni, sono stati aggiunti (a varie diluizioni in 400 µl di TBS) 100 µl di reattivo "Bio-rad". Il colore di tale reattivo passa dal rosso al blu in maniera proporzionale alla concentrazione proteica di ogni campione: l'intensità del colore blu è stata rilevata misurando spettrofotometricamente l'assorbanza a 595 nm. Dai valori di assorbanza ottenuti, grazie alla retta di calibrazione (costruita esprimendo l'assorbanza degli standard in funzione della concentrazione in mg/ml) e tenendo conto delle diluizioni, è stata calcolata la concentrazione proteica degli standard in mg/ml.

La concentrazione proteica delle HDL purificate è stata determinata mediante microsaggio colorimetrico, secondo una metodica pubblicata (Markwell et al., 1978). E' stata preparata una retta di taratura, in base a soluzioni a concentrazione nota di BSA in TBS: sono state utilizzate otto soluzioni standard a concentrazione crescente. Nella procedura, 100 parti di una soluzione, denominata A (contenente: 2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> / 0.4% NaOH / 0.16% sodio tartrato / 1% SDS), sono state miscelate con 1 parte di una soluzione, denominata B (contenente: 4% CuSO<sub>4</sub> · 5 H<sub>2</sub>O), per formare la soluzione C. A 200 µl di soluzione di BSA a concentrazione nota o di campione, contenente tra 10 a 100 µg di proteine, sono stati aggiunti 600 µl della soluzione C. La miscela, dopo vigorosa agitazione, è stata incubata per 60 min a temperatura ambiente. In seguito, sia alle soluzioni standard, sia ai campioni, sono stati aggiunti 60 µl di

reattivo, costituito da una soluzione di Folin-Ciocalteu, diluita 1:1 con H<sub>2</sub>O prima dell'uso. Dopo incubazione per 45 min a temperatura ambiente, il colore sviluppato (blu) è stata rilevato, misurando spettrofotometricamente l'assorbanza a 660 nm. Ogni aliquota è stata analizzata in triplicato. Dai valori di assorbanza ottenuti, grazie alla retta di taratura (costruita esprimendo l'assorbanza degli standard in funzione della concentrazione) e tenendo conto delle diluizioni, è stata calcolata la concentrazione proteica delle HDL in mg/ml.

#### **2.2.4 Cromatografia di affinità con Eparina-Sefarosio**

Le HDL, ottenute mediante ultracentrifugazione dal plasma dei conigli alimentati con dieta normale o arricchita in colesterolo, sono state caricate in una colonna di Eparina-Sefarosio, equilibrata con 50 mM NaCl, 5 mM Tris/HCl, pH 7.4. Questa colonna ritiene le frazioni di HDL contenenti Apo E e rilascia, nel *flow through*, HDL<sub>3</sub> “povere” di Apo E, cioè piccole lipoproteine con bassi livelli di colesterolo (Fragoso and Skinner, 1993). Il materiale, legato alla colonna, è poi eluito con soluzioni con differente concentrazione di NaCl e MnCl<sub>2</sub>, in accordo ad una procedura pubblicata (Wilson et al., 1992).

La colonna è stata attivata mediante 15 ml di una soluzione di 50 mM NaCl, 5 mM Tris-HCl pH 7.4 contenente 25 mM MnCl<sub>2</sub>. Ad un volume di HDL (1.5 ml), con concentrazione proteica di 3 mg/ml, è stato aggiunto MnCl<sub>2</sub> fino a raggiungere la concentrazione di 25 mM Mn<sup>2+</sup>, prima della carica sulla colonna (Weisgraber & Mahley, 1980). Il campione, caricato in colonna, è stato equilibrato per 8 h, prima dell'eliminazione del materiale non legato, mediante lavaggio della colonna con lo stesso tampone di equilibratura. Dopo che questo materiale è stato rimosso dalla colonna, la frazione di HDL è stata eluita con i seguenti tamponi, tutti contenenti 5 mM Tris-HCl pH 7.4: (1) 25 mM NaCl / 80 mM MnCl<sub>2</sub>; (2) 50 mM NaCl / 25 mM MnCl<sub>2</sub>; (3) 75 mM NaCl / 25 mM MnCl<sub>2</sub>; (4) 50 mM NaCl / 12.5 mM MnCl<sub>2</sub> / 12.5 mM MgCl<sub>2</sub>; (5) 50 mM NaCl / 6.2 mM MnCl<sub>2</sub> / 18.6 mM MgCl<sub>2</sub>; (6) 0.1 M NaCl; (7) 0.6 M NaCl. Sulla base della loro assorbanza a 280 nm, le frazioni sono state espresse

come cromatogramma e quelle che definivano un picco sono state riunite e dializzate (contro 130 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.4), per essere poi analizzate mediante elettroforesi ed ELISA.

### ***2.2.5 Elettroforesi***

L'elettroforesi, in condizioni riducenti e denaturanti (SDS-PAGE), è stata eseguita su gel discontinuo, sostanzialmente in accordo al metodo di Laemmli (1970). Per preparare il gel, è stata utilizzata una soluzione madre di acrilammide e bis-acrilammide (N,N'-metilene-bisacrilammide), rispettivamente al 30% ed allo 0,8%. Il gel di separazione era costituito da una matrice di poliacrilammide al 12.5%, contenente 300 mM Tris-HCl a pH 8.8 e 0,1% SDS; sopra questo gel, è stata stratificata un'altra matrice di poliacrilammide al 6%, contenente 137 mM Tris-HCl a pH 6.8 e 0,1% SDS. Per la polimerizzazione sono stati utilizzati, come catalizzatori, persolfato di ammonio e TEMED (N,N,N',N'-tetrametil, etilendiammina), secondo una procedura pubblicata (Laemmli, 1970). Le dimensioni del gel di separazione erano: 8 cm (altezza) x 6,5 cm (larghezza) x 0,15 cm (spessore); quelle del gel superiore, in cui erano stati formati pozzetti per inserimento di apposito stampo di plastica, erano: 2 cm (altezza) x 6,5 cm (larghezza) x 0,15 cm (spessore). Il tampone di corsa (a pH 8.3) è stato preparato sciogliendo 14,4 g di glicina e 3 g di Tris in un litro di acqua bidistillata, a cui sono stati aggiunti 10 ml di 10% SDS. I campioni, preparati in un tampone riducente e denaturante (62,3 mM Tris-HCl a pH 8.6, 10% di glicerolo, 5%  $\beta$ -mercaptoetanolo, 0.3% blu di bromofenolo, 5% SDS) (O'Farrell, 1975), sono stati incubati a 100° C per 5 min e, poi, caricati nei pozzetti sul gel. L'elettroforesi, effettuata a 30 mA per 90 min, è stata bloccata quando il colorante ha raggiunto l'estremità inferiore del gel. Dopo l'elettroforesi, il gel è stato immerso in una soluzione contenente 25% isopropanolo e 10% acido acetico, allo scopo di fissare le proteine. Dopo circa 1 h, la soluzione di fissaggio è stata rimossa e sostituita con un'altra simile, contenente 0.25% di colorante (Coomassie Brilliant Blue R-250). Dopo 1 h di colorazione, il gel è stato decolorato, mediante ripetuti lavaggi con acido

acetico al 10%, finchè non è stato ottenuto uno sfondo trasparente. Tutte le procedure sopra descritte sono state effettuate sotto costante agitazione, a temperatura ambiente.

### **2.2.6 Procedura ELISA per la titolazione di Hpt, di Apo A-I, di Apo E**

Un'aliquota di plasma (10 µl), di coniglio o di topo, è stata miscelata con tampone di *coating* (7,3 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 17 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1,5 mM NaN<sub>3</sub>, pH 9,6) per preparare diverse diluizioni del campione (1:20.000, 1:30.000, 1:45.000, 1:65.000, 1:90.000, 1:200.000). La quantità di Apo A-I e di Hpt è stata determinata usando antigeni di coniglio o topo, come standard per la calibrazione, isolati secondo procedure pubblicate (Spagnuolo MS et al., 2003; Brewer H B et al., 1986) e che esibivano oltre il 98% di purezza per analisi elettroforetica (densitometria del tracciato). La quantità di Apo E è stata determinata usando l'antigene umano come standard per la calibrazione. Aliquote di ciascuna diluizione (50 µl) sono state deposte in ciascuno dei pozzetti della micropiastra che, successivamente, è stata incubata per tutta la notte a 4°C oppure per due ore a temperatura ambiente. Durante questa fase, il campione interagiva con il pozzetto di plastica, formando legami stabili, in modo proporzionale alla sua concentrazione (fase di *coating*). Dopo l'incubazione, le piastre sono state lavate tre volte con il tampone EWB (20 mM Tris-HCl a pH 7.3, 130 mM NaCl, 0.05% Tween-20) e tre volte con il tampone TBS (20 mM Tris-HCl a pH 7.3, 0.5 M NaCl). Successivamente, è stata saturata la capacità legante o di adsorbimento aspecifico della plastica (fase di *blocking*), con un tampone contenente BSA (20 mM Tris-HCl a pH 7.3, 130 mM NaCl, 0.5% BSA), incubando la piastra per 1 h a 37°C; dopo il *blocking*, le piastre sono state lavate come precedentemente descritto. A questo punto, si è proceduto all'incubazione di ciascun pozzetto con l'anticorpo primario, diluito in 60 µl con il tampone DB (0.025% BSA in EWB). In particolare, è stata utilizzata una diluizione di 1:1000 per IgG anti-Hpt, IgG anti-Apo A1 e IgG anti-Apo E. L'incubazione è stata effettuata a 37°C per 1 h. E' stato, quindi, ripetuto il lavaggio delle piastre e, poi, si è proceduto con l'incubazione di ciascun pozzetto con 70 µl di anticorpo secondario (Ab DAS-HRP per Hpt e Apo A-I; Ab GAR-HRP



per Apo E) diluito 1:2000 nel tampone DB. Anche in questo caso l'incubazione è stata di 1 h a 37°C. Dopo il lavaggio delle piastre, sono stati aggiunti 100 µl di substrato per la perossidasi: 20 mg di OPD e 120 µl di 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sono stati aggiunti a 50 ml di una soluzione costituita da 30 mM acido citrico e 75 mM NaHPO<sub>4</sub> a pH 5. Dopo 60 minuti di incubazione a 37°C, sono stati aggiunti, ad ogni pozzetto, 50 µl di 2,5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, per bloccare la reazione. In seguito all'incubazione con il substrato, si è sviluppato colore in misura proporzionale alla concentrazione di enzima (legato all'anticorpo secondario); tale sviluppo rispecchiava la concentrazione degli immunocomplessi formati tra anticorpo primario e antigene: la misura spettrofotometrica dell'assorbanza a 492 nm ha permesso, quindi, di determinare indirettamente la quantità di antigene presente nel pozzetto, che è stata espressa in mg/ml o in molarità.

### ***2.2.7 Saggio dell'attività di LCAT***

L'attività dell'enzima LCAT è stata determinata misurando la conversione del colesterolo in estere del colesterolo, utilizzando, come substrato dell'enzima, un proteoliposoma artificiale, preparato in accordo ad una metodica pubblicata (Chen et Albers, 1982; Sparks et al,1992). La preparazione del proteoliposoma è stata effettuata miscelando, in un tubo di vetro di 15 ml, 0.08 ml di fosfatidilcolina (50 mg/ml), 0.018 ml di una soluzione etanolica di colesterolo (1 mg/ml) e 0.0289 ml di una soluzione etanolica di [1α,2α(n)-<sup>3</sup>H] colesterolo (1 µCi/ml). La miscela risultante è stata portata a secco, sotto flusso di azoto, a temperatura ambiente: a questo punto, sono stati aggiunti nel tubo 0.15 ml di tampone TBE (10 mM Tris-HCl a pH 7.4, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA) e 0.021 ml di una soluzione di 725 mM sodio colato in TBE. La dispersione è stata agitata vigorosamente, per 3 min, e incubata a 37°C per 1,5 h; anche durante l'incubazione, la miscela è stata agitata vigorosamente (ogni 10 min), affinché diventasse completamente chiara. Al termine dell'incubazione, 0.033 ml di Apo A-I (3.28 mg/ml) sono stati aggiunti alla miscela ed è stata effettuata una

seconda incubazione di 1 h a 37°C. Infine, la miscela è stata dializzata in TBE, per 20 h a 4°C, per rimuovere il colato. Nel proteoliposoma così preparato il rapporto molare Apo A-I: fosfatidilcolina: colesterolo è 1.5: 200: 18.

La massima capacità catalitica dell'enzima è stata misurata utilizzando un eccesso di proteoliposoma. A tale scopo, è stato eseguito un saggio di attività enzimatica preliminare, utilizzando concentrazioni crescenti di substrato (1 µl della diluizione 1:20; 1-3-5-10-20 µl della diluizione 1:10; 10-15 µl della diluizione 1:5). Questo saggio ha stabilito che il proteoliposoma era in eccesso rispetto all'enzima, quando sono stati utilizzati 10 µl della diluizione 1: 5. Il saggio dell'attività di LCAT è stato effettuato, quindi, preparando diversi tubi in cui sono stati aliquotati 8.3 µl di HSA al 6% e 10 µl di sospensione di proteoliposoma diluito 1: 5. I diversi tubi sono stati portati ad un volume finale di 100 µl con TBE e preincubati a 37°C per 30 min. Dopo questa fase, sono stati aggiunti 2.5 µl di 2 mM β-mercaptoetanololo e 3.5 µl di plasma di ciascun coniglio o topo, precedentemente deprivato di LDL e VLDL (per trattamento con 0.16 M CaCl<sub>2</sub> e 0.08% destran-solfato, seguito da centrifugazione e recupero del supernatante) (Burstein et al., 1970). La miscela è stata agitata e incubata a 37°C per 60 minuti. Al termine dell'incubazione, la reazione enzimatica è stata bloccata con 130 µl di etanolo assoluto. A ciò sono seguite 3 estrazioni sequenziali, ciascuna con 500 µl di esano. Gli estratti di esano sono stati riuniti e la miscela risultante è stata portata a secco sotto flusso di azoto; successivamente, il materiale è stato ridisciolti in 50 µl di cloroformio e trasferito su una lastrina (gel di silice, su supporto di plastica) per TLC (*Thin Layer Chromatography*) utilizzando capillari di borosilicato. La fase mobile, per la TLC, era costituita da etere di petrolio / etere etilico / acido acetico in rapporto 90:30:1. In queste condizioni, a causa di un'interazione differente con il tampone, colesterolo ed esteri del colesterolo migrano con velocità diverse; in particolare, gli esteri (che sono molecole più apolari del colesterolo) si ripartiscono preferenzialmente nella fase mobile e, quindi, migrano più velocemente, mentre il colesterolo si sposta solo di poco dal punto in cui è stato depositato. Alla fine della corsa, la lastrina è stata esposta a vapori di iodio. In tal

modo, sono state evidenziate le aree raggiunte dalle migrazioni del colesterolo libero e del colesterolo esterificato. Colesterolo standard (7  $\mu\text{g}$ ) è stato usato come controllo su ciascuna lastrina, per distinguere le due forme di colesterolo. Le lastrine sono state tagliate in modo da recuperare le aree contenenti colesterolo o estere, che sono state immerse in fiale di scintillazione, contenenti 3 ml di liquido di scintillazione (Insta-Gel). La radioattività incorporata nel prodotto di reazione (estere del colesterolo) o residua nel reagente (colesterolo) è stata misurata per fotometria di scintillazione. L'attività di LCAT è stata calcolata come percento di colesterolo esterificato in 1 h e, poi, convertita in attività molare (nmoli di colesterolo esterificato per h per ml di campione), secondo un uso diffuso in letteratura. Ogni campione è stato analizzato in triplicato. L'attività di LCAT, in vitro, è stata misurata usando anche proteoliposomi contenenti differenti rapporti molari Apo A-I/Apo E (4:0;3:1;2:2;1:3;0:4) come substrato, in accordo ad una procedura pubblicata (Zorich et al., 1985), e un pool di plasma di coniglio (deprivato di LDL e VLDL, come sopra descritto) come fonte dell'enzima. Le miscele di reazioni sono state preparate come descritto in precedenza.

### ***2.2.8 Titolazione del colesterolo libero (C) e degli esteri del colesterolo (CE) nel plasma. Determinazione del rapporto CE/C***

I campioni di plasma, di coniglio o di topo, sono stati previamente trattati con  $\text{MnCl}_2$  e destran-solfato, fino alle rispettive concentrazioni finali di 0.05 M e 0.1%, per precipitare le VLDL e le LDL (Burnstein et al., 1970). Dopo 20 min di incubazione a temperatura ambiente, la soluzione è stata centrifugata per 10 min a 6000 g. La determinazione quantitativa di colesterolo (C) e degli esteri del colesterolo (CE) è stata effettuata, essenzialmente in accordo ad una procedura pubblicata (Deacon et al, 1979), sottoponendo il surnatante (contenente solo le HDL) a saponificazione, mediante trattamento con una soluzione etanolica di KOH 5 M. Questa procedura consente di ottenere l'idrolisi completa dei CE. In particolare, il campione è stato diviso in due aliquote; un'aliquota (25  $\mu\text{l}$ ) è stata incubata per 1 h a 75°C con 250  $\mu\text{l}$  di una soluzione etanolica di 5 M KOH; l'altra aliquota (25  $\mu\text{l}$ ) è stata incubata con

250 µl di una soluzione costituita da H<sub>2</sub>O ed etanolo (1:1, v/v), per la titolazione del colesterolo libero. Terminata l'incubazione, 150 µl di 1% NaCl e 2 ml di esano freddo sono stati aggiunti ad entrambe le miscele. Dopo vigorosa agitazione e rimozione accurata dell'estratto di esano, la fase sottostante è stata estratta altre 2 volte, ciascuna con 2 ml di esano. A questo punto, le 3 fasi di estrazione organica sono state riunite in un unico tubo e portate a secco, sotto flusso di azoto. Successivamente 200 µl di fase mobile per HPLC (acetonitrile / isopropanolo, 57:43, v:v) sono stati aggiunti al tubo per solubilizzare la pellicola lipidica e, dopo agitazione, 20 µl della soluzione risultante sono stati utilizzati per l'analisi su colonna C18 (4.6 mm x 25 cm.; particelle di 5 µm). La cromatografia è stata eseguita a 40°C in condizioni isocratiche, ad un flusso di 1 ml/min, con rivelazione UV a 205 nm, secondo una procedura pubblicata (Cigliano et al., 2001).

L'analisi per HPLC (*High-Performance Liquid Chromatography*) è stata effettuata sia per il campione nativo, per misurare il contenuto di colesterolo libero (C) delle HDL, sia per quello sottoposto a trattamento chimico, per misurare il contenuto di colesterolo totale (C+CE). E' stata poi calcolata la differenza fra queste quantità, che rappresenta la quantità di esteri del colesterolo nell'estratto di HDL (CE). Infine, è stato calcolato il rapporto CE/C che riflette l'entità di esterificazione del C *in vivo* ad opera di LCAT (Subbaiah et al, 1997). Anche le frazioni di HDL, provenienti dai conigli alimentati con dieta normale o arricchita in colesterolo, ottenute dalla colonna di Eparina-Sefarosio, dopo essere state riunite in due distinte miscele, una contenente i picchi di lipoproteine con Apo E a livelli maggiori (HDL "Apo E-ricche") e l'altra contenente tutti gli altri picchi con tracce di Apo E (HDL "Apo E-povere"), sono state analizzate con la procedura ora descritta, per determinare il loro contenuto in C e CE. Una retta di calibrazione ( $r^2 \geq 0.9997$ ), ottenuta iniettando diverse quantità (n=12) di colesterolo standard e riportando in grafico l'integrazione dei picchi di assorbanza in funzione della quantità iniettata sulla colonna, è stata utilizzata per l'analisi quantitativa dei campioni

### **2.2.9 Legame del peptide P2a (sequenza 141-164 di Apo A-I) alle HDL**

La capacità legante del peptide P2a alle HDL è stata verificata mediante ELISA. In particolare il *coating* è stato effettuato aliquotando, in ciascun dei pozzetti, 50 µl di HDL (0,012 µg/µl, in tampone di *coating*) e incubando la piastra per tutta la notte a 4°C. Dopo i lavaggi della piastra con EWB e TBS, la capacità legante dei pozzetti della piastra è stata saturata mediante incubazione (37°C, 1h) con 0,5% BSA in TBS (fase di *blocking*). Dopo il *blocking*, le piastre sono state lavate come precedentemente descritto. Per la fase di *binding*, che è durata 90 min a 37° C, sono stati immesse nei pozzetti aliquote di 60 µl di P2a in concentrazioni crescenti (6, 18, 60 e 180 µM). Successivamente, è stata effettuata l'incubazione di ciascun pozzetto (75 min a 37°C) con 60 µl di avidina-HRP (diluita 1:6000 in DB) e, in seguito al lavaggio della piastra, sono stati aggiunti 100 µl di substrato per la perossidasi. Dopo 60 minuti di incubazione a 37°C, sono stati aggiunti, ad ogni pozzetto, 50 µl di 2,5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, per bloccare la reazione. La misura spettrofotometrica dell'assorbanza a 492 nm ha permesso, quindi, di determinare indirettamente la quantità di peptide presente nel pozzetto. Mediante la stessa procedura, ma con una fase di *binding* che è stata effettuata per tempi diversi (30, 60, 90 e 120 min) è stata valutata la capacità del peptide P2a di interagire, nel tempo, con le HDL. L'esperimento di cinetica è stato eseguito utilizzando separatamente due concentrazioni di peptide (18 e 60 µM).

### **2.2.10 Stabilità del peptide P2a nel plasma dei topi infiammati**

L'esperimento è stato condotto con peptide P2a, in forma biotinilata, su un pool di plasma proveniente da topi infiammati per 48 h. La prova è stata effettuata considerando la diluizione che subisce il peptide P2a in seguito alla sua immissione nel volume plasmatici circolante (circa 15 volte): 10 µl di soluzione di peptide P2a in 150 µl di una miscela di plasma, utilizzando diverse concentrazioni finali di peptide nel plasma: 0,1; 0,05 e 0,01 µg/µl. L'attività delle proteasi plasmatiche sul peptide è stata determinata a 37°C per 30 min, mentre il controllo è risultato dalla stabilità del peptide nel plasma, incubato a 0°C per 1 h (condizioni di blocco dell'attività di

qualsiasi enzima). Dopo l'incubazione, è stata eseguita la rilevazione del peptide P2a mediante ELISA. In particolare, il plasma incubato è stato miscelato con tampone di *coating* (7,3 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 17 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1,5 mM NaN<sub>3</sub>, pH 9,6) per preparare i campioni diluiti 1:2, 1:5, 1:10, 1:50. Aliquote di ciascuna diluizione (50 µl) sono state deposte nei pozzetti della micropiastra, che successivamente è stata incubata per tutta la notte a 4° C. Dopo l'incubazione, la micropiastra è stata lavata tre volte con il tampone EWB e tre volte con il tampone TBS. Successivamente, è stata saturata la capacità legante della plastica (fase di *blocking*) con un tampone contenente BSA (20 mM Tris-HCl a pH 7,3; 130 mM NaCl; 0,5% BSA), incubando per 1 ora a 37°C; dopo il *blocking*, le piastre sono state lavate come precedentemente descritto. Successivamente, sono state effettuate un'incubazione (60 min a 37°C) con avidina-HRP (diluita 1:10000) ed un'altra con il substrato della perossidasi (60 min a 37°C). Dopo quest'ultima incubazione, sono stati aggiunti ad ogni pozzetto 50 µl di 2,5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, per bloccare la reazione. La misura spettrofotometrica dell'assorbanza a 492 nm ha permesso, quindi, di determinare indirettamente la quantità di P2a-liposoma presente nel pozzetto.

### ***2.2.11 Tecniche per l'analisi istologica ed immunoistochimica dell'arco aortico di coniglio***

In seguito al sacrificio degli animali (eutanasia con Tanax), l'arco aortico dei conigli (sia dei controlli che dei trattati) è stato asportato dalla cavità toracica e posto immediatamente in liquido di fissazione detto di "Bouin" (acido picrico, formalina, acido acetico, 15:5:1 v/v) per 24 h. Dopo che sono stati lavati a lungo in alcool etilico al 75%, gli archi aortici sono stati disidratati in alcool etilico al 95% (24 h) e poi in alcool etilico al 99% (3 h). Di seguito si è operata la chiarificazione in 100% metilbenzoato (almeno 48 ore), lavaggio in benzene (30 min) e inclusione dei pezzi in paraffina.

I pezzi, così ottenuti, sono stati affettati al microtomo, realizzando sezioni trasversali dell'arco aortico, dello spessore di 7 µm. Le sezioni così ottenute, sono state montate

su vetrini poli-lisinati, cioè ospitanti 10 µl di soluzione acquosa di poli-L-lisina (1 mg/ml) e poi asciugati su piastra riscaldata a 40°C. Tutte le sezioni, prima della colorazione, sono state allontanate dalla paraffina con xilolo e reidratate in alcool etilico. I preparati sono stati immersi, per 1-5 min, in 2% Emallume-acido di Mayer (0.2% ematossilina, 10% allume di potassio), poi lavati prima in acqua distillata e poi in acqua di fonte per 15 min. Di seguito, essi sono stati colorati con immissione in 0.25% eosina acida per 5 secondi. Sono seguiti il risciacquo in acqua distillata, la disidratazione e il montaggio dei vetrini con Eukitt per l'osservazione al microscopio. Per l'analisi immunoistochimica, le sezioni di tessuto di arco aortico sono state deparaffinizzate, reidratate attraverso gradienti alcolici, lavate con TBS e trattati due volte, ciascuna volta per 15 min a 90°C, con 100 mM sodio acetato a pH 6. Dopo lavaggio dei vetrini con TBS, le sezioni sono state incubate prima con 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in metanolo assoluto (per 15 min) ed in seguito con 5 mg/ml BSA in TBS (per 1 h) per bloccare i siti di legame aspecifici (Chen et al., 1999). I singoli passaggi sono stati separati da lavaggi in TBS. Così preparate, le sezioni sono state incubate con anti-Apo A-I (1:100), anti Apo E (1:100) o anti-RAM 11 (1:100) per 60 min a temperatura ambiente. RAM 11 (*rabbit alveolar macrophage*) è un antigene citoplasmatico dei macrofagi di coniglio. Dopo lavaggio in TBS, le sezioni sono state incubate con Ab DAS-HRP (1:200) per Apo A-I, Ab GAR-HRP (1:200) per Apo E o Ab GAM-HRP (1:200) per i macrofagi. Gli immunocomplessi sono stati localizzati utilizzando diaminobenzidina (DAB), come cromogeno, e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. I controlli negativi sono stati ottenuti omettendo l'incubazione con l'anticorpo primario con le sezioni di tessuto.

Le immagini di microscopia ottica sono state acquisite utilizzando una telecamera Progress 3800 (Kontron Elettronica) montata su un microscopio Zeiss Axioskop ed il programma informatico Ks300. Le immagini sono state acquisite a vari ingrandimenti, variabili tra 10 e 100x. Le foto scelte sono state ottenute utilizzando "Adobe Photoshop" come programma informatico di gestione di immagini per PC.

### ***2.2.12 Analisi statistica***

Le analisi per le titolazioni delle proteine (Hpt, Apo A-I, Apo E) e per la determinazione dell'attività LCAT sono state effettuate in triplicato. Le titolazioni di colesterolo per HPLC sono state effettuate in duplicato. I valori dei parametri analizzati sono espressi come media  $\pm$  deviazione standard (DS). I grafici, le analisi di regressione lineare, il T-test e l'ANOVA sono stati ricavati utilizzando il programma informatico di analisi statistica "Graph Pad Prism 3" (Graph Pad Software, San Diego, CA, USA).



### **3. SCOPO E RATIONALE DEL LAVORO**

Questo lavoro di tesi ha avuto lo scopo di studiare le alterazioni a carico delle principali proteine coinvolte nel RCT, rispetto ai parametri fisiologici, durante l'aterogenesi (utilizzando conigli) e nella fase acuta dell'infiammazione (utilizzando topi). Diversi studi hanno, infatti, dimostrato la stretta correlazione tra questi due processi, sottolineando il ruolo dell'infiammazione in tutte le tappe dell'aterosclerosi (Ross, 1999; Libby et al., 2002; Fan and Watanabe, 2003). Nel primo caso è stato scelto il coniglio come modello animale: il motivo risiede nel fatto che in letteratura è nota la capacità di questi animali di sviluppare, rapidamente (in circa 2 mesi), una severa ipercolesterolemia, portando ad un prematuro manifestarsi di placche ateromatose, in risposta ad un trattamento che prevede un'alimentazione arricchita con colesterolo al 2% (Clarkson et al., 1974). Nel secondo caso, un'indagine preliminare in letteratura (Cabana et al., 1996; Lindhorst et al., 1997; Posadas et al.; 2004), ci ha consentito di individuare nel topo, infiammato con somministrazione di carragenina, un modello, utilizzato anche in passato (Di Rosa et al., 1971; Garcia Leme et al.; 1973) sia per comprendere i meccanismi coinvolti nell'infiammazione sia per saggiare nuovi farmaci con proprietà anti-infiammatorie.

Come già ampiamente descritto in precedenza, il meccanismo del RCT è finalizzato al recupero epatico del C periferico in eccesso. I principali fattori promotori di tale processo sono HDL, Apo A-I, Apo E ed LCAT. Tuttavia, nel corso dell'aterogenesi e dell'infiammazione, modifiche strutturali e funzionali a carico delle HDL e di LCAT e l'incremento di alcune proteine della fase acuta dell'infiammazione, come Hpt, possono rallentare significativamente RCT. Hpt, in particolare, è coinvolta indirettamente nel RCT legandosi ad Apo A-I ed inibendo, quindi, la stimolazione di LCAT (Cigliano et al., 2005), il principale enzima coinvolto nel RCT. Sono state quindi seguite nel tempo le variazioni quantitative di queste proteine nei 2 diversi modelli animali.

Dei due modelli animali considerati, il coniglio è quello che presenta più affinità con l'uomo circa la distribuzione e la composizione delle lipoproteine e la presenza di altri enzimi coinvolti nel metabolismo del colesterolo. Le principali caratteristiche

possono essere così riassunte: 1) le LDL di coniglio sono simili a quelle umane nella loro composizione chimica e contenuto di apoproteine; 2) gli epatociti dei conigli non modificano mRNA per ApoB, quindi, producono VLDL contenenti ApoB-100 come nell'uomo; 3) CETP, che gioca un ruolo centrale nel processo aterosclerotico, è abbondante sia nel plasma umano che in quello di coniglio; 4) i conigli sono molto suscettibili all'aterosclerosi indotta dalla dieta. Il topo differisce dal coniglio, e quindi dall'uomo, in ognuno di questi aspetti. Infatti, 1) mRNA per Apo B è modificato ampiamente dagli epatociti, generando lipoproteine contenenti ApoB-48; 2) CETP è assente; 3) le HDL sono predominanti nel plasma conferendo resistenza all'aterosclerosi indotta dalla dieta; 4) il topo, essendo carnivoro, subisce molto più lentamente del coniglio gli effetti dell'accumulo di C (che è normalmente presente nella dieta murina). Il coniglio manca, però, di un analogo di Apo A-II umana ed è relativamente deficiente in lipasi epatica (HL), mentre sia Apo A-II che HL sono presenti nel topo. La HL presente nel coniglio è legato all'endotelio vascolare, come nell'uomo, mentre la maggior parte di HL nel topo circola nel plasma (Brousseau ME e Hoeg JM, 1999).

## 4 RISULTATI ED INTERPRETAZIONE DEI DATI

### 4.1 Premessa allo studio del RCT nei conigli

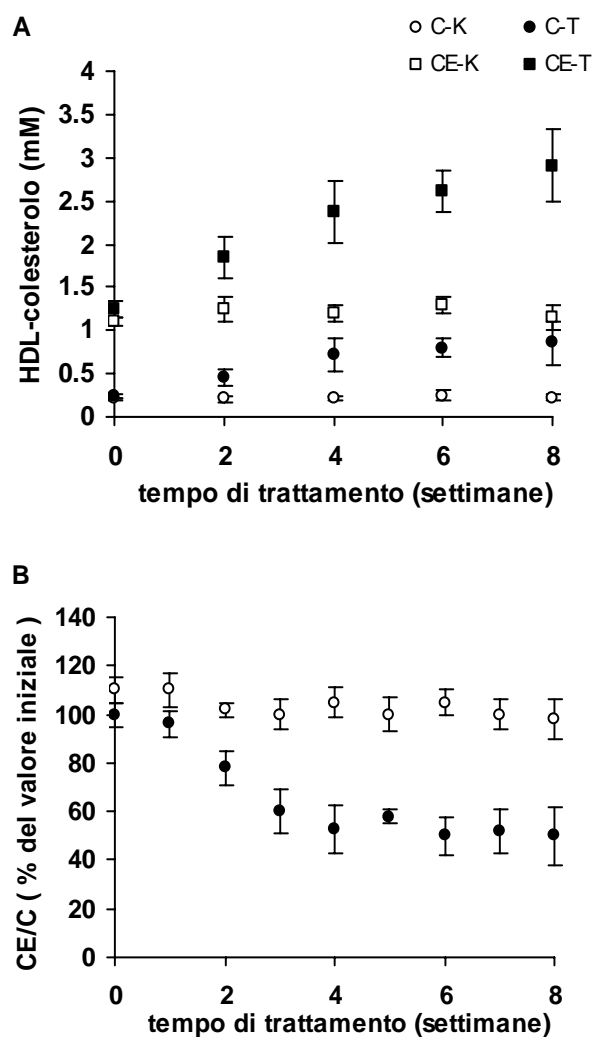
Lo studio è stato condotto su 12 conigli, di razza *New Zealand* (peso: 1.2 - 1.5 kg). Essi sono stati divisi in due gruppi (di 6 conigli ciascuno), a seconda del tipo di dieta a cui sono stati sottoposti. Un gruppo è stato alimentato con una dieta normale, mentre l'altro è stato alimentato con una dieta arricchita al 2% di colesterolo.

Il trattamento è durato 8 settimane, durante le quali sono stati effettuati prelievi ematici settimanali, dalla vena marginale dell'orecchio. Tali prelievi sono stati accompagnati da esame ecocardiografico e controllo della frequenza cardiaca, durante i quali i conigli erano anestetizzati. Tali controlli hanno permesso di monitorare, periodicamente, lo stato dei conigli: per gli esperimenti programmati, era assolutamente necessario escludere il contributo di eventuali patologie (soprattutto di tipo infiammatorio) alle condizioni fisiche determinate dal trattamento.

Sui campioni ematici sono state eseguite analisi, per osservare le variazioni plasmatiche dei seguenti parametri: l'attività dell'enzima LCAT, la concentrazione del colesterolo libero (C) e di quello totale (CT) nelle HDL, il rapporto tra gli esteri del colesterolo (CE) ed il colesterolo libero nelle HDL (CE/C), la concentrazione totale di Apo A-I e Hpt e, infine, la concentrazione di Apo E nel plasma deprivato di VLDL e LDL. Dopo 2 mesi di trattamento, i conigli sono stati sacrificati ed è stato effettuato il prelievo dell'arco aortico, per indagini di tipo immunoistochimico, e l'espianto del fegato per una valutazione approssimativa anatomo-patologica.

#### **4.1.1 Attività di LCAT nel plasma dei conigli sottoposti a dieta normale o arricchita in colesterolo**

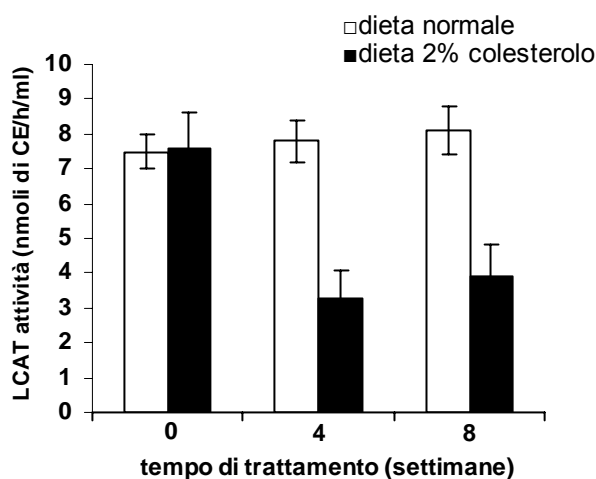
Un primo approccio allo studio dei fattori implicati nel trasporto inverso del colesterolo (RCT) è stato effettuato valutando l'attività dell'enzima LCAT nel plasma dei conigli sottoposti a dieta normale (N=6; gruppo controlli) o arricchita al 2% colesterolo (N=6; gruppo trattati). A tale scopo è stata determinata la quantità di esteri del colesterolo (CE) contenuti nelle loro HDL. Dopo 4 settimane di trattamento, i livelli di CE sono stati trovati significativamente più alti nei conigli trattati rispetto al gruppo dei controlli ( $2.38 \pm 0.36$  vs  $1.2 \pm 0.1$  mM nei controlli;  $P < 0.01$ ), e tali livelli sono stati trovati ulteriormente incrementati alla fine del trattamento ( $2.9 \pm 0.42$  vs  $1.1 \pm 0.15$  mM nei controlli;  $P < 0.01$ ), mentre nessuna variazione è stata riscontrata nei controlli (fig. 8, pannello A). Come atteso, anche i livelli di colesterolo non esterificato (C) sono più alti nei conigli trattati rispetto ai controlli dopo 4 ( $0.715 \pm 0.2$  vs  $0.22 \pm 0.03$  mM nei controlli;  $P < 0.01$ ) e 8 settimane ( $0.86 \pm 0.25$  vs  $0.23 \pm 0.04$  mM nei controlli;  $P < 0.01$ ) di trattamento. E' stato, in seguito, calcolato, il rapporto di CE con C nelle HDL, un parametro usato per valutare l'attività di LCAT in vivo, ed è stato rilevato che, dopo una progressiva e significativa ( $P < 0.01$ ) diminuzione durante le prime quattro settimane di trattamento, nessuna differenza dalla 4<sup>a</sup> alla 8<sup>a</sup> settimana è stata riscontrata nei conigli trattati ( $53 \pm 10$  vs  $50 \pm 12$  % del valore iniziale nei controlli) (Fig. 8, pannello B). In particolare, già dopo due settimane di trattamento, il rapporto CE/C nel gruppo dei conigli ipercolesterolemici, diviene significativamente ( $P < 0.01$ ) minore (30% più basso del valore iniziale) di quello trovato nei conigli di controllo. Il massimo della differenza viene raggiunto a 4 settimane di trattamento, tempo a cui tale rapporto diventa circa la metà del suo valore iniziale, per poi restare costante sino alla fine del trattamento. Il gruppo dei conigli controllo non subisce alterazioni significative di CE/C durante le 8 settimane del periodo sperimentale. Questi dati suggeriscono che la quantità di substrato non satura la capacità dell'enzima LCAT di convertire C in CE.



**Fig. 8: Contenuto di colesterolo libero (C) ed Esteri del colesterolo (CE) nelle HDL di conigli alimentati con dieta normale o colesterolemica.** L'analisi cromatografica del colesterolo per HPLC è stata effettuata sia per il campione nativo, per misurare il contenuto di colesterolo libero (C) delle HDL, sia per quello sottoposto a trattamento chimico, per misurare il contenuto di colesterolo totale (C+CE). E' stata poi calcolata la differenza fra queste quantità, che rappresenta la quantità di esteri del colesterolo nell'estratto di HDL (CE) ottenute da aliquote di plasma previamente deprivate di VLDL e LDL. Nel grafico il colesterolo libero (C) è indicato da cerchi mentre la quantità di esteri del colesterolo da quadrati (bianchi per i controlli e neri per i trattati). Sull'asse delle ordinate è riportata la concentrazione del colesterolo (espressa in mM) mentre in ascissa è riportato il tempo di stabulazione, espresso in settimane. I valori sono stati riportati come media (N=6)  $\pm$  deviazioni standard (DS) (pannello A). Dai valori ottenuti di C e di CE, è stato calcolato il loro rapporto sia nei conigli normali (cerchi bianchi), sia in quelli ipercolesterolemici (cerchi neri). In grafico (pannello B) è stato riportato il % del valore iniziale del CE/C in funzione del tempo, espresso in settimane. I risultati sono stati espressi come media (N=6)  $\pm$  deviazione standard (DS). Deviazioni superiori al 5% dalla media non sono state trovate.

Inoltre, quando la massima capacità catalitica di LCAT è stata misurata in vitro, determinando l'attività dell'enzima nel plasma mediante un saggio enzimatico sviluppato in eccesso di substrato (proteoliposoma, come descritto in Metodi), essa è

risultata nei conigli trattati la metà di quella riscontrata nel gruppo dei controlli e nessuna differenza è stata osservata tra la 4<sup>a</sup> e la 8<sup>a</sup> settimana di trattamento. Come si osserva dall'istogramma che descrive questo risultato (Fig. 9), al giorno zero c'è una differenza non significativa tra i due gruppi di conigli ( $7.5 \pm 0.5$  vs  $7.6 \pm 1$  nmoli/ml/h<sup>-1</sup> nei controlli), ma dopo 30 giorni l'enzima attivo risulta dimezzato nel gruppo dei conigli ipercolesterolemici ( $3.3 \pm 0.8$  vs  $7.8 \pm 0.6$  nmoli/ml/h<sup>-1</sup> nei controlli,  $P < 0.01$ ); tale differenza si mantiene inalterata anche dopo 60 giorni dal trattamento ( $3.9 \pm 0.9$  vs  $8.1 \pm 0.7$  nmoli/ml/h<sup>-1</sup> nei controlli,  $P < 0.01$ ).



**Fig. 9: Misura dei livelli dell'enzima LCAT nel plasma di coniglio.** I livelli di LCAT sono stati misurati, tramite saggio enzimatico in vitro condotto in eccesso di substrato, nel plasma di conigli normali ( $N=6$ ; barra bianca) e nel plasma di conigli ipercolesterolemici ( $N=6$ ; barra nera). Il grafico è stato costruito utilizzando i valori dell'attività dell'enzima (espressi in nmoli di CE/h/ml), presenti sull'asse delle ordinate, in funzione del tempo di trattamento (espresso in settimane), presente sull'asse delle ascisse. I dati sono riferiti alle medie dei valori e le deviazioni standard sono riportate. Le significatività, per quanto concerne i valori dei normali e non, sono riportate nel testo.

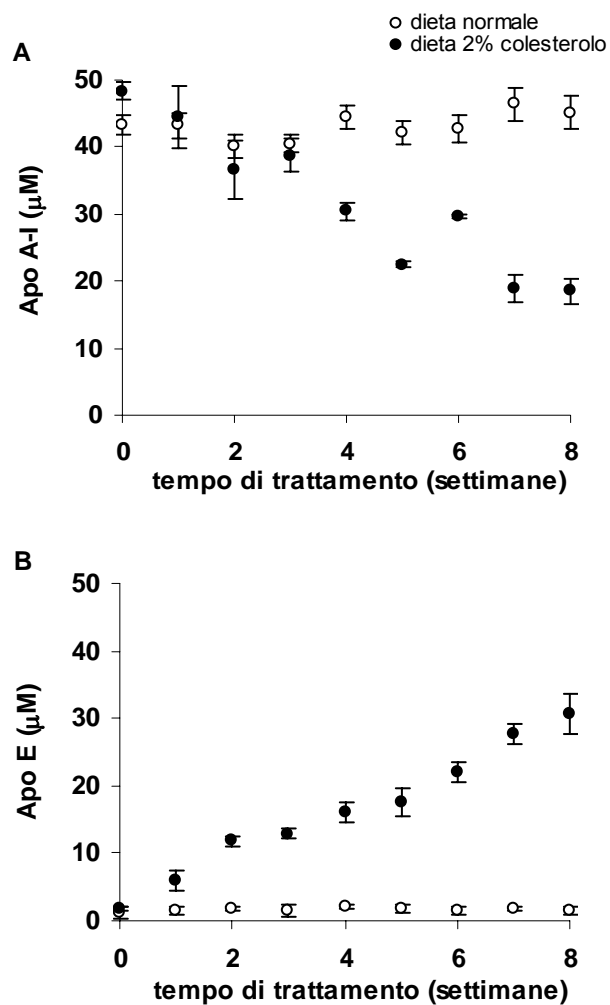
I risultati di questo esperimento suggeriscono che la dieta arricchita in C può determinare una ridotta sintesi epatica dell'enzima o una sua maggiore ossidazione. Tale ipotesi è sostenuta dal fatto che, in seguito all'ingente assorbimento di C, il fegato dei conigli ipercolesterolemici non presenta l'aspetto anatomico-morfologico normale, bensì chiare condizioni di disfunzione: tessuto fibrotico, poco elastico, con disposizione eterogenea di cisti ed accumuli di grasso (osservazione non mostrata). Tuttavia, sebbene diminuito, l'enzima risulta sufficientemente stimolato per la sua

attività di esterificazione dall'aumento di substrato (C), in accordo alla cinetica di Michaelis-Menten.

#### **4.1.2 Titolazione di Apo A-I, Apo E e Hpt nel plasma dei conigli**

L'attività di LCAT, come quella di qualsiasi enzima, dipende dalla concentrazione di substrato, ma richiede la presenza di noti effettori per la sua stimolazione. I maggiori effettori della stimolazione di LCAT sono Apo A-I e Apo E, mentre la sua attività è negativamente correlata alla quantità di Hpt. Quindi, allo scopo di ottenere più informazioni nella regolazione dell'attività enzimatica, sono stati analizzati i livelli di queste tre proteine durante il trattamento. Il plasma dei conigli è stato utilizzato come tale, per la titolazione di Apo A-I ed Hpt, e dopo trattamento con destran-solfato e  $MnCl_2$ , in maniera da escludere la quantità legata alle VLDL e LDL, per la titolazione di Apo E. Il livello di Apo A-I diminuisce progressivamente nei conigli trattati rispetto a quello dei controlli (dopo 4 settimane:  $30.3 \pm 1.4$  vs  $44.2 \pm 1.7$   $\mu M$  nei controlli,  $P < 0.01$ ; dopo 8 settimane:  $18.5 \pm 1.7$  vs  $45 \pm 2.5$  nei controlli,  $P < 0.01$ ) (Fig. 10, pannello A). Questo dato indica che l'aumento di CE, riscontrato nelle HDL dei conigli ipercolesterolemici, non dipende da un aumento dei livelli di Apo A-I.

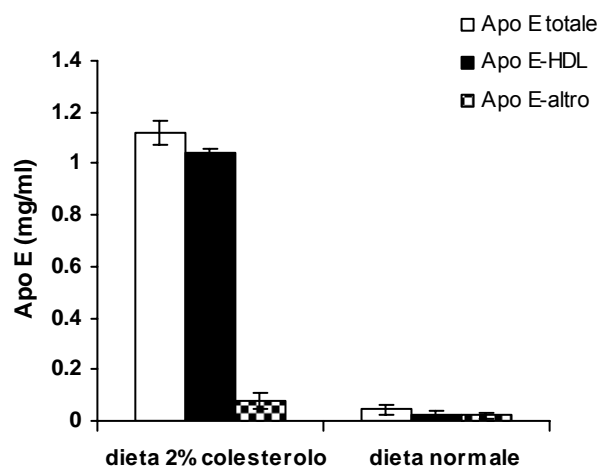
In maniera differente da ciò che è stato osservato per Apo A-I, il livello di Apo E (libera e/o legata alle HDL) aumenta progressivamente e marcatamente nei conigli trattati rispetto ai controlli (dopo 4 settimane:  $16.1 \pm 1.4$  vs  $2 \pm 0.2$   $\mu M$  nei controlli,  $P < 0.01$ ; dopo 8 settimane:  $30.5 \pm 2.9$  vs  $1.3 \pm 0.5$   $\mu M$  nei controlli,  $P < 0.01$ ) (Fig. 10, pannello B); inoltre i livelli di Apo A-I e quelli di Apo E nel gruppo dei conigli trattati sono risultati negativamente correlati ( $R = -0,961$ ).



**Fig. 10: Titolazione di Apo A-I ed Apo E.** I livelli di Apo A-I (pannello A) ed Apo E (pannello B) sono stati misurati, mediante ELISA, nel plasma dei conigli normali (cerchi bianchi) ed in quello dei conigli ipercolesterolemici (cerchi neri), durante il trattamento. I risultati sono stati espressi come media ( $N=6$ )  $\pm$  DS.

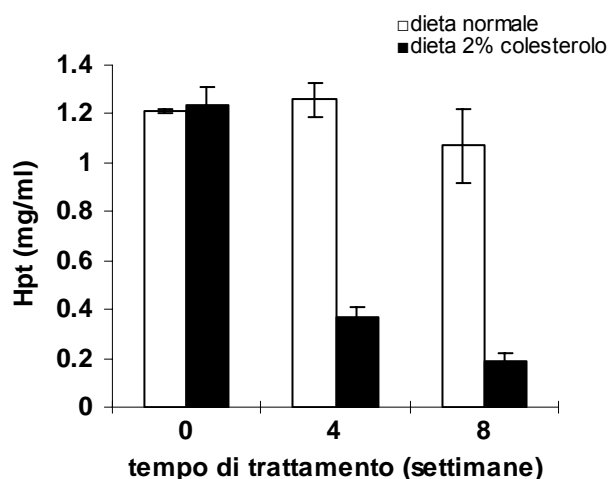
La titolazione di Apo E nel plasma dei conigli trattati, prima e dopo la precipitazione delle VLDL e delle LDL, mostra che l'incremento di Apo E non avviene su tali lipoproteine dal momento che più del 90% di questa apolipoproteina è associata con le HDL e/o libera nel plasma ( $1.04 \pm 0.02$  vs  $1.12 \pm 0.05$  mg/ml di Apo E totale), mentre nel gruppo dei conigli controllo la distribuzione di Apo E si ripartisce quasi in maniera uniforme tra le VLDL ed LDL rispetto alle HDL ( $0.02 \pm 0.01$  vs  $0.025 \pm 0.01$  mg/ml) (fig. 11).





**Fig. 11: Determinazione di Apo E prima e dopo precipitazione delle VLDL ed LDL.** La quantità di Apo E è stata determinata, mediante ELISA, prima e dopo precipitazione delle VLDL e delle LDL. La quantità di Apo E totale è indicata dalla barra bianca, quella legata alle HDL (e la quota libera) è indicata dalla barra nera e quella legata alle VLDL ed LDL (Apo E-altro) è indicata dalla barra a quadrati bianchi e neri nei conigli trattati ed in quelli controllo. I risultati sono stati espressi come media ( $N=6$ )  $\pm$  DS.

I livelli di Hpt, titolata mediante ELISA, nei conigli alimentati con la dieta arricchita in colesterolo sono stati trovati molto più bassi che nei controlli (fig. 12). In dettaglio, Hpt è stata trovata circa 3.4 volte ( $0.371 \pm 0.04$  vs  $1.26 \pm 0.07$  mg/ml nei controlli,  $P<0.01$ ) e 5.7 volte ( $0.188 \pm 0.03$  vs  $1.07 \pm 0.15$  mg/ml nei controlli,  $P<0.01$ ) meno concentrata che nei controlli dopo, rispettivamente, 4 e 8 settimane di trattamento.

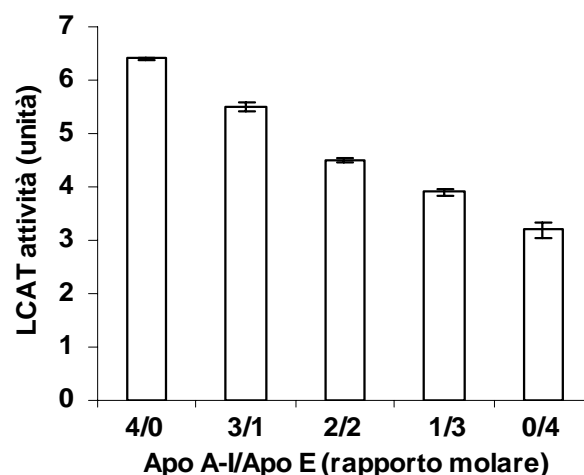


**Fig. 12: Titolazione di Hpt.** La quantità di Hpt presente nel plasma dei conigli normali (barra bianca) e di quelli trattati (barra nera) è stata titolata, mediante procedura ELISA, nel corso del trattamento. I risultati, riportati in mg/ml, sono stati espressi come media ( $N=6$ )  $\pm$  DS.

Questo dato sembra confermare che alterazioni epatiche possano sopraggiungere dopo un certo periodo dall'inizio della dieta e determinare una minore sintesi o

secrezione di importanti proteine di origine epatica, tra cui Hpt ed LCAT. Anche la diminuzione di Apo A-I potrebbe dipendere da tale alterazione funzionale del fegato; al contrario, la sintesi di Apo E potrebbe risentirne meno, data la capacità di diversi organi (come il cervello, la milza, i polmoni, le ovaie, i reni, i muscoli) e cellule (ad esempio i macrofagi) di provvedere alla sua sintesi e secrezione. In questo contesto, è noto che proprio in risposta a ox-LDL, cioè in condizioni di ipercolesterolemia, i macrofagi sono stimolati a secernere Apo E (Cader et al., 1997).

Questi dati suggeriscono che, durante il trattamento con la dieta arricchita in colesterolo, il ruolo inibitorio di Hpt sull'attività di stimolazione di Apo A-I su LCAT nel sangue potrebbe non essere rilevante. Inoltre, l'aumento di Apo E potrebbe essere funzionale a rilevare il ruolo di Apo A-I nella stimolazione di LCAT quando il livello di Apo A-I diminuisce. Allo scopo di verificare tale ipotesi, liposomi contenenti solo Apo A-I o differenti rapporti molari Apo A-I/Apo E (3:1; 2:2; 1:3, 0:4) sono stati utilizzati per stimolare l'attività di LCAT in vitro. Come mostrato in Fig. 13, l'attività di LCAT si riduce al diminuire del rapporto Apo A-I/Apo E; tuttavia, la sola Apo E presenta il 50% di efficienza di Apo A-I nella stimolazione di LCAT ( $4 \pm 0.12$  vs  $7.86 \pm 0.04$  nmoli/ml/h<sup>-1</sup> con liposomi contenenti solo Apo A-I,  $P < 0.01$ ).



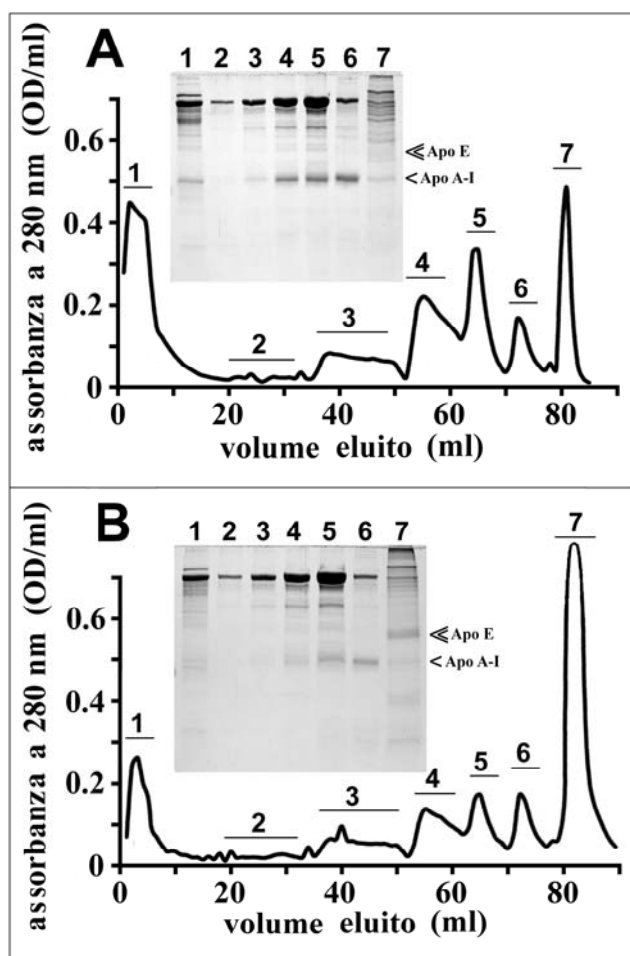
**Fig. 13: Valutazione dell'attività LCAT in presenza di liposomi contenenti un diverso rapporto molare Apo A-I/Apo E.** Liposomi contenenti un diverso rapporto molare Apo A-I/Apo E sono stati utilizzati in un saggio enzimatico in vitro per determinare la loro capacità di stimolare l'attività dell'enzima LCAT. Tale attività è stata saggiata in triplicato e viene espressa in nmoli di

*colesterolo esterificato per h per ml di plasma: deviazioni superiori al 5% del valore medio non sono state trovate.*

Questo grafico indica che occorrerebbe il doppio della concentrazione molare di Apo E per avere la stessa stimolazione di Apo A-I su LCAT. Apo E aumenta “solo” di 1.2 volte ( $30.5 \pm 2.9 \mu\text{M}$ ) rispetto a quanto Apo A-I diminuisce ( $\Delta = -26.5 \mu\text{M}$ ); quindi, la compensazione di Apo E nella stimolazione dell’attività di LCAT è solo parziale e l’aumento dell’attività di LCAT riscontrata nei conigli trattati è probabilmente associato ad un eccesso di substrato in circolo e ad una diminuzione dei livelli di Hpt rilevati.

#### ***4.1.3 Analisi delle sottofrazioni di HDL***

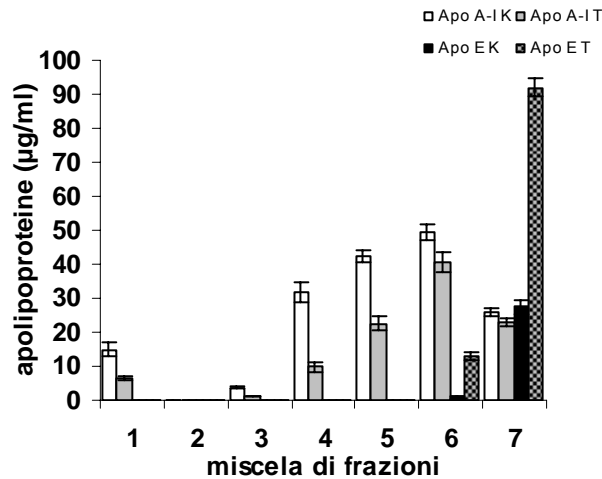
Le HDL sono state isolate da un pool di plasma, ottenuto dopo 8 settimane di trattamento sia dai conigli sottoposti alimentati normalmente sia da quelli trattati con C, mediante ultracentrifugazione (come riportato in Metodi); quindi sono state frazionate utilizzando una colonna di eparina-sefariosio. Questa resina ritiene le frazioni di HDL contenenti Apo E e rilascia nel *flow through* le HDL<sub>3</sub> “povere” di Apo E, cioè piccole lipoproteine con bassi livelli di C (Fragoso e Skinner, 1993). Il materiale ritenuto è stato eluito gradualmente, usando soluzioni con differenti concentrazioni di NaCl e MnCl<sub>2</sub>, in accordo ad una procedura pubblicata (Wilson et al., 1992). Come mostrato in figura 14, il cromatogramma ottenuto dal frazionamento delle HDL dei conigli trattati differisce da quello ottenuto dalle HDL dei conigli di controllo. In particolare, nel primo caso, le frazioni di HDL<sub>2</sub> (previste ed ottenute come picchi 4 e 5) sono minori di quelle ottenute nel secondo caso, così come la quantità di HDL<sub>3</sub> non contenente Apo E e rilasciate nel flow through (picco 1); invece, le frazioni di HDL<sub>3</sub> contenenti Apo E (indicate dai picchi 2 e 3) sono molto piccole e paragonabili nei due cromatogrammi. Una netta differenza è stata ottenuta per l’ultimo materiale raccolto (picco 7), che è stato eluito con un gradiente di NaCl (50-600 mM). Il picco 7 è stato trovato, infatti, molto più abbondante nelle HDL dei conigli trattati, mentre il picco 6 è risultato comparabile nei due gruppi.



**Fig. 14: Analisi delle sottofrazioni di HDL.** Le HDL isolate da un pool di plasma ottenuto distintamente dai conigli sottoposti a dieta normale (pannello A) e da quelli alimentati con una dieta arricchita in colesterolo (pannello B) sono state frazionate utilizzando una colonna di eparina-sefariosio. Il materiale ritenuto è stato eluito gradualmente, usando soluzioni con differenti concentrazioni di NaCl e MnCl<sub>2</sub>. Sulla base della loro assorbanza a 280 nm, le sottofrazioni di HDL sono state riunite per essere poi analizzate mediante SDS-PAGE al 12.5%.

Le frazioni di ciascun picco di eluizione sono state riunite e dializzate (contro 130 mM NaCl, 20 mM tris-HCl, pH 7.4) per essere, poi, analizzate mediante elettroforesi ed ELISA. Quando analizzate mediante elettroforesi (inserti in fig. 14), queste frazioni mostrano una differente composizione in apolipoproteine. In particolare, meno Apo A-I è stata trovata in tutte le frazioni ottenute dalle HDL dei conigli trattati rispetto a quelle dei conigli controllo. Inoltre, nel picco 7 delle HDL degli animali trattati, è stata riscontrata una maggiore quantità di Apo E. L'analisi, mediante ELISA, dei picchi di eluizione delle HDL conferma la minore quantità di Apo A-I nei picchi 1, 3, 4 e 5 di HDL dei conigli trattati rispetto a quelli dei controlli; solo piccole tracce (non determinabili) di Apo A-I sono state rilevate nel picco 2. In tutti questi

picchi (1, 2, 3, 4, 5) Apo E è stata rilevata in tracce. Apo A-I ed Apo E sono state trovate nei picchi 6 e 7 con una differente distribuzione quantitativa. In particolare, il rapporto Apo A-I con Apo E, nel picco 6, è risultato approssimativamente 50 e 3 rispettivamente nei conigli trattati ed in quelli controllo; nel picco 7, questo rapporto è risultato ulteriormente alterato, con valori di 1 e 0.25 (Fig. 15):



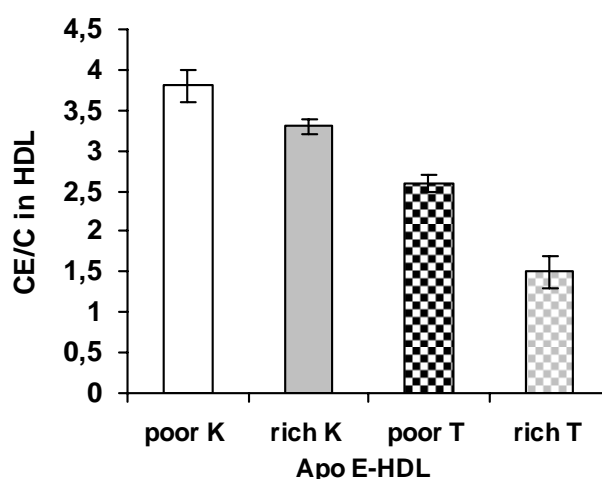
**Fig. 15: Titolazione di Apo A-I ed Apo E nelle frazioni di HDL.** Le frazioni di HDL sono state analizzate, mediante ELISA, per determinare il contenuto di Apo A-I ed Apo E in ciascuna di esse. I risultati sono espressi in µg/ml ± DS.

Questi risultati confermano i nostri dati sulla diminuzione dei livelli di Apo A-I nei conigli trattati e dimostrano che la principale sottopopolazione di HDL coinvolta nel RCT dei conigli trattati è quella ricca in Apo E.

#### **4.1.4 Determinazione del rapporto CE/C nelle frazioni di HDL separate con eparina-sefarosio**

Le frazioni di HDL provenienti dai conigli alimentati con dieta normale o arricchita in colesterolo, sono state riunite in due distinte miscele, una contenente i picchi di lipoproteine con Apo E a livelli maggiori (cioè i picchi 6 e 7) e l'altra contenente tutti gli altri picchi con tracce di Apo E (cioè i picchi 1, 2, 3, 4 e 5): queste miscele sono state denominate come "Apo E-ricche" ed "Apo E-povere". Le due miscele sono state

analizzate con la procedura, descritta in Metodi, per determinare il loro contenuto in C e CE. La frazione di HDL “Apo E-ricche” conteneva quantità di C non esterificato e di colesterolo esterificato (CE) maggiori nei conigli ipercolesterolemici che nei controlli (rispettivamente  $9.5 \pm 0.2$  vs  $2.5 \pm 0.1$  nmol,  $P < 0.01$ ;  $13.9 \pm 0.2$  vs  $8.25 \pm 0.1$  nmol,  $P < 0.01$ ); questa frazione rappresentava la principale sottopopolazione di HDL nei conigli trattati. Al contrario, la frazione di HDL “Apo E-povera” conteneva quantità di C non esterificato e di colesterolo esterificato (CE) minori nei conigli ipercolesterolemici che nei controlli (rispettivamente  $0.5 \pm 0.1$  vs  $0.92 \pm 0.2$  nmol,  $P < 0.01$ ;  $1.3 \pm 0.1$  vs  $3.5 \pm 0.2$  nmol,  $P < 0.01$ ). Il rapporto CE/C nelle HDL “Apo E-ricche” diminuiva marcatamente nei conigli trattati rispetto ai controlli ( $1.5 \pm 0.2$  vs  $3.3 \pm 0.1$   $P < 0.01$ ) così come nelle HDL “Apo E-povere” ( $2.6 \pm 0.1$  vs  $3.8 \pm 0.2$   $P < 0.01$ ) (Fig. 16).



**Fig. 16: Analisi di CE/C nelle frazioni di HDL.** Le frazioni di HDL, ottenute per cromatografia con eparina-sefariosio, sono state riunite in base al loro contenuto in Apo E. Ogni campione è stato diviso in due aliquote: una di esse è stata sottoposta ad idrolisi basica degli esteri del colesterolo. Dopo estrazione con esano, i lipidi di entrambe le aliquote sono stati analizzati mediante HPLC: il contenuto di colesterolo libero (C) è risultato dall’analisi dell’aliquota non sottoposta a idrolisi, mentre il contenuto di colesterolo totale (C+CE) è risultato dall’analisi dell’aliquota sottoposta a idrolisi. E’ stata poi calcolata la differenza fra queste quantità, che rappresenta la quantità di esteri del colesterolo nell’estratto di HDL (CE). I risultati sono stati espressi come media  $\pm$  DS.

Questi dati sono in accordo con la capacità di Apo E di stimolare LCAT per aumentare i livelli di CE delle HDL, compensando, anche se solo parzialmente, la

diminuzione di Apo A-I; inoltre, i dati sono compatibili con l'abilità di Apo E di aumentare la grandezza delle HDL, poiché è noto che le HDL con maggior quantità di Apo E sono più grandi (Matsuura et al., 2006; Mahley et al., 2006). La diminuzione del CE/C nella sottopopolazione delle HDL dei conigli trattati potrebbe dipendere dall'incapacità di LCAT di esterificare tutto il colesterolo rilasciato in circolo, sebbene esso sia stimolato al massimo.

#### **4.1.5 Analisi morfologica del fegato ed istologica dell'arco aortico**

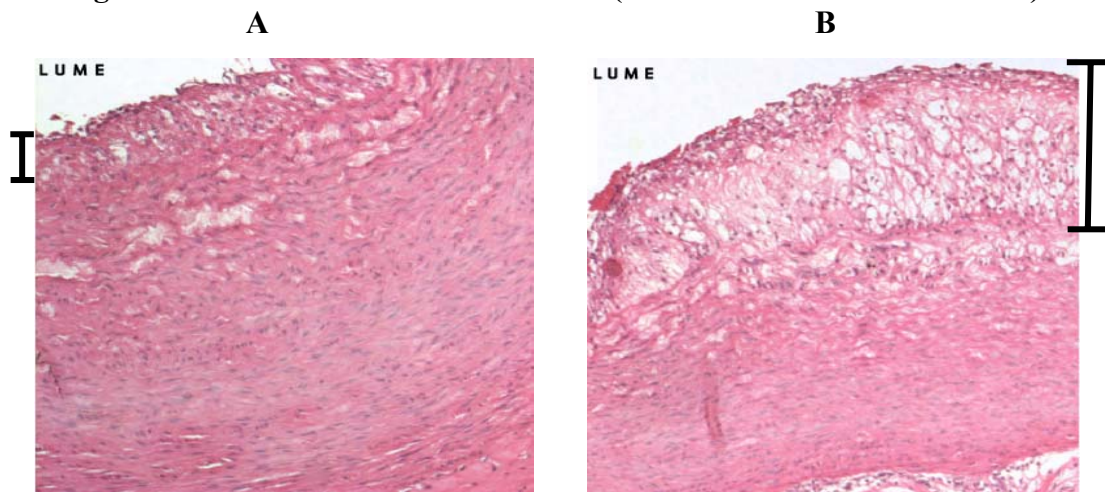
Alla fine del trattamento con la dieta arricchita con 2% colesterolo, i conigli sono stati sacrificati ed è stato possibile effettuare l'espanto del fegato ed il prelievo dell'arco aortico. In letteratura è noto, infatti, che animali sottoposti a dieta ipercolesterolemica sono in grado di sviluppare placche aterosclerotiche già dopo un mese di trattamento (Clarkson et al., 1974). In particolare, nei conigli, le lesioni sono distribuite, in modo predominante, nell'arco aortico.

Ad una prima indagine anatomo-patologica, il fegato dei conigli trattati è risultato grossolanamente aumentato di volume, con superficie più liscia e chiara del normale. Tali segni sono in accordo con un processo definito lipidosi, steatosi o degenerazione grassa, una patologia del fegato che ne altera seriamente la funzionalità.

Gli archi aortici di ciascun coniglio sono stati sottoposti a comuni procedure istologiche di fissazione, rivestimento con paraffina, affettamento del blocco risultante e, infine, colorazione delle lamine ottenute (con Emallume-Eosina). Sezioni trasversali sequenziali sono state osservate al microscopio ottico (Fig. 17). Evidenti differenze sono state riscontrate tra le sezioni dei due gruppi di animali: in particolare, i preparati dai conigli ipercolesterolemici presentavano un ispessimento a livello dello strato dell'intima vasale. Questo fenomeno è associato ad un rimodellamento della parete vasale, che assume un aspetto spugnoso dovuto all'accumulo di *foam cell* al di sotto dell'endotelio vasale: tale processo è alla base della formazione delle placche ateromatose. Al contrario, nei conigli normali, la

tonaca intima presentava dimensioni ridotte. Questi risultati dimostrano l'evidente effetto aterogenico delle condizioni ipercolesterolemiche (Fig. 17).

**Fig. 17** Sezioni trasversali arco aortico (colorazione Emallume-Eosina).



*Sezione trasversale della parete arteriosa di un coniglio sottoposto a dieta normale.*

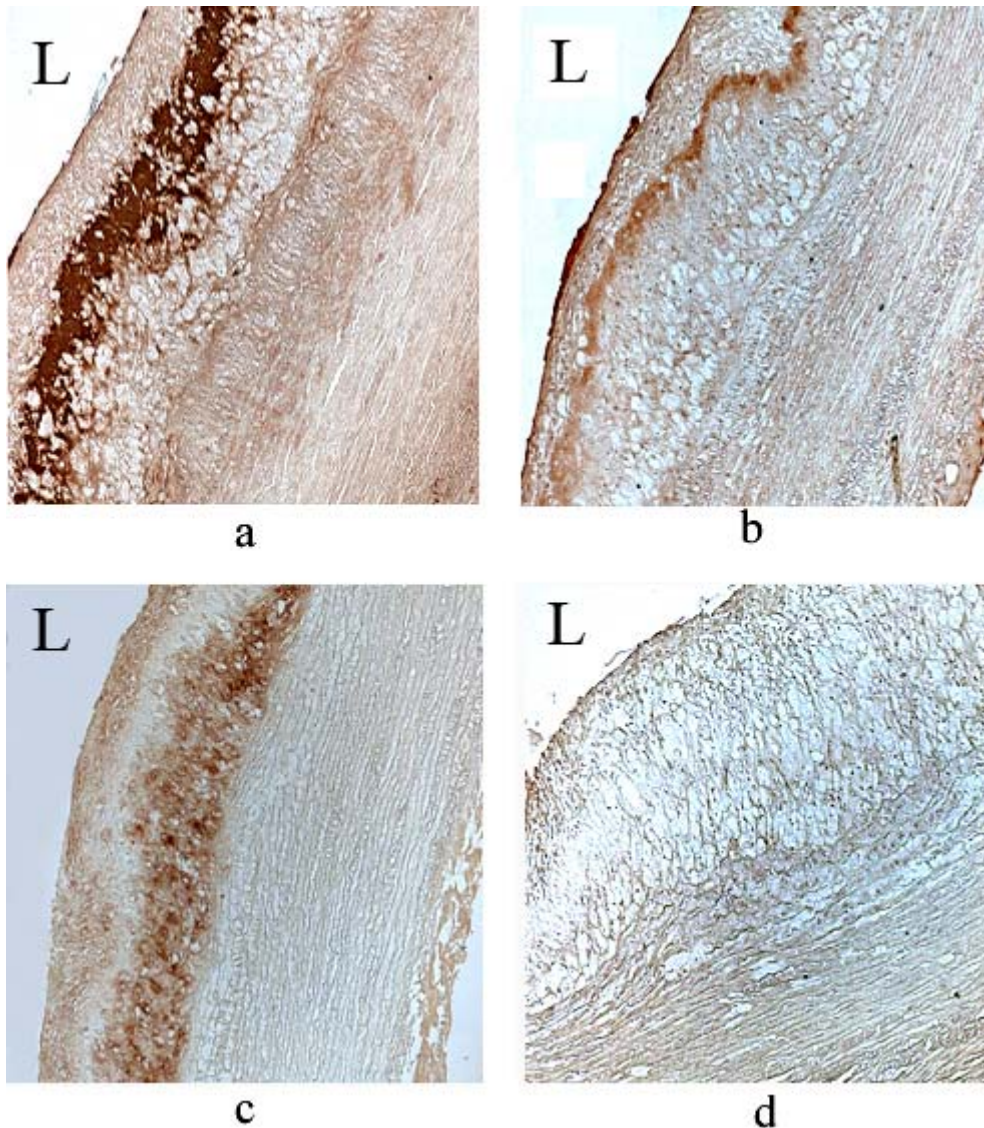
*Sezione trasversale della parete arteriosa di un coniglio sottoposto a dieta con 2% colesterolo.*

#### ***4.1.6 Rilevazione immunoistochimica di Apo A-I, Apo E e macrofagi nella parete arteriosa dell'arco aortico di coniglio***

L'arco aortico dei conigli, alimentati per 8 settimane con una dieta normale o arricchita in colesterolo al 2%, è stato prelevato e trattato, per ottenere preparati istologici, che sono stati sottoposti ad un'indagine di tipo immunoistochimico. Risultati tipici sono mostrati in fig. 18 in cui l'analisi della placca aterosclerotica mostra una evidente immunoreattività per Apo E (a), Apo A-I (b) e macrofagi (c) in tutte le lesioni dell'arco analizzate. Le sezioni successive dell'arco aortico dei conigli trattati mostrano tutte un diffuso ispessimento dell'intima ed in particolare: a) Apo E è diffusamente distribuita nello stroma intimale ed è presente anche nello stroma mediale al di sotto della lamina elastica interna; b) Apo A-I è ampiamente riconosciuta nello stroma intimale ma scarsamente nello stroma mediale; c) i macrofagi (rilevati mediante Ab anti-RAM 11, un antigene macrofagico



citoplasmatico) sono ampiamente distribuiti nello stroma intimale soprattutto a ridosso della lamina elastica interna; d) non si è riscontrata positività in sezioni adiacenti in cui TBS è stato utilizzato, in sostituzione degli anticorpi primari per Apo A-I, Apo E, e macrofagi.



**Fig. 18:** *Immunoistochimica di Apo E, Apo A-I e macrofagi nella parete arteriosa dell'arco aortico di conigli alimentati con dieta arricchita in colesterolo. Sezioni successive dell'arco aortico di conigli ipercolesterolemici mostrano un diffuso ispessimento dell'intima; a) Apo E è diffusamente distribuita nello stroma intimale ed è presente anche nello stroma mediale al di sotto della lamina elastica interna; b) Apo A-I è ampiamente riconosciuta nello stroma intimale ma scarsamente nello stroma mediale; c) i macrofagi (rilevati mediante Ab anti-RAM II, un antigene macrofagico citoplasmatico) sono ampiamente distribuiti nello stroma intimale a ridosso della lamina elastica interna; d) controllo della specificità di reazione. L indica il versante parietale che definisce il lume vasale.*

L'immunoistochimica eseguita su sezioni di arco aortico, prelevati da conigli alimentati con dieta normale, mostra solo tracce di marcatura per Apo A-I lungo la lamina elastica interna e all'interno dello strato medio, mentre nessuna colorazione risulta evidente per Apo E e macrofagi (dati non mostrati).

#### ***4.1.7 Commenti e considerazioni***

Il trasporto inverso del colesterolo gioca un ruolo critico nella prevenzione dell'aterogenesi (Johnson et al., 1991; Santamarina-Fojo et al., 2000) e l'enzima LCAT svolge un ruolo primario in questo processo. In particolare, in conigli transgenici per *hLCAT* (gene *LCAT* umano) si assiste ad una diminuzione delle lesioni aterosclerotiche (Hoeg et al., 1996; Taylor et al., 1997; Brousseau et al., 1997). Diversi studi (Ross, 1999; Libby et al., 2002; Fan and Watanabe, 2003) hanno dimostrato il ruolo dell'infiammazione nell'aterosclerosi e, in condizioni infiammatorie (Navab et al., 2004), LCAT può diventare non funzionale o diminuire. In questo lavoro di tesi, quando la quantità di LCAT è stata misurata, mediante la determinazione della sua attività nel plasma, essa è risultata più bassa nei conigli sottoposti a dieta aterogenica rispetto ai conigli controllo. Questa deplezione di LCAT è compatibile con alterazioni da stress ossidativo (che aumenta notevolmente durante l'infiammazione) e con una diminuzione della sua sintesi epatica, dal momento che malattie del fegato, associate a steatosi e fibrosi, sono state individuate nel coniglio sottoposto a dieta aterogenica (Kainuma et al., 2006; Wanless et al., 1996; Buysens et al., 1996; Gupta et al., 1976). Questa causa sembrerebbe essere confermata dalla marcata diminuzione, nel plasma di tali conigli, dell'aptoglobina, una proteina della fase acuta dell'infiammazione, che ha un'origine prevalentemente epatica. Questa diminuzione di LCAT potrebbe essere correlata alla elevata quantità di colesterolo (2%) presente nella dieta, dal momento che, in passato, è stato riportato un aumento (Murata et al., 1996; Roth et al., 1983) o un'invariabilità (Quinet et al., 1990; etc.) nei livelli di attività di LCAT in conigli alimentati, rispettivamente, con una dieta arricchita allo 0.5% o 1% colesterolo rispetto ai controlli. Eppure, dopo 4 e 8 settimane di trattamento, i livelli di C e CE, nelle HDL, sono stati trovati

marcatamente più alti nei conigli trattati che nei controlli: questo dato sembra, a prima vista, discrepante con quello di un minor livello di LCAT. In realtà, questi risultati suggeriscono che LCAT, sebbene presente a più bassi livelli nei conigli trattati, è sufficientemente stimolato per la sua attività di esterificazione. L'attività di LCAT dipende, infatti, oltre che dalla sua quantità, dalla concentrazione di substrato (C) disponibile e dalla presenza di proteine note per la sua stimolazione. LCAT è principalmente stimolato da Apo A-I (Glomset et al., 1966), ma anche da Apo E (Zorich et al., 1985), una proteina presente sulla superficie delle lipoproteine, incluse le HDL (Wilson et al., 1992; Fragoso and Skinner, 1996). In particolare, Apo E possiede il 18% (Zorich et al., 1985) o il 40% (Chen CH and Albers JJ; 1985) di efficienza rispetto ad Apo A-I nell'attivazione di LCAT. L'aumento di CE-HDL è associato con una diminuzione di Apo A-I e un aumento di Apo E nel plasma dei conigli trattati con colesterolo. I dati suggeriscono che l'aumento dei livelli di Apo E potrebbero essere finalizzati a compensare la diminuzione di Apo A-I nella stimolazione di LCAT: ciò sembrerebbe essere confermato dalla correlazione negativa tra Apo A-I ed Apo E, riscontrata nel plasma dei conigli ipercolesterolemici. L'aumento di sintesi di CE, quindi, non dipende evidentemente da Apo A-I, la cui diminuzione, inoltre, risulta solo parzialmente compensata, in termini di stimolazione sull'attività di LCAT, dall'aumento di Apo E rilevato nel plasma. Questa ipotesi sembrerebbe essere confermata dall'uso di liposomi, contenenti differenti rapporti molarli Apo A-I/Apo E, per stimolare l'attività di LCAT in vitro. Infatti, l'attività di LCAT si riduce col diminuire del rapporto di Apo A-I con Apo E, ed i liposomi contenenti solo Apo E hanno mostrato un'efficienza di circa il 50% rispetto a quelli contenenti solo Apo A-I nell'attivazione di LCAT. Quindi, il doppio della concentrazione molare di Apo E rispetto ad Apo A-I può stimolare allo stesso modo l'attività di LCAT. Tuttavia, Apo E aumenta "solo" di circa 1.2 volte di quanto Apo A-I diminuisce, per cui l'aumento di Apo E può compensare solo parzialmente la diminuzione di LCAT.

Anche la forte riduzione di Hpt plasmatica potrebbe favorire una maggiore attività di LCAT. Dalla letteratura è noto, infatti, che Hpt legando Apo A-I interferisce nella stimolazione di LCAT: la sua diminuzione potrebbe, quindi, favorire la stimolazione di Apo A-I su LCAT (Spagnuolo et al., 2005) nei conigli ipercolesterolemici in quanto, considerando la forte riduzione di Hpt, una maggiore quota di Apo A-I sarebbe libera di stimolare l'enzima.

Anche la diminuzione di Apo A-I, che si verifica gradualmente durante la dieta al 2% colesterolo, potrebbe essere correlata ad alterazioni metaboliche dei suoi principali organi di sintesi (fegato e reni).

Apo E è prodotta principalmente dal fegato, ma il 20-40% del totale deriva da fonti extraepatiche come cervello, milza, polmone, ovaio, rene e muscoli (Elshour Bagy et al., 1985; Greenow et al., 2005). Inoltre, Apo E è secreta dai macrofagi, e la sua secrezione aumenta in risposta all'accumulo di colesterolo da parte di queste cellule (Basu et al., 1982; Mazzone et al., 1989) ed in presenza di Apo A-I, HDL (Bielicki et al., 1999) o ox-LDL (Cader et al., 1997). La concentrazione plasmatica di Apo E, quindi, potrebbe non essere influenzata significativamente dalle alterazioni metaboliche epatiche. Il suo aumento, al contrario, potrebbe derivare dalla capacità del colesterolo di indurre nei macrofagi anche un marcato aumento della trascrizione del gene per Apo E (Greenow et al., 2005; Duan et al., 2000). Sia Apo A-I che Apo E giocano un ruolo importante nell'omeostasi del colesterolo nei macrofagi mediante la formazione di nuove HDL e promuovendo l'efflusso di colesterolo (Forte et al., 1995; Mazzone et al., 1994): esperimenti con macrofagi umani, macrofagi peritoneali di topo o con la linea cellulare macrofagica THP-1 (Lin et al., 1999), hanno dimostrato che la maggioranza delle HDL "nascenti" (con diametro di 11, 9 o 7.4 nm) possiedono solo Apo A-I, ma un numero di particelle di dimensioni più grandi (13-20 nm) possiedono Apo A-I più Apo E (13-16 nm) e una più piccola quantità di lipoproteine ancora più grandi (19-20 nm) possiede solo Apo E: la proporzione di queste ultime particelle aumenta in risposta ad un carico di colesterolo nei macrofagi, dopo che questi sono stati caricati con colesterolo (Bielicki et al., 1999).

L'analisi immunoistochimica per Apo E, Apo A-I e macrofagi sembra suggerire che l'aumento di Apo E, nel plasma dei conigli alimentati con la dieta arricchita in colesterolo, possa derivare da una sua maggiore sintesi e secrezione da parte dei macrofagi; inoltre, la presenza di Apo A-I nella parete arteriosa è compatibile con il ruolo che tale apolipoproteina ha nella secrezione di Apo E da parte dei macrofagi. Infine, l'aumento della quantità di Apo E, rilevato nello stroma intinale della parete arteriosa dei conigli sottoposti a dieta arricchita in colesterolo, è in accordo con la formazione di un maggior numero di particelle di HDL con Apo E (soltanto o in associazione con Apo A-I). In effetti, l'aumento di Apo E coinvolge esclusivamente le HDL, sebbene sia stato riportato (Chiesa et al., 2001) un aumento nella concentrazione di LDL (di circa 14 volte) nettamente superiore a quello delle HDL (di circa 4 volte) nei conigli ipercolesterolemici. Questi dati suggeriscono che l'aumento di Apo E circolante potrebbe essere coinvolto direttamente nell'attivazione di LCAT e nella stimolazione del RCT, piuttosto che nel recupero epatico delle particelle lipoproteiche. A sostegno di questa ipotesi è il fatto che nel plasma dei cani, in seguito ad una dieta ricca in colesterolo, è stata riportata (Gordon et al., 1983) la presenza di grandi HDL arricchite in CE, aumentate in dimensioni e senza Apo A-I; queste HDL (18 nm di diametro), riportate come HDL<sub>c</sub> (la "c" indica la loro formazione in seguito a dieta con colesterolo), contengono più del 50% di colesterolo, nessuna Apo A-I, e quasi esclusivamente Apo E. Queste HDL sono state trovate, successivamente, sia nel plasma dell'uomo (Wilson et al., 1992) che in quello del coniglio (Fragoso et al., 1996), in seguito a dieta supplementata in colesterolo. La separazione delle HDL in lipoproteine "Apo E-povere" e nelle diverse frazioni contenenti Apo E, mediante cromatografia di affinità con eparina-sefariosio (Weisgraber KH and Mahley RW; 1980; Wilson et al., 1992), conferma la formazione e l'accumulo di HDL "Apo E-ricche" nel plasma dei conigli in risposta alla dieta con colesterolo. Tuttavia, i dati indicano che, tra le due frazioni contenenti Apo E, solo una è effettivamente "Apo E-ricca", poiché l'altra frazione ha Apo A-I come apolipoproteina maggioritaria e solo tracce di Apo E. In queste due frazioni di

HDL “Apo E-ricche” dei conigli ipercolesterolemici, il rapporto Apo A-I/Apo E, determinato mediante ELISA ed analisi densitometrica del tracciato elettroforetico delle due proteine, diventa di 3 e 0.25 rispettivamente. Inoltre, in confronto alle HDL “Apo E-povere”, le HDL “Apo E-ricche” possiedono un contenuto significativamente più alto di esteri del colesterolo e colesterolo. Questi dati sono in accordo con la proprietà di Apo E di incrementare la dimensione ed il contenuto di CE delle HDL (Matsuura et al., 2006; Mahley et al., 2006) e suggeriscono che Apo E può essere direttamente coinvolta nell’esterificazione di C in CE nelle HDL.

#### ***4.2 Premessa allo studio del RCT nei topi: pianificazione dell’esperimento***

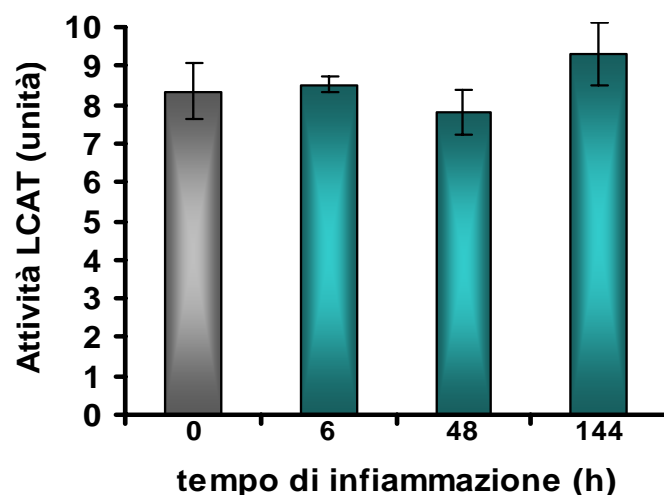
La somministrazione di carragenina causa un processo infiammatorio acuto nel topo, caratterizzato dall’aumento della permeabilità vascolare e da infiltrazioni cellulari che inducono la formazione di un edema, derivante dalla fuoriuscita di liquido ricco di proteine e dall’accumulo di cellule leucocitarie che affollano il sito d’inflammazione; pertanto essa è molto utilizzata per determinare l’attività antinfiammatoria in questi mammiferi (Di Rosa et al., 1971 a, b; 1972, Garcia Leme et al., 1973). La carragenina causa nei topi una risposta infiammatoria di tipo bifasica: una prima risposta infiammatoria (fase precoce), che termina dopo 6 h ed una seconda risposta (fase tardiva), che ha un picco tra 48 e 72 h e declina a 96 h (Henriques et al., 1987). Solo topi di 7-8 settimane e con peso compreso tra 32-34 g mostrano una consistente risposta in entrambe le fasi (Posadas et al., 2004).

Lo studio è stato condotto su 45 topi maschi (CD-1) di peso compreso tra i 32-34 g. Essi sono stati suddivisi in 9 gruppi di 5 topi ciascuno. Un gruppo non è stato sottoposto a nessun trattamento (gruppo controllo); gli altri sono stati sottoposti ad iniezione di 50 µl di 1% carragenina in soluzione fisiologica, e sacrificati a tempi diversi (2, 4, 6, 24, 48, 72, 96 e 144 ore). L’iniezione della carragenina è stata effettuata nella porzione subplantare della zampa posteriore. Il trattamento è durato complessivamente 6 giorni; a tempi diversi dalla somministrazione della carragenina, i topi sono stati sacrificati con l’utilizzo di diossido di carbonio. Prima del sacrificio

sono stati effettuati prelievi ematici mediante puntura cardiaca. Sui campioni ematici sono state eseguite analisi per osservare le variazioni plasmatiche dei seguenti parametri: l'attività dell'enzima LCAT, la concentrazione del colesterolo libero (C) e di quello totale (CT) nelle HDL, il rapporto tra gli esteri del colesterolo (CE) ed il colesterolo libero nelle HDL (CE/C), la concentrazione di Apo A-I, Apo E e quella di Hpt.

#### 4.2.1 Attività di LCAT nel plasma dei topi.

La misurazione dell'attività *in vitro* dell'enzima LCAT presente nel plasma dei topi, sottoposti alla somministrazione di carragenina ed in quelli controllo, è stata effettuata tramite saggio enzimatico (come descritto in Metodi), sviluppato in eccesso di substrato (proteoliposoma). Il plasma, prima di essere utilizzato per il saggio, è stato deprivato delle LDL e VLDL. Dopo aver portato a termine la procedura del saggio, i valori ottenuti della misura dell'attività dell'enzima sono stati riportati in grafico, in funzione della durata dell'infiammazione. Il controllo è dato dalla misura di LCAT nel plasma dei topi non infiammati.



**Fig. 19: Misura dell'attività di LCAT.** L'attività di LCAT è stata misurata, tramite saggio enzimatico *in vitro*, nel plasma dei topi controllo (barra grigia) ed in quello dei topi infiammati (barra verde) per tre diversi tempi (6, 48 e 144 ore). In grafico è stata riportata l'attività dell'enzima (espressa in nmoli di CE/h/mL) in funzione del tempo di infiammazione (espresso in ore). I valori si riferiscono alla media ( $N=5$ )  $\pm$  DS.

Come si osserva dalla Fig. 19, non c'è una differenza significativa nella quantità di LCAT presente nei topi controllo ed in quelli infiammati per 3 diversi tempi (6 h:  $8.5 \pm 0,5$  vs  $8,35 \pm 0,7$  U nei controlli; 48 h:  $7,8 \pm 0,3$  vs  $8,35 \pm 0,7$  U nei controlli; 144 h:  $8,3 \pm 0,7$  vs  $8,35 \pm 0,7$  U nei controlli ). I valori dell'attività dell'enzima sono espressi in nmoli di CE/h/ml di plasma.

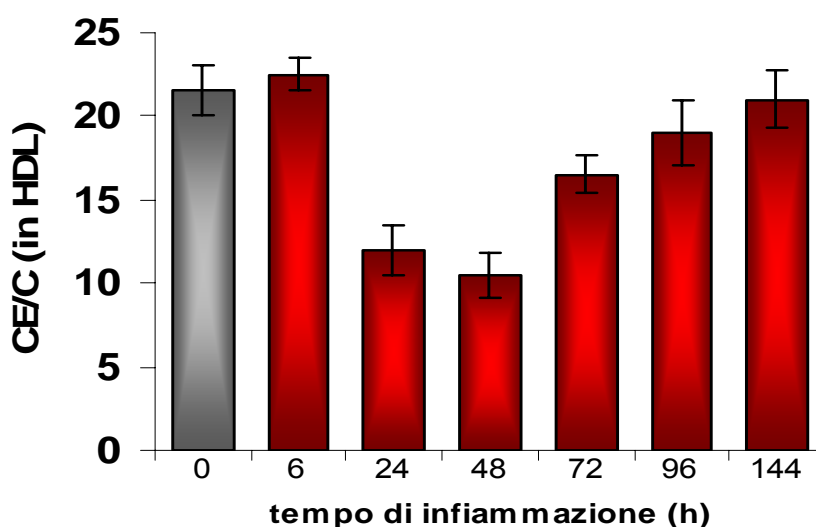
#### **4.2.2 Determinazione del rapporto CE/C nelle HDL**

Un'aliquota di plasma, proveniente da ciascun topo, è stata sottoposta ad un procedimento per isolare la frazione delle HDL dalle altre lipoproteine (come riportato in Metodi). Le HDL native sono state divise in due aliquote: una è stata trattata con KOH, per idrolizzare gli esteri, mentre l'altra non è stata alcalinizzata. Entrambe le aliquote sono, in seguito, state trattate per l'estrazione di lipidi che, infine, sono stati analizzati mediante HPLC per misurare la quantità di colesterolo totale (CT) e la quantità di colesterolo non esterificato (C). La quantità di esteri del colesterolo (CE) è stata calcolata dalla differenza fra il CT, misurato nella quota alcalinizzata, ed il C, misurato nell'aliquota non trattata.

Il rapporto CE/CF nelle HDL riflette l'entità dell'esterificazione del colesterolo *in vivo* ad opera dell'enzima LCAT; perciò esso è stato valutato per evidenziare eventuali correlazioni con l'attività enzimatica riscontrata *in vitro*.

Come si osserva dal grafico (Fig. 20), il rapporto CE/C diminuisce significativamente durante la fase tardiva dell'infiammazione dopo 24 h ( $12 \pm 1.5$  vs  $21.5 \pm 1.5$  nei controlli,  $P < 0,01$ ) e 48 h ( $10.5 \pm 1,3$  vs  $21.5 \pm 1.5$  nei controlli,  $P < 0,01$ ). Durante le ore successive (72, 96 e 144 h) c'è un graduale e significativo recupero del valore di controllo. Questo dato è in disaccordo con quanto riportato precedentemente sull'attività *in vitro* dell'enzima LCAT: infatti, ad una diminuzione dell'attività *in vivo* non corrisponde una diminuzione *in vitro*. Tuttavia, è noto dalla letteratura (Cigliano et al. 2004) che fattori plasmatici possono alterare il corretto funzionamento dell'enzima *in vivo*.



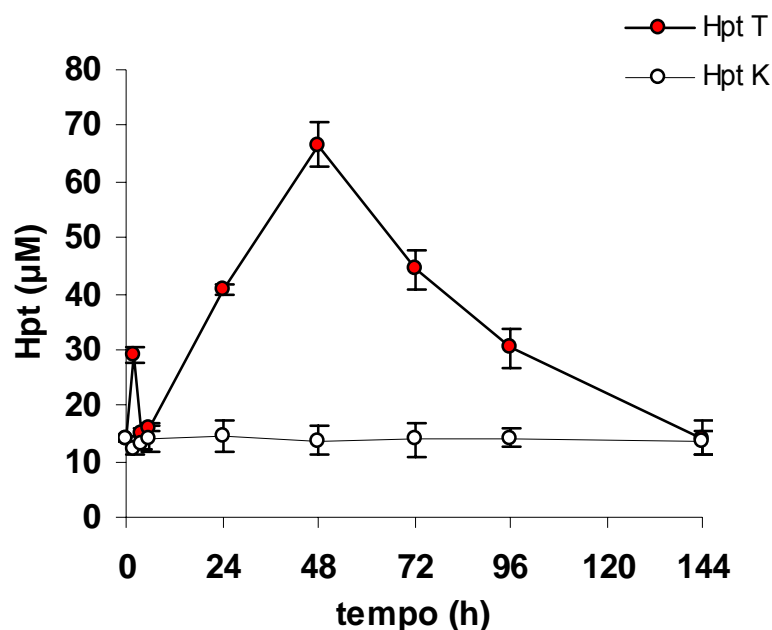


**Fig. 20: Determinazione del rapporto molare CE/C.** Aliquote di plasma (precedentemente deprivato di VLDL e LDL) sono state utilizzate come tali, per misurare il contenuto di colesterolo libero (C) delle HDL o in seguito ad idrolisi basica, per misurare il contenuto di colesterolo totale (C+CE). Dalla differenza fra questi valori si ottiene la quantità di esteri del colesterolo nell'estratto di HDL (CE). E' stato infine determinato il rapporto CE/C che riflette l'entità di esterificazione del C in vivo ad opera di LCAT. Nel grafico la barra grigia indica il valore di CE/C nei topi controllo (non infiammati) mentre le barre rosse indicano il valore di CE/C a vari tempi di infiammazione. I risultati sono stati espressi come media (N=5 per gruppo)  $\pm$  DS.

#### 4.2.3 Effetti della carragenina sulla concentrazione di Hpt

Recenti evidenze (Ross, 1999) supportano l'esistenza di un ruolo centrale dell'infiammazione in tutte le fasi del processo aterosclerotico. Difatti, studi clinici riconoscono una correlazione tra i marker dell'infiammazione, in circolo, e la propensione a sviluppare eventi cardiovascolari. In particolare Hpt, una proteina della fase acuta dell'infiammazione, sembra indirettamente implicata nel RCT, poiché inibisce, in vitro, la stimolazione di Apo A-I sull'attività di LCAT (Spagnuolo et al., 2004). Per tali motivi è stata determinata la sua concentrazione nel plasma dei topi oggetto dello studio. L'andamento di tale proteina segue la risposta bifasica tipica dell'infiammazione da carragenina (Fig. 21). Durante la fase precoce dell'infiammazione (fino a 6 h), si assiste ad un primo e significativo aumento del livello di Hpt già dopo 2 h dall'iniezione ( $29,1 \pm 1.5$  vs  $14,1 \pm 0.5$   $\mu$ M nei controlli,

P<0,01), mentre nelle ore successive (4 h e 6 h) si ha un ritorno del livello a valori normali. Nella fase tardiva dell'inflammazione (dopo 24 h dall'iniezione di carragenina), il livello di Hpt risulta nuovamente e significativamente aumentato di circa 2,8 volte dopo 24 h ( $40.8 \pm 0.8$  vs  $14,5 \pm 2.7$   $\mu$ M nei controlli, P<0,01) e presenta un incremento massimo dopo 48 h ( $66,6 \pm 4$  vs  $13.8 \pm 2.8$   $\mu$ M nei controlli, P<0,01). Nelle ore successive (72 e 96) si assiste ad una lenta e progressiva diminuzione del livello di Hpt, anche se il ritorno a valori normali si ottiene solo dopo 144 h dall'iniezione della carragenina ( $14.2 \pm 3$  vs  $13.4 \pm 2.1$   $\mu$ M nei controlli).

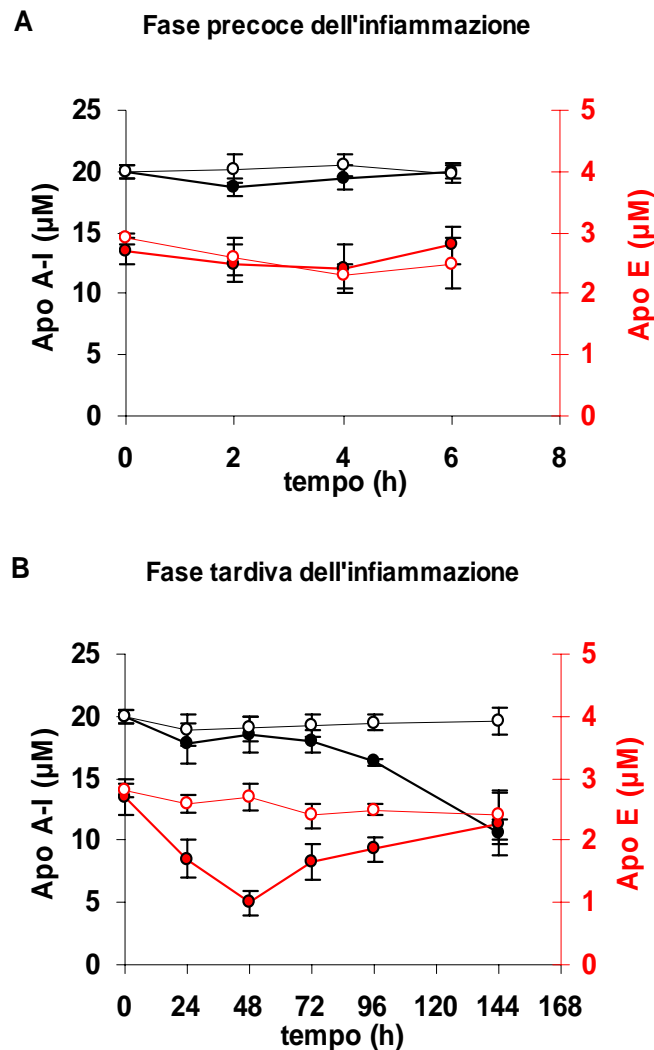


**Fig. 21: Valutazione quantitativa di Hpt nel tempo.** La concentrazione di Hpt è stata misurata nel plasma di topi controllo (cerchi bianchi) o infiammati con carragenina (cerchi rossi), a diversi tempi di infiammazione, mediante procedura ELISA. La concentrazione di Hpt è espressa in  $\mu$ M. I risultati sono stati espressi come media ( $N=5$  per gruppo)  $\pm$  DS.

#### 4.2.4 Titolazione di Apo A-I ed Apo E nel plasma dei topi

Precedenti studi hanno dimostrato che, durante l'inflammazione acuta, avviene un rimodellamento delle lipoproteine con un cambio nella composizione delle apolipoproteine che formano le HDL dei topi (Lindhorst et al., 1997; Cabana et al., 1996). Per verificare tale ipotesi, è stato valutato il valore di Apo A-I e di Apo E nel plasma dei topi trattati con 1% carragenina e nei topi controllo. Nel gruppo dei topi trattati, la concentrazione di Apo A-I non cambia significativamente durante la fase

precoce dell'inflammation (fig. 22; pannello A). Nella fase tardiva (fig. 22; pannello B), al contrario, si assiste ad una lenta diminuzione di Apo A-I, che diviene significativa solo dopo 96 e 144 ore (96 h:  $16,3 \pm 0,3$  vs  $19,5 \pm 0,7$   $\mu\text{M}$  nei controlli,  $P < 0,01$ ; 144 h:  $10,7 \pm 1$  vs  $19,6 \pm 1$   $\mu\text{M}$  nei controlli,  $P < 0,01$ ).



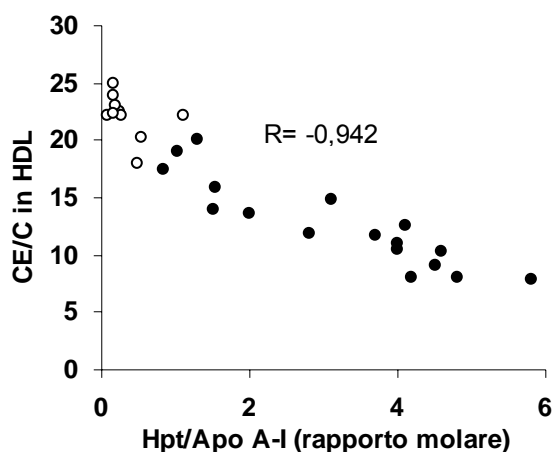
**Fig 22: Valutazione quantitativa di Apo A-I ed Apo E in topi infiammati con carragenina.** I livelli di Apo A-I nei topi trattati (cerchi neri), con i relativi controlli (topi normali: cerchi neri vuoti) e di Apo E nei topi trattati (cerchi rossi), con i relativi controlli (cerchi rossi vuoti), sono stati titolati mediante ELISA nel plasma prelevato a tempi diversi (espresso in ore) dopo la somministrazione di carragenina. Nel grafico sono mostrate le concentrazioni delle due apolipoproteine (esprese in  $\mu\text{M}$ ) relative alla fase precoce (pannello A) ed a quella tardiva (pannello B) del processo infiammatorio. I risultati sono stati espressi come media ( $N=5$  per gruppo)  $\pm$  DS.

Durante la prima fase dell'inflammation, Apo E (Fig. 22; pannello A) segue lo stesso andamento di Apo A-I in quanto non si rilevano variazioni significative della sua concentrazione fino a 6 h ( $2,8 \pm 0,3$  vs  $2,5 \pm 0,4$   $\mu\text{M}$  nei controlli). Tuttavia nella

fase tardiva (fig. 22; pannello B), l'andamento del livello di Apo E si discosta da quello di Apo A-I. In particolare, si assiste ad una netta e significativa diminuzione del livello di Apo E dopo 24 h ( $1,7 \pm 0,3$  vs  $2,6 \pm 0,15$   $\mu\text{M}$  nei controlli,  $P < 0,01$ ) e 48 h dall'iniezione di carragenina ( $1 \pm 0,2$  vs  $2,7 \pm 0,2$   $\mu\text{M}$  nei controlli,  $P < 0,01$ ); tale differenza si mantiene significativa anche dopo 72 h ( $1,66 \pm 0,3$  vs  $2,4 \pm 0,2$   $\mu\text{M}$  nei controlli,  $P < 0,01$ ) e 96 h ( $1,86 \pm 0,2$  vs  $2,5 \pm 0,1$   $\mu\text{M}$  nei controlli,  $P < 0,01$ ) ed il ripristino dei valori normali si osserva solo dopo 144 h ( $2,26 \pm 0,5$  vs  $2,4 \pm 0,4$   $\mu\text{M}$  nei controlli).

#### 4.2.5 Correlazione tra Hpt/Apo A-I ed esterificazione del colesterolo

E' noto che Hpt si lega ad Apo A-I, il principale attivatore di LCAT, inibendo l'attività dell'enzima (Cigliano et al., 2005). Dopo aver misurato i livelli plasmatici di Apo A-I e di Hpt, sia nei topi infiammati che in quelli controllo, è stato calcolato il loro rapporto molare. Tale rapporto è stato trovato negativamente correlato ( $R = -0,942$ ) con la diminuzione dell'attività in vivo di LCAT (Fig. 23). Questi dati sembrano confermare il ruolo inibitorio che Hpt svolge legandosi ad Apo A-I, uno dei principali fattori coinvolti nel RCT.

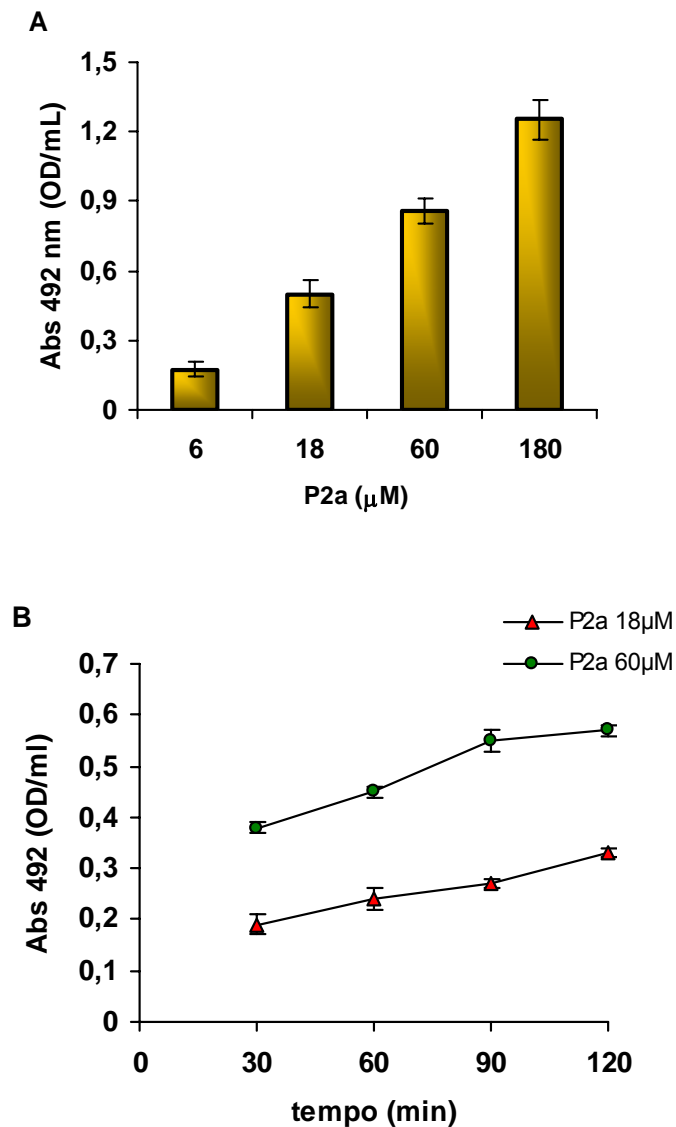


**Fig. 23: Correlazione tra il rapporto molare di Hpt ed Apo A-I ed il rapporto degli esteri del colesterolo con il colesterolo libero.** Campioni di plasma provenienti da topi controllo ( $N=12$ ) e da topi infiammati ( $N=17$ ) sono stati usati per la determinazione dei livelli plasmatici di Hpt ed Apo A-I ( $\mu\text{M}$ ) e di CE e C nelle HDL (mM). I rapporti molari Hpt/Apo A-I e CE/C sono stati calcolati da triplicati e duplicati rispettivamente: deviazioni superiori al 5% dalla media non sono state trovate. I valori medi Hpt/Apo A-I di ciascun topo sono stati riportati verso i valori omologhi medi di CE/C ( $r = -0.942$ ;  $P < 0.01$ ).

#### ***4.2.6 Legame del peptide P2a sulle HDL***

Diversi studi (Spagnuolo et al., 2005) sono stati condotti, in passato, per determinare la sequenza amminoacidica di Apo A-I coinvolta nell'interazione con Hpt. In particolare, prima l'analisi della frammentazione di Apo A-I con bromuro di cianogeno ed idrossilammina ed, in seguito, l'utilizzo di brevi peptidi biotinilati o acetilati hanno consentito di definire la sequenza amminoacidica 141-164 di ApoA-I come il dominio di interazione con Hpt (Spagnuolo et al., 2005). Un peptide sintetico con questa sequenza amminoacidica è stato denominato P2a. Successivi esperimenti basati su saggi enzimatici in vitro hanno consentito di rilevare la capacità di P2a nel contrastare l'inibizione dell'attività di LCAT, provocata da Hpt (Spagnuolo et al., 2005). In effetti tale peptide, in vitro, compete con Apo A-I per il legame ad Hpt e ciò permette il ripristino di un'efficiente attività di LCAT. Il peptide P2a presenta una sequenza omologa al dominio di Apo A-I che stabilisce interazioni con Hpt. Essendo P2a un frammento di Apo A-I, è stata provata la sua capacità di interagire con le HDL. La metodica utilizzata a tale scopo è quella dell'ELISA, con la fase di *coating* mediante HDL (come riportato in Metodi). Per la fase di legame, sono stati immesse nei pozzetti concentrazioni crescenti (6, 18, 60 e 180  $\mu\text{M}$ ) di peptide preventivamente biotinilato. Dopo la fase di legame, i peptidi, che hanno interagito con le HDL, sono stati rilevati tramite l'uso di avidina-HRP. La misura spettrofotometrica dell'assorbanza a 492 nm ha permesso di determinare indirettamente la quantità di antigene presente nel pozzetto. Dalla figura 24 (pannello A) è possibile notare come la capacità di legame del P2a alle HDL sia significativamente proporzionale alla quantità del peptide utilizzata. Inoltre, è stata indagata la proprietà del peptide di interagire con le HDL nel tempo (Fig. 24; Pannello B). In particolare, sono stati effettuati esperimenti di legame, in cui due diverse concentrazioni di peptide (18 e 60  $\mu\text{M}$ ) hanno potuto interagire per tempi diversi (30, 60, 90 e 120 min) con le HDL. Il grafico della figura mostra non solo che la capacità legante del peptide alle HDL è direttamente proporzionale alla quantità di

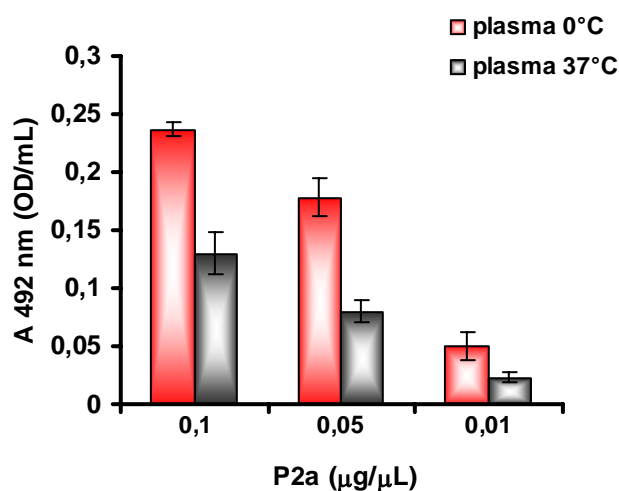
peptide usato, ma anche che dopo 90 min persiste la velocità della reazione di legame con le HDL.



**Fig. 24: Legame del peptide P2a alle HDL.** La capacità legante del peptide P2a alle HDL è stata saggiata mediante ELISA. Sono mostrate diverse concentrazioni di P2a (barre gialle) nell'interazione con le HDL (pannello A). Inoltre è mostrata la variazione del legame di P2a alle HDL in funzione del tempo di incubazione per due diverse concentrazioni 18  $\mu\text{M}$  (triangoli rossi) e 60  $\mu\text{M}$  (cerchi verdi)(pannello B). In entrambi gli esperimenti è stata utilizzata avidina, coniugata con la perossidasi, per la rilevazione. Le DS vengono espresse dalle barre d'errore.

#### 4.2.7 Stabilità del peptide P2a nel plasma dei topi infiammati

Una prova preliminare alla somministrazione del peptide P2a in vivo è consistita nel determinare la sua stabilità nel plasma dei topi infiammati; ciò per saggiare la sua resistenza alla degradazione da proteasi. La prova è stata effettuata considerando la diluizione che subisce il peptide P2a in seguito alla sua somministrazione in vivo (circa 15 volte). Sono state utilizzate 3 diverse concentrazioni di peptide P2a: 0,1; 0,05 e 0,01  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . L'esperimento è stato condotto su un pool di plasma proveniente da topi infiammati, dopo 48 h dalla somministrazione di carragenina. Il grafico (Fig. 25) mostra la stabilità del peptide P2a a 3 diverse concentrazioni plasmatiche, dopo 30 minuti d'incubazione. Il controllo è dato dalla stabilità del peptide P2a nel plasma posto a 0°C (blocco dell'attività proteolitica), mentre gli effetti dell'attività plasmatica delle proteasi sul peptide P2a sono stati determinati a 37°C. Alle 3 diverse concentrazioni utilizzate la quantità di peptide P2a risulta dimezzata dopo 30 min.



**Fig. 25: Stabilità del peptide P2a nel plasma dei topi infiammati.** La stabilità del peptide P2a è stata saggiata in un pool di plasma, ottenuto da topi infiammati per 24 e 48 h, mediante tecnica ELISA. Il peptide è stato utilizzato a tre diverse concentrazioni (0.1, 0.05, 0.01  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) in aliquote di plasma incubate a 37°C (barre grigie); il controllo è rappresentato dalla stessa prova eseguita incubando il plasma a 0°C (barre rosse). In grafico sono stati riportati i valori medi  $\pm$  DS.

Questo esperimento fornisce utili indicazioni sulla quantità di peptide P2a, in termini di numero e sequenza di somministrazione, da utilizzare in vivo per spiazzare Hpt da Apo A-I e ripristinare la normale esterificazione del colesterolo nei topi infiammati.

#### 4.2.8 *Commenti e considerazioni*

Nei topi, in seguito alla somministrazione di carragenina 1%, non è stata evidenziata una significativa diminuzione dell'attività *in vitro* di LCAT rispetto ai controlli sia nella fase precoce che in quella tardiva dell'infiammazione. Al contrario, l'attività enzimatica *in vivo*, correlata al rapporto CE/C nelle HDL (Subbaiah et al., 1997; Sorci-Thomas and Thomas, 2002), è stata trovata più bassa nei topi infiammati rispetto a quelli controllo nella prima parte (24 e 48 h) della fase tardiva dell'infiammazione. L'attività di LCAT, quindi, risulta *in vivo* finemente regolata. Nei topi infiammati con carragenina è stata riscontrata un'alterazione nella composizione delle apolipoproteine delle HDL, tuttavia la diminuzione di Apo A-I è meno marcata e si osserva solo nelle ultime fasi dell'infiammazione dopo 96 e 144 ore ed Apo E, al contrario di ciò che si è rilevato per i conigli, è poco concentrata rispetto ad Apo A-I e diminuisce ulteriormente durante la seconda fase dell'infiammazione (48-72 h) per poi ritornare ai valori fisiologici dopo 144 h. La diminuzione del CE/C, quindi, non può derivare da una minore presenza di Apo A-I nel plasma dei topi, dato che la sua diminuzione è molto lenta ed è significativa solo nella parte finale della fase tardiva dell'infiammazione né tantomeno dalla diminuzione di Apo E, dato che questa apolipoproteina è normalmente presente in basse concentrazioni ed capace di stimolare LCAT solo del 40% (Chen CH and Albers JJ; 1985) rispetto ad Apo A-I. L'aumento significativo di Hpt rilevato nel plasma dei topi infiammati e, soprattutto la correlazione negativa tra il rapporto di Hpt/Apo A-I ed il rapporto CE/C nelle HDL, suggerisce che Hpt potrebbe essere coinvolta nell' inibizione dell'esterificazione del colesterolo nel plasma dei topi infiammati, limitando la quantità di Apo A-I necessaria all'effettiva stimolazione di LCAT ed essere quindi la causa della diminuzione del rapporto CE/C nelle HDL.

Il ruolo dell'infiammazione nella genesi dell'aterosclerosi è stato dimostrato da diversi Autori (Ross, 1999; Libby et al., 2002; Fan and Watanabe, 2003). Studi passati (Cigliano et al., 2005; Sadrzadeh and Bozorgmehr, 2004) hanno suggerito, infatti, che



alcuni fattori, associati con l'inflammatione, potrebbero alterare il trasporto inverso del colesterolo attraverso l'inibizione di LCAT, l'enzima che svolge un ruolo primario in tale processo (Johnson et al., 1991; Santamarina-Fojo et al., 2000).

In particolare è stato dimostrato che Hpt, nella fase acuta dell'inflammatione, potrebbe influenzare l'attività di LCAT legandosi ad Apo A-I presente sulle HDL (Rademacher et al., 1987; Porta et al., 1999; Balestrieri et al., 2001): in condizioni fisiologiche standard (o normali) i livelli di Hpt sono bassi ed il complesso formato da Hpt ed Apo A-I potrebbe dissociarsi rendendo possibile la stimolazione di LCAT da parte di Apo A-I; al contrario in condizioni di eccesso di Hpt il complesso sarebbe più stabile e ciò interferirebbe con l'attività di Apo A-I su LCAT, per cui solo aumentati livelli di Hpt potrebbero severamente rallentare la rimozione del colesterolo in eccesso dall'endotelio vascolare. L'associazione di Hpt con patologie cardiovascolari è stata precedentemente dimostrata (Chapelle et al., 1982; Delanghe et al., 1997).

Diversi studi (Spagnuolo et al., 2005) sono stati condotti per determinare la sequenza amminoacidica di Apo A-I coinvolta nell'interazione con Hpt. In particolare, prima la frammentazione di Apo A-I con bromuro di cianogeno ed idrossilamina ed in seguito l'utilizzo di brevi peptidi biotinilati o acetilati hanno consentito di definire la sequenza amminoacidica 141-164 di ApoA-I come il dominio di interazione con Hpt. Un peptide sintetico con questa sequenza è stato denominato P2a. Successivi esperimenti basati su saggi enzimatici hanno consentito di rilevare la capacità di P2a nel contrastare l'inibizione dell'attività di LCAT, provocata da Hpt. In effetti tale peptide, *in vitro*, compete con Apo A-I per il legame ad Hpt e ciò permette un'efficiente attività di LCAT nel saggio enzimatico. Inoltre, P2a non interferisce con il ruolo fisiologico di Hpt, permettendo ad essa di legare, contemporaneamente Hb libera.

Questo peptide sintetico, competendo con Apo A-I per il legame ad Hpt, potrebbe essere usato per prevenire i rischi di malattie cardiovascolari inflammatione-

dipendente o, più genericamente nelle terapie di patologia associate con una alterata funzionalità di LCAT.

Il peptide P2a presenta una sequenza omologa al dominio di Apo AI che stabilisce interazioni con Hpt è ciò spiega la sua capacità di conservare la proprietà di legame con le HDL.

Gli esperimenti condotti per verificare le alterazioni a carico del RCT nei topi infiammati con carragenina, hanno consentito di individuare in tale modello animale le caratteristiche (aumento di Hpt, diminuzione di CE/C, stabilità di LCAT ed Apo A-I) per saggiare *in vivo* la capacità di P2a di ripristinare un normale RCT. Questo modello animale è stato utilizzato anche in passato (Cabana et al., 1996; Lindhorst et al., 1997; Posadas et al.; 2004) per saggiare nuovi farmaci con proprietà anti-infiammatorie e per comprendere i meccanismi coinvolti nell'infiammazione.

Il rapporto CE/C dovrà essere utilizzato, quindi, per monitorare l'azione del peptide P2a in topi infiammati. Infatti tale rapporto rappresenta una misura indiretta dell'attività *in vivo* di LCAT. Ci si aspetta che l'utilizzo di dosi crescenti di P2a nei topi infiammati causi un ripristino del CE/C. Il ripristino del rapporto potrà essere considerata una prova indiretta dell'azione *in vivo* del peptide P2a nel legare l'Hpt in eccesso e nel favorire l'azione di Apo A-I su LCAT. Questo esperimento è in corso di attuazione.

I risultati ottenuti in questo progetto di ricerca possono stimolare lo sviluppo di tale peptide al fine di ottenere un prodotto che possa essere alla base di nuove terapie antinfiammatorie.

## 5. CONCLUSIONI

Studi di grande importanza hanno confermato che LCAT rappresenta un **enzima dalle spiccate proprietà antiaterogeniche**. Infatti, conigli transgenici, in cui è stata indotta una superespressione di LCAT e che sono stati sottoposti ad una dieta ricca di colesterolo, hanno mostrato, rispetto ai controlli, un aumento significativo nelle concentrazioni plasmatiche di ApoA1 e di colesterolo-HDL: questo profilo lipoproteico è associato ad una diminuzione significativa delle lipoproteine cosiddette “aterogeniche” (VLDL e LDL) (Hoeg et al., JBC 1996). Inoltre, la superespressione di LCAT ha portato, in tali conigli, ad una riduzione dell’aterosclerosi, poiché l’analisi dell’aorta ha rivelato che essi avevano una riduzione dell’86% della dimensione della lesione aterosclerotica rispetto ai controlli. Questi risultati indicano che **la regolazione dell’attività LCAT** gioca un ruolo chiave nell’omeostasi cardiovascolare, in termini di prevenzione dell’aterosclerosi, e rappresenta un nuovo bersaglio per lo sviluppo di strategie terapeutiche, farmacologiche e geniche (Hoeg et al., PNAS 1996). Il contributo, a tale tematica, di questo progetto di ricerca riguarda proprio alcuni meccanismi di regolazione di LCAT.

Oggi gli scienziati concordano sul fatto che l’infiammazione possa essere causa di sviluppo e progressione dell’aterosclerosi (Libby et al., 2002). Nei conigli, alimentati con una dieta arricchita in colesterolo, si osserva una deplezione di LCAT compatibile con alterazioni da stress ossidativo (che aumenta notevolmente durante l’infiammazione) o con una diminuzione della sua sintesi epatica, dal momento che malattie del fegato, associate a steatosi e fibrosi, sono state individuate nel coniglio sottoposto a dieta aterogenica (Kainuma et al., 2006; Wanless et al., 1996; Buysens et al., 1996; Gupta et al., 1976). La diminuzione di LCAT, associata alla diminuzione del suo principale effetto positivo (Apo A-I), comporta un’alterazione del RCT, che è una delle cause alla base della formazione delle placche aterosclerotiche. Nonostante la diminuzione rilevata per la quantità di enzima presente in circolo nei

conigli ipercolesterolemici, tale quantità è sufficientemente stimolata dalla disponibilità di substrato, secondo la cinetica di Michaelis-Menten. Quindi, nel caso dei conigli, si assiste ad una deplezione di LCAT, ma contemporaneamente la quota restante è maggiormente attiva, rispetto a condizioni normali. Nei topi, al contrario, si assiste, durante l'infiammazione, ad un'alterazione dell'attività dell'enzima, mentre non si rilevano variazioni nell'attività in vitro. In questo caso, dopo aver constatato la correlazione tra l'inibizione enzimatica ed il rapporto molare tra Hpt ed Apo A-I, è importante dimostrare che è possibile ripristinare la normale attività enzimatica mediante l'utilizzo di un peptide mimetico di Apo A-I, capace di spiazzare Hpt da Apo A-I in vitro. Ciò dimostrerà come la regolazione dell'attività LCAT, in vivo, possa rappresentare un bersaglio per lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche e farmacologiche.

Ulteriori studi sono in corso allo scopo di sviluppare ulteriormente il peptide in modo da ottenere un prodotto che possa essere sperimentato in clinica.

## BIBLIOGRAFIA

1. **Anderson D. W.**, Nicholas A. V. Forte T. M. and Shore V. G. Particle distribution of human serum high density lipoprotein. *J. Lipid Res.* 28: 719-732; (1987).
2. **Acton S.**, Rigotti A., Landschultz K.T., Xu S., Hobbes H.H., and Krieger, M. Identification of scavenger receptor SR-BI as high density lipoprotein receptor. *Science* 271:518-520; (1996).
3. **Assmann G.**, Gotto A.M., HDL Cholesterol and protective factor in Atherosclerosis. *Circulation* 109: 8-14; (2004).
4. **Auwerx J. H.**, Deeb S., Brunzell J. D. Transcriptional activation of the lipoprotein lipase and apolipoprotein E genes accompanies differentiation in some human macrophage- like cell lines. *Biochemistry* 27: 2651-2655; (1988).
5. **Bamm V. V.**, Tsemakhovich V. A., Shaklai M. and Shaklai N. *Haptoglobin phenotypes differ in their ability to inhibit heme transfer from haemoglobin to LDL.* *Biochemistry* 43; 3899-3906; (2004).
6. **Basu SK**, Ho YK, Brown MS, Bilheimer DW, Anderson RG, Goldstein JL. Biochemical and genetic studies of the apoprotein E secreted by mouse macrophages and human monocytes. *J Biol Chem.* 1982 Aug 25;257(16):9788-95.
7. **Balestrieri M.**, Cigliano L., De Simone M.L., Dale B., and Abrescia P. Haptoglobin inhibits Lecithin-Cholesterol Acyltransferase in human ovarian follicular fluid. *Mol Reprod Dev.* 59: 186-91; (2001).
8. **Benoit P. et al.** Somatic gene transfer of human ApoA-I inhibits atherosclerosis progression in mouse models. *Circulation* 99, 105-10; (1999).
9. **Bielicki J.K.**, Forte T.M., and McCall M.R. Gas-phase cigarette smoke inhibits plasma lecithin-cholesterol acyltransferase activity by modification of the enzyme's free thiols. *Biochim Biophys Acta* 1258: 35-40; (1995). (a)
10. **Bielicki J.K.**, McCall M.R., Vanderberg J.J.M., Kuypers F.A., and Forte T.M. Copper and gas-phase cigarette inhibit plasma lecithin-cholesterol acyltransferase activity by different mechanisms. *J. Lipid Research* 36: 322-31; (1995). (b)
11. **Bielicki JK**, and Forte TM. Evidence that lipid hydroperoxides inhibit plasma lecithin:cholesterol acyltransferase activity. *J Lipid Res* 40:948-954; (1999). (a)
12. **Bielicki J.K.**, Forte T.M., and McCall M.R. Minimally oxidized LDL is a potent inhibitor of lecithin:cholesterol acyltransferase activity. *J. Lipid Res.* 37:1012-1021; (1996).

13. **Bielicki JK**, McCall MR, Forte TM. Apolipoprotein A-I promotes cholesterol release and apolipoprotein E recruitment from THP-1 macrophage-like foam cells. *Journal Lipid Research* 1999; 40: 85-92. (b)
14. **Boisvert WA**, Bluck AS, Curtiss LK. Apo A-I reduces free cholesterol accumulation in atherosclerotic lesions of Apo E-deficient mice trans-planted with ApoE-expressing macrophages. *Arteroscler.Thromb.Vasc.Biol.* 1999; 19: 525-530.
15. **Bortnick A.E.**, Rothblat G.H., Stoudt G., Hoppe K.L., Royer L.J., Mc Neish J., and Francone O.L. *The correlation of ATP-binding cassette 1 mRNA levels with cholesterol efflux from various cell lines.* *J.Biol.Chem.* 275: 28634-28640; (2000).
16. **Bowman B.H.**, Kurosky A. Haptoglobin: the evolutionary product of duplication, unequal crossing over, and point mutation. *Adv Hum Genet.* 12: 189-261; (1982).
17. **Bowman B.H.**, *Haptoglobin.* Academic Press, 159-67; (1993).
18. **Bradford M.M.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248- 252; (1976).
19. **Brewer H. B.**, Jr., Ronan, R., Meng, M., and Bishop, C. (1986) Isolation and characterization of apolipoproteins A-I, A-II, and A-IV, *Methods Enzymol.* 128, 223-246.
20. **Brousseau EM**, Santamarina-Fojo S, Vaisman BL, Applebaum-Bowden D, Bèrard AM, Talley GD, Brewer HB Jr, Hoeg JM. Overexpression of human lecithin:cholesterol acyltransferase in cholesterol- fed rabbits: LDL metabolism and HDL metabolism are affected in a gene dose-dependent manner. *Journal of Lipid Research* 1997; 38: 2537-2547.
21. **Brousseau EM** and Hoeg JM. Transgenic rabbits as models for atherosclerosis research. *Journal of Lipid Research* 1999; 40:365-375.
22. **Brown M.S.** Goldstein JL. Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. *Ann. Rev. Biochem.* 52: 223-261; (1983).
23. **Burstein M**, Scholnick HR, Morfin R. Rapid method for the isolation of lipoproteins from human serum by precipitation with polyanions. *Journal of Lipid Research* 1970; 11: 583-599.
24. **Buysens N**, Kockx MM, Herman AG, Lazou JM, Van den Berg K, Wisse E, Geerts A. Centrolobular liver fibrosis in the hypercholesterolemic rabbit. *Hepatology.* 1996 Oct;24(4):939-46.
25. **Cabana G. V.**, John R. Luckens, Karen S. Rice, Terry J. Hawkins, and Godfrey S. Gets, HDL content and composition in acute phase response in three species: triglyceride enrichment of HDL a factor in its decrease. *Journal of Lipid Research* 37: 2662-2674 (1996).

26. **Cader A**, Steinberg F, Mazzone T, Chait A. Mechanisms of enhanced macrophage Apo E secretion by oxidised LDL. *J. Lipid Res.* 1997; 38: 981-991.
27. **Cybulsky M.I.**, Gimbrone M.A: Jr. *Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis.* *Scienze* 251: 788-791; (1991).
28. **Chambenoit O.**, Hamon Y., Marguet D., Rigneault H., Roseneum and Chimini G. Specific docking of Apolipoprotein AI at the cell surface requires a functional ABCAI transporter. *J.Biol.Chem.* 276: 9955-9960; (2001).
29. **Chapelle J.P.**, Albert A., Smeets J.P., Heusghem C. and HE Kulbertus, *Effect of the haptoglobin phenotype on the size of a myocardial infarct.* *N.E.J. of Medicine.* 307: 457-463; (1982).
30. **Chen CH**, Albers JJ. Characterization of proteoliposomes containing apoprotein A-I: a new substrate for the measurement of lecithin:cholesterol acyltransferase activity. *Journal of Lipid Research* 1982; 23: 680-691.
31. **Chen CH**, Albers JJ. Interspecies activation of lecithin-cholesterol acyltransferase by apolipoprotein A-I isolated from the plasma of humans, horses, sheep, goats and rabbits. *Biochimica et Biophysica Acta* 1983; 753: 40-46.
32. **Chen CH**, Albers JJ. Activation of lecithin: cholesterol acyltransferase by apolipoproteins E-2, E-3, and A-IV isolated from human plasma. *Biochim Biophys Acta.* 1985 Oct 2;836(3):279-85.
33. **Chen C.**, Loo G. Effects of peroxy radicals on Lecithin/Cholesterol Acyltransferase activity in human plasma. *Lipids* 30:627-31; (1995).
34. **Chen YL**, Chang YJ, Jiang MJ. Monocyte chemotactic protein-1 gene and protein expression in atherogenesis of hypercholesterolemic rabbits. *Atherosclerosis* 1999; 143: 115:123.
35. **Chiesa G**, Di Mario C, Colombo N, Vignati L, Marchesi M, Monteggia E, Parolini C, Lorenzon P, Laucello M, Lorusso V, Adamian M, Franceschini G, Newton R, Sirtori CR. Development of a lipid-rich, soft plaque in rabbits, monitored by histology and intravascular ultrasound. *Atherosclerosis.* 2001 Jun;156(2):277-87.
36. **Cigliano L.**, Balestrieri M., Spagnuolo M.S., Dale B., and Abrescia P. Lecithin-cholesterol acyltransferase activity during maturation of human preovulatory follicles with different concentrations of ascorbate,  $\alpha$ -tocopherol and nitrotyrosine. *Reprod. Fertil. Dev.* 14: 15-21; (2002).
37. **Cigliano L**, Spagnuolo MS, Cuomo G, Valentini G, Niglio A, Abrescia P. Apolipoprotein A-I-dependent cholesterol esterification in patients with rheumatoid arthritis. *Life Sciences* 2005; 77(1): 108-120.

38. **Cigliano L**, Spagnuolo MS, Dale B, Balestrieri M, Abrescia P. Estradiol esterification in the human preovulatory follicle. *Steroids* 2001; 66: 889-896.
39. **Clarkson TB**, Lehner NDM, Bullock BC. Specialized research applications: I. Arteriosclerosis research. In *The Biology of the Laboratory Rabbit*. S.H. Weisbroth, R.E. Flatt and A.L. Krauss, editors. Academic Press, San Diego. 155-165.
40. **Craig W.Y.**, Forster N.R., Ledue T.B., Johnson A.M., Neveux L.M., Ritchie R.F. An improved method for determining high molecular weight by protein immunoblotting: application to aptoglobin phenotyping. *Appl. Theor. Electrophor* 2: 135-140; (1991).
41. **Curtiss LK**, Valenta DT, Hime NJ, Rye KA. What is so special about apolipoprotein AI in reverse cholesterol transport? *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2006; 26: 12-19.
42. **Deacon A.C.**, Dawson P.J.G. *Enzymic Assay of total cholesterol involving chemical or enzymic hydrolysis a comparison of methods*. *Clin Chem* 26/6: 976-984; (1979).
43. **de Kleijn DPV**, Smeets MB, Kemmeren PPCW, Lim SK, van Middelaar BJ, Velema E, Schoneveld A, Pasterkamp G, Borst C. Acute-phase protein haptoglobin is a cell migration factor involved in arterial restructuring. *FASEB J.* 2002; 16: 1123-1125.
44. **Delanghe J.R.**, Cambier B., Langlois M., De Bruyzer M., Neels H., De Bacquer M., Van Cauwelaert P. Haptoglobin polymorphism, a genetic risk factor in coronary artery bypass surgery. *J Cardiovasc Risk*; (1997).
45. **Di Rosa M.**, Giroud J.P. & Willoughby D.A., Studies on the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. *J. Pathol.*; 104: 15-29; (1971a).
46. **Di Rosa M.**, Papadimitriou J.M. & Willoughby D.A., *A histopathological and pharmacological analysis of the mode of action of nonsteroidal anti-inflammatory drugs*. *J. Pathol.*; 105: 239-256; (1971b).
47. **Di Rosa M.**, *Biological properties of carrageenan*. *J. Pharm. Pharmacol.*; 24:89-102; (1972).
48. **Duan H**, Gu D, Mazzone T. Sterols and inhibitors of sterol transport modulates the degradation and secretion of macrophage apo E: requirement for the C-terminal domain. *Biochem. Biophys. Acta.* 2000; 1484: 142-150.
49. **Eisenberg S**. Plasma lipoprotein conversions. *Methods Enzymol.* 129: 347-366; (1986).
50. **Elshourbagy NA**, Liao WS, Mahley RW, Taylor JM. Apolipoprotein E mRNA is abundant in the brain and adrenals, as well as in the liver and is present in other peripheral tissue of rats and marmosets. *Proc.Natl.Acad.Sci USA.* 1985 82: 203-207.



51. **Ervasti JM**, Burwell AL, Geissler AL. Tissue-specific heterogeneity in alpha-dystroglycan sialoglycosylation. Skeletal muscle alpha-dystroglycan is a latent receptor for Vicia villosa agglutinin b4 masked by sialic acid modification. *J Biol Chem* 1997; 272: 22315-22321.
52. **Fan J and Watanabe T**. Inflammatory reactions in the pathogenesis of atherosclerosis. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis* 2003; 10: 63–71.
53. **Fielding C.J.** Mechanisms of action of Lecithin-Cholesterol Acyltransferase. *Meth Enz.* 129: 783-790: (1986).
54. **Forte TM**, Bielicki JK, Goth-Goldstein R, Selmek J and McCall MR. Recruitment of cell phospholipids and cholesterol by apolipoproteins A-II and A-I: formation of nascent apolipoprotein specific HDL that differ in size, phospholipids composition, and reactivity with LCAT. *J. Lipid Res.* 1995; 36: 148-157.
55. **Fragoso YD** and Skinner ER. Cholesterol-loading of peripheral tissues alters the interconversion of high density lipoprotein subfractions in rabbits. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 1996; 28: 151-163.
56. **Fragoso YD** and Skinner ER. Uptake of apolipoprotein E-rich and apolipoprotein E-poor subfractions of high-density lipoprotein by liver membranes and HepG2 cells. *Biochem. J.* 1995; 311: 611-615.
57. **Fragoso YD** and Skinner ER. The role of subfractions of high density lipoprotein in the in vivo transport of cholesterol from cholesterol-loaded hepatic and peripheral endothelial cells in the New Zealand white rabbit. *Comp Biochem Physiol B.* 1993 Jul-Aug;105(3-4):699-706.
58. **Francone O.L.**, Fielding C.J. Initial steps in reverse cholesterol transport: the role of short lived cholesterol acceptors. *Eur. J. Clin. Invest.* 11: 218-224; (1990).
59. **Garcia Leme J.**, Hamamura L., Leite M.P. & Rocha e Silva M. *Pharmacological analysis of the acute inflammatory process induced in the rat's paw by local injection of carrageenin and by heating.* *Br.J. Pharmacology.* 48: 88-96; (1973).
60. **Ginsberg HN.** Lipoprotein physiology. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 27: 503-519; (1998)
61. **Ginsberg HN.** Insulin resistance and cardiovascular disease. *J. Clin. Invest.* 2000; 106: 453-458.
62. **Glibetic MD**, Baumann H. Influence of chronic inflammation on the level of mRNA for acute-phase reactants in the mouse liver. *J Immunol* 1986; 137: 1616-1622.
63. **Glomset JA**, Janssen ET, Kennedy R, Dobbins J. Role of plasma lecithin:cholesterol acyltransferase in the metabolism of high density lipoproteins. *Journal of Lipid Research* 1966; 7: 638-648.

64. **Gordon V**, Innerarity TL, Mahley RW. Formation of cholesterol and apoprotein E- enriched high density lipoproteins in vitro. *The Journal of Biological Chemistry* 1983; 258: 6202-6212.
65. **Gordon D.J.**, Rifkind B.M. *High-density lipoprotein: the clinical implications of recent studies.* *New Engl J Med* 321:1311-6; (1989).
66. **Goyal J.**, Wang K., Liu M., and Subbaiah P.V. Novel function of lecithin-cholesterol acyltransferase. *J. Biol. Chem.* 272: 16231-16239; (1997)
67. **Graham A.**, Vinogradov D.V., Owen J.S. Effects of peroxynitrite on plasma components of the reverse cholesterol transport. *FEBS Lett.* 431: 327-332; (1998).
68. **Greenow K**, Pearce N, Ramji DP. The key of apolipoprotein E in atherosclerosis. *J. Mol. Med.* 2005; 83: 329-342.
69. **Gupta PP**, Tandon HD, Ramalingaswami V. Cirrhosis of the liver in rabbits induced by a high cholesterol diet--an experimental model. *Indian J Med Res.* 1976 Oct;64(10):1516-26.
70. **Halliwell B.** and Gutteridge J.M.C. Biologically relevant metal ion-dependent OH<sup>•</sup> generation. *JMC* 307, 108; (1992).
71. **Hamon Y.**, Broccardo C, Chambenoit O., Luciani M.F. Toto F., Chasline S., Freyssonette J.M., Devaux P.F., Mc Neish J., Marguet D., and Chimini G. Abc1 promotes engulfment of apoptotic cells and transbilayer redistribution of phosphatidylserine. *Nat.Cel.Biol.* 2: 399-406; (2000).
72. **Haugen TH**, Hanley JM, Heath EC. Haptoglobin: a novel mode of biosynthesis of a liver secretory glycoprotein. *J Biol Chem* 1981; 256: 1055-57.
73. **Henriques M.G.M.O.**, Silva P.M.R., Martins M.A., Flores C.A., Cunha F.Q., Assreuy-Filho J. & Cordeiro R.S.B., Mouse paw oedema. A new model for inflammation? *Braz. J. Med. Biol. Res.* 20: 243-249; (1987).
74. **Hoeg JM**, Santamarina-Fojo S, Berard AM, Cornhill JF, Herderick EE, Feldman S, Haudenschild CC et al. Overexpression of Lecithin-cholesterol acyltransferase in transgenic rabbits prevents diet-induced atherosclerosis. *PNAS* 1996; 93: 11448-11453.
75. **Hoffman L.H.**, Winfrey V.P., Blaeuer G.L. and Olson G.E. *Biology of reproduction* 55: 176-184; (1996).
76. **Hovingh G.K.**, Van Wijland M.J., Brownlie A. *The role of the ABCA1 transporter and cholesterol efflux in familial hypoalphalipoproteinemia.* *J.Lipid Res.* 44: 1251-1255; (2003).
77. **Johnson WJ**, Mahlberg FH, Rothblat GH, Phillips MC. Cholesterol transport between cells and high-density lipoproteins. *Biochimica et Biophysica Acta* 1991; 1085: 273-298.
78. **Kainuma M**, Fujimoto M, Sekiya N, Tsuneyama K, Cheng C, Takano Y, Terasawa K, Shimada Y. Cholesterol-fed rabbit as a unique model of nonalcoholic, nonobese, non-insulin-resistant

- fatty liver disease with characteristic fibrosis. *J Gastroenterol.* 2006 Oct;41(10):971-80. Epub 2006 Nov 9.
79. **Kalmovarin N**, Friedrichs WE, O'Brien HV et al. Extrahepatic expression of plasma protein genes during inflammation. *Inflammation* 1991; 15:369-379.
  80. **Khovidhunkit W**, Memon RA, Feingold KR, Grunfeld C. Infection and inflammation-induced proatherogenic changes of lipoproteins. *J.Infect. Dis.* 2000; 181: S462-S472.
  81. **Khovidhunkit W** et al., Effect of infection and inflammation on lipid and lipoprotein metabolism: mechanisms and consequences to the host. *J lipid Res* 2004; 45: 1169-1196.
  82. **Kontush A** and Chapman MJ. Antiatherogenic small, dense HDL-guardian angel of the arterial wall?. *Nature Clinical Practice* 2006; 3: 144-153.
  83. **Kunitake ST**, Carilli CT, Lau TH, Protter AA, Naya-Vigne J, Kane JP. Identification of proteins associated with apolipoproteins A-I-containing lipoproteins purified by selected-affinity immunosorption. *Biochemistry* 1994; 33: 1988-1993.
  84. **Kurosky A.**, Hay R.E., Kim H.H., Touchstone B., Rasco M.A. and Bowman B.H. Characterization of the cyanogens bromide fragments of the  $\beta$  chain of human haptoglobin. *Biochemistry* 15: 5326-5336; (1980).
  85. **Laemmli U.K.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685; (1970).
  86. **Langlois M. R.**, Delanghe J. R. *Biological and clinical significance of haptoglobin polymorphism in humans.* *Clin. Chem.* 42: 1589-1600; (1996).
  87. **Libby P**, Ridker PM and Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 2002; 105: 1135–1143.
  88. **Lin YC**, Duan H, Mazzone T. Apolipoprotein E-dependent cholesterol efflux from macrophages: kinetic study and divergent mechanisms for endogenous versus exogenous apolipoprotein E. *J. Lipid Res.* 1999; 40: 1618:1626.
  89. **Lindhorst E**, Young D, Bagshaw W, Hyland M, Kisilevsky R. Acute inflammation, acute phase serum amyloid A and cholesterol metabolism in the mouse. *Biochim Biophys Acta.* 1997 Apr 25;1339(1):143-54.
  90. **Lusa S**, Janhiainem M, Metso J, Somerharju P, Ehnholm C. The mechanism of human plasma phospholipid transfer protein-induced enlargement of high density lipoprotein particles: evidence for particle fusion. *Biochem. J.* 1996; 313: 275-282.
  91. **Mahley RW**, Huang Y, Weisgraber KH. Putting cholesterol in its place: apo E and reverse cholesterol transport. *The Journal of Clinical Investigation* 2006; 116: 1226-1229.

92. **Mahley RW.** Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science* 1988; 240: 622-630.
93. **Marcil M.,** Brooks-Wilson A., Clee S.M. *Mutations in the ABC 1 gene in familial HDL deficiency with defective cholesterol efflux.* *Lancet* 354: 1341-1346; (1999).
94. **Markwell MAK,** Haas SZ, Bieber LL, Tolbert NE. A modification of the lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Analytical Biochemistry* 87, 206-210 (1978).
95. **Matsuura F,** Wang N, Chen W, Jiang X-C, Tall AR. HDL from CETP-deficient subjects shows enhanced ability to promote cholesterol efflux from macrophages in an Apo E and ABCG1-dependent pathway. *J.Clin.Invest.* 2006 116: 1435-1442.
96. **Mazzone T** and Reardon C. Expression of heterologous human apolipoprotein E by J774 macrophages enhances cholesterol efflux from HDL<sub>3</sub>. *J. Lipid Res.* 1994; 35: 1345-1353.
97. **Mazzone T** et al. Regulation of macrophage apolipoprotein E gene expression by cholesterol. *J Lipid Res.*1989 Jul; 30 (7): 1055-64.
98. **McCall M.R.,** van der Berg J.J., Kuypers F.A. Tribble D.L., Krauss R.M., Knoff L.J. et al. Modification of LCAT activity and HDL structure. New links between cigarette smoke and coronary heart disease risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15:1599-1606; (1994).
99. **McCall M.R.,** Tang J.Y., Bielicki J.K., and Forte T.M. *Inhibition of lecithin-cholesterol acyltransferase and modification of HDL apolipoproteins by aldehydes.* *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*15: 1599-1606; (1995).
100. **McNeish J.,** Aiello R.J., Guyot D., Turi T., Gabel C., Aldinger C., Hoppe K.L., Roach M.L., Royer L.G., de Wett J., Broccardo C., Chimini G. and Francone O.L. High density lipoprotein deficiency and foam cell accumulation in mice with targeted destruction of ApoB-binding cassette transporter-1. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 97: 4245-4250; (2000).
101. **Mendez A.J.,** Oram J.F. and Bierman E.L. Protein kinase C as a mediator of high density lipoprotein receptor-dependent efflux of intracellular cholesterol. *J.Biol.Chem.* 266: 10104-10111; (1991).
102. **Mendez A.,** Lin G., Wade D.P., Lawn R.M. and Oram G.F. Membrane lipid domains distinct from cholesterol/sphingomyelin-rich rafts are involved in the ABCA1-mediated lipid secretory pathway. *J.Biol.Chem.* 276: 3158-3166; (2001).
103. **Miller G.J.,** Miller N.E. *Plasma high-density lipoprotein concentration and development of ischaemic heart disease.* *Lancet* 1:16-19; (1975).

104. **Murata Y**, **Maeda E**, **Yoshino G**, **Kasuga M**. Cloning of rabbit LCAT cDNA: increase in LCAT mRNA abundance in the liver of cholesterol-fed rabbits. *J Lipid Res.* 1996 Jul; 37(7):1616-22.
105. **Nantel F.**, Denis D., Gordon R., Northey A., Cirino M., Metters K.M. & Chan C.C. *Distribution and regulation of cyclooxygenase-2 in carrageenan-induced inflammation.* Br. J. Pharmacology 128: 853-859. (1999).
106. **Navab M** et al. The oxidation hypothesis of Atherogenesis: the role of oxidized phospholipids and HDL. *J. Lipid Res.* 2004; 45: 993-1007.
107. **Nofer JR**, Walter M and Assmann G. Current understanding of the role of high-density lipoproteins in atherosclerosis and senescence. *Expert Rev. Cardiovasc. Ther.* 2005; 3(6): 1071-1086.
108. **O'Farrell PH**. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250, 4007-4021; (1975).
109. **Oram J.F.**, Mendez A. J., Slotte J. P. and Johnson T. F. High density lipoprotein apolipoproteins mediate removal of sterol from intracellular pools but not from plasma membranes of cholesterol loaded fibroblasts. *Atheroscler. Thromb.* 11: 403-414; (1991).
110. **Oram JF** and Yokoyama S. Apolipoprotein-mediated removal of cellular cholesterol and phospholipids. *J. Lipid Res.* 1996; 37: 2473-2491.
111. **Oram J.F.**, Lavn M.R., Garvin M.R. and Wade D.P. ABCA1 is the cAMP-inducible apolipoprotein receptor that mediates cholesterol secretion from macrophages. *J.Biol.Chem.* 275: 34508-34511; (2000).
112. **Orso E.**, Broccardo C., Kaminski W.E., Bottcher A., Liebisch G., Drobnik W., Gotz A., Chabenoit O., Diederich W., Langmann T., Spruss T., Luciani M.F., Rothe G., Lackner K.J., Chimini G. and Schmitz G. Transport of lipids from Golgi to plasma membrane is defective in Tangier disease patients and Abc1-deficient mice. *Nat.Genet.* 24: 192-196; (2000).
113. **Paoletti R.**, Bellosta S., Bernini F. *Pharmacological control of phagocyte function: inhibition of cholesterol accumulation.* Ann NY Acad Sci 832:322-9; (1997).
114. **Parks JS**, Gebre AK, Furbee JW. Lecithin-cholesterol acyltransferase. Assay of cholesterol esterification and phospholipase A2 activities. *Methods Mol. Biol.* 1999; 109: 123-131.
115. **Peters-Libeu CA**, Newhouse Y, Hatters DM, Weisgraber KH. Model of biologically active apolipoprotein E bound to dipalmitoylphosphatidylcholine. *J.Biol.Chem.* 2006 260: 8831-8837.
116. **Porta A**, Cassano E, Balestrieri M, Bianco M, Picone R, De Stefano C, Abrescia P. Haptoglobin transport into human ovarian follicles and its binding to apolipoprotein A-I. *Zygote* 1999, 7: 67-77.

117. **Posadas I.**, Bucci M.R., Roviezzo F., Rossi A., Parente L., Sautebin L., Cirino G. Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. *B.J. of Pharmacology* 142:331-338; (2004).
118. **Quinet EM**, Agellon LB, Kroon PA, Marcel YL, Lee YC, Whitlock ME, Tall AR. Atherogenic diet increases cholesteryl ester transfer protein messenger RNA levels in rabbit liver. *J Clin Invest.*1990 Feb; 85(2): 357-63.
119. **Rademacher B.E.**, Steele W.J. A general method for the isolation of haptoglobin 1-1, 2-1 and 2-2 from human plasma. *Anal Biochem.* 160: 119-126; (1987).
120. **Reader D.J. et al.** Markedly accelerated catabolism of apolipoprotein A-II and HDL containing apo A-E in classic LCAT deficiency and fish-eye disease. *J Clin Invest.* 93: 321-330; (1994).
121. **Rees D.**, Sloane T., Jessup W., Dean R. T. and Kritharides L. Apo A-I stimulates secretion of Apolipoprotein E by foam cell macrophages. *J. Biol. Chem.* 274: 27925-27933; (1999).
122. **Rohrer L**, Hersberer M, von Eckardstein A. High density lipoproteins in the intersection of diabetes mellitus, inflammation and cardiovascular disease. *Curr. Opin. Lipids* 2004 15: 269-278.
123. **Ross R.** Atherosclerosis-an inflammatory disease. *The New England Journal of Medicine* 1999; 340: 115–126.
124. **Roth RI**, Gaubatz JW, Gotto AM Jr, Patsch JR. Effect of cholesterol feeding on the distribution of plasma lipoproteins and on the metabolism of apolipoprotein E in the rabbit. *J Lipid Res.* 1983 Jan;24(1):1-11.
125. **Rothbalt G.H.**, Mahlberg F.H., Johnson V.J., and Phillips M.C. Apolipoproteins, membrane cholesterol domain, and the regulation of cholesterol efflux. *J.Lipid.Res.* 33:1091-1097; (1992).
126. **Sadrzadeh SM**, Bozorgmehr J. Haptoglobin phenotypes in health and disorders. *American Journal of Clinical Pathology* 2004; 121: S97-S104.
127. **Santamarina-Fojo S**, Lambert S, Hoeg JM, Brewer HB. Lecithin-cholesterol acyltransferase: role in lipoprotein metabolism, reverse cholesterol transport and atherosclerosis. *Current Opinion in Lipidology* 2000; 11: 267-275.
128. **Salvatore A**, Cigliano L, Bucci EM, Corpillo D, Velasco V, Carlucci A, Pedone P, Abrescia P. Haptoglobin binding to apolipoprotein A-I prevents damage from hydroxyl radicals on its stimulatory activity of the enzyme lecithin-cholesterol acyl-transferase. *Biochemistry.* 2007 Oct 2;46(39):11158-68. Epub 2007 Sep 7.

129. **Schroeder F.**, Jefferson J.R., Kier A.B., Knittel J., Scallen T.J., Wood W.G., et al. Membrane cholesterol dynamics: cholesterol domains and kinetics pools. *Proc Soc Exp Biol Med* 196:235-52; (1991).
130. **Segrest J.P.**, Jones M.K., De Loof H., Brouillette C.G., Venkatachalapathi Y.W., and Anantharamaiah G.M. The amphipatic helix in exchangeable apolipoproteins : a review of secondary structure and function. *J.Lipid.Res.* 33 : 141-166; (1992).
131. **Smithies O.** Zone electrophoresis in starch gels: group variations in the serum proteins of normal human adults. *Biochem. J.* 61: 629-41; (1955).
132. **Smeets MB**, Sluijter JPG, Donners MMPC, Velema E, Heeneman S, Pasterkamp G, de Kleijn DPV. Increased arterial expression of a glycosylated haptoglobin isoform after balloon dilation. *Cardiovascular Research* 2003; 58: 689-695.
133. **Sorci-Thomas M.G.**, Curtiss L., Parks J.S., Thomas M.J., and Kearns M.W. Alteration in apolipoprotein A-1 22-mer repeat order results in a decrease lecithin:cholesterol acyltransferase reactivity. *J Biol Chem.* 272: 7278-7284; (1997).
134. **Sorci-Thomas M.G.**, Thomas M.J., The effect of altered Apolipoprotein A-I structure on plasma HDL concentration. *Trends in Cardiovascular Medicine* 12: 121-128; (2002).
135. **Spagnuolo M. S.**, Cigliano, L., and Abrescia, P. (2003) The binding of haptoglobin to apolipoprotein A-I: influence of hemoglobin and concanavalin A, *Biol. Chem.* 384, 1593-1596.
136. **Spagnuolo MS**, Cigliano L, D'Andrea LD, Pedone C, Abrescia P. Assignment of the binding site for hptoglobin on apolipoprotein A-I. *J.Biol.Chem.* 2005; 280: 1193-1198.
137. **Sparks D.L.** Phillips M.C., and Lund-Kats S. The conformations of apolipoproteine A1 in discoidal and spherical recombinant high density lipoproteine particles 13C nmr studies of lysine ionization behaviour. *J.Biol.Chem.* 267: 25830-25838; (1992).
138. **Sparks DL**, Anantharamaiah GM, Segrest JP, Phillips MC. Effect of the cholesterol content of reconstituted LpA-I on lecithin:cholesterol acyltransferase activity. *The journal of Biological Chemistry* 1995; 270: 5151-5157.
139. **Spooner R. L.** and Miller J. K. The measurement of haemoglobin reactive protein in ruminants as an aid to the diagnosis of acute inflammation. *Vet. Rec.* 88,2; (1971).
140. **Stahl WM.** Acute phase protein response to tissue injury. *Crit Care Med* 1987; 15: 545-550.
141. **Subbaiah PV**, and Liu M. Disparate effects of oxidation on plasma acyltransferase activities: inhibition of cholesterol esterification but stimulation of transesterification of oxidized phospholipids. *Biochim Biophys Acta* 130:115-126. (1996).
142. **Subbaiah P.V.**, Liu M., and Witt T.R. Impaired cholesterol esterification in the plasma in patients with breast cancer. *Lipids* 32: 157-161; 1997.

143. **Sutton H.C.** and Winterbourn C.C. On the participation of higher oxidation states of iron and copper in Fenton reactions. *Free Rad.Biol.Med.* 6, 53; (1989).
144. **Taylor JM** and Fan J. Transgenic rabbit models for the study of atherosclerosis. *Frontiers in Bioscience* 2 1997; d298-308.
145. **Tollefson J.H.**, Albers J. Isolation, characterization and assay of plasma lipid transfer proteins. *Methods Enzymol.* 129: 797-816; (1986).
146. **Turner GA.** Haptoglobin. A potential reporter molecule for glycosylation changes in disease. *Adv Exp Med Biol* 1995; 376: 231-238.
147. **Vohl M.C.**, Neville T.A., Kumurathasan R., Braschi S., and Sparks D.L. A novel lecithin-cholesterol acyltransferase antioxidant activity prevents the formation of oxidized lipids during lipoprotein oxidation. *Biochemistry* 38:5976-5981; (1999)
148. **Wang N.**, Silver D.L., Costet P., and Tall A.R. Specific binding of ApoA1, enhanced cholesterol efflux, and altered plasma membrane morphology in cells expressing Abc1. *J.Biol.Chem.* 275: 33053-33058; (2000).
149. **Wanless IR, Belgiorno J, Huet PM.** Hepatic sinusoidal fibrosis induced by cholesterol and stilbestrol in the rabbit: 1. Morphology and inhibition of fibrogenesis by dipyridamole. *Hepatology.* 1996 Oct;24(4):855-64.
150. **Weisgraber KH** and Mahley RW. Subfractionation of human high density lipoproteins by heparin-Sepharose affinity chromatography. *Journal of Lipid Research* 1980; 21: 316-325.
151. **Wilson HM**, Griffin BA, Watt C, Skinner ER. The isolation and characterization of high-density-lipoprotein subfractions containing apolipoprotein E from human plasma. *Biochem. J.* 1992; 284: 477-481.
152. **Yeagle P.L.** *Modulation of membrane function by cholesterol.* *Biochimie* 73:1303-10; (1991).
153. **Zorich N**, Jonas A, Pownall HJ. Activation of lecithin cholesterol Acyltransferase by human apolipoprotein E in discoidal complexes with lipids. *The Journal of Biological Chemistry* 1985; 260: 8831-8837.



## **ABBREVIAZIONI**

**Acetil-LDL** = LDL acetilate

**Ox-LDL** = LDL ossidate

**Apo A-I** = apolipoproteina AI

**Apo E** = apolipoproteina E

**ABCA1**=ATP-binding cassette A1

**ACAT** = AcilCoA-colesterolo aciltrasferasi

**BSA** = albumina bovina

**C** = colesterolo libero

**CE** = estere del colesterolo

**CT** = colesterolo totale

**CETP** = proteina di trasferimento dei CE

**ELISA** = saggio enzimatico immunologico

**Hb** = emoglobina

**HDL** = lipoproteine ad alte densità

**HL** = lipasi epatica

**HMG-CoA reduttasi** = 3-idrossi-3-metilglutaril-Coenzima A redattasi

**HPLC** = cromatografia liquida ad alta pressione

**Hpt** = aptoglobina

**ICAM-1** = molecola-1 di adesione intercellulare

**IDL** = lipoproteine a densità intermedia

**IL-1, IL-6** = interleuchine 1 e 6

**LCAT** = lecitina-colesterolo acil-transferasi

**LDL** = lipoproteine a bassa densità

**LPL** = lipoproteinlipasi

**LPS** = lipopolisaccaride

**LTP I, LTP II** = proteina di trasferimento dei lipidi (I, II)

**PAF-AH** = fattore attivante piastrinico-acetilidrossilasi

**PDGF** = fattore di crescita derivato dalle piastrine

**PKC** = protein chinasi C

**PLTP** = proteina di trasferimento dei fosfolipidi

**PON** = paraoxonasi

**ROS** = specie reattive dell'ossigeno

**RTC** = trasporto inverso del colesterolo

**SR** = recettore spazzino

**TBS** = Tris Buffer Salino (cioè con NaCl)

**TLC** = thin layer chromatography (cromatografia su strato sottile)

**TNF** = fattore di necrosi tumorale

**VCAM-1** = ICAM specifica del tessuto vascolare

**VLDL** = lipoproteine a densità molto bassa