



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

**DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE**

Corso di Laurea Magistrale  
Biologia Molecolare e Applicata  
Indirizzo Scienze della Nutrizione

**STUDIO DELL'EFFETTO DELLA  
SFINGOMIELINASI SULLE LIPOPROTEINE A  
BASSA DENSITÀ (LDL)**

**STUDY OF THE EFFECT OF SPHINGOMYELINASE  
ON LOW DENSITY LIPOPROTEIN (LDL)**

Tesi di Laurea Magistrale

di:

Chiara Sofia

Relatore

Chiar.mo Prof.

Tiziana Bacchetti

Correlatore:

Prof.essa Gianna Ferretti

Dott. Gabriele Mazzuferi

**Sessione Autunnale**

**Anno Accademico 2019/2020**

# INDICE

Scopo della tesi

- 1) Le Lipoproteine plasmatiche a bassa densità (LDL): struttura e funzioni
  - 1.1 Le lipoproteine
  - 1.2 Composizione apoproteica delle LDL
  - 1.3 Composizione lipidica
  - 1.4 Eterogeneità delle LDL
  - 1.5 Metabolismo delle LDL
  - 1.6 Ruolo delle LDL nell'omeostasi del colesterolo
- 2) Ruolo delle LDL nello sviluppo delle patologie cardiovascolari
  - 2.1 Evidenze epidemiologiche
  - 2.2 Meccanismi molecolari
- 3) Remodelling composizionale delle LDL: effetti fisio-patologici
  - 3.1 Alterazioni strutturali e funzionali delle LDL ossidate
  - 3.2 Alterazioni strutturali e funzionali delle LDL glicate
  - 3.3 Modifiche enzimatiche
- 4) LDL e Sfingomielinasi
  - 4.1 Classificazione delle sfingomielinasi
  - 4.2 Struttura della sfingomielinasi
  - 4.3 Funzione
  - 4.4 Sfingomielinasi in condizioni patologiche
  - 4.5 Interazione Sfingomielinasi-LDL e possibili sviluppi patologici

## 5) Materiali e Metodi

5.1 Dosaggio delle proteine LDL

5.2 Modifiche delle LDL indotte in vitro

5.3 Saggi per valutare gli effetti delle modifiche in vitro

5.4 Proprietà chimico-fisiche delle LDL

5.5 Effetto sulla componente proteica

5.6 Valutazione dello stato di ossidazione delle LDL

5.7 Valutazione dell'aggregazione delle LDL.

## 6) Risultati e discussione

6.1 Effetto del trattamento con sfingomielinasi sulle LDL

6.2 Effetto del trattamento con sfingomielinasi sulle LDL glicate e ossidate *in vitro*

## 7) Conclusioni

## 8) Bibliografia

## **Scopo della tesi**

Le lipoproteine plasmatiche sono macromolecole di elevato peso molecolare, costituite da proteine (apo-proteine) coniugate con una componente lipidica. Esse svolgono un ruolo importante nel trasporto di lipidi in circolo.

Tra le differenti classi di lipoproteine, le lipoproteine a bassa densità (LDL) sono principalmente coinvolte nel trasporto di colesterolo e un aumento dei loro livelli plasmatici è considerato un fattore di rischio cardiovascolare (Wilson et al. 1998). Infatti, gli eventi chiave nello sviluppo delle patologie cardiovascolari, sono la ritenzione e l'accumulo di LDL ricche in colesterolo all'interno della tonaca intima della parete arteriosa nei siti di predilezione per la formazione di placca.

Recenti studi hanno evidenziato che durante la loro vita in circolo le LDL sono suscettibili a modificazioni della loro composizione lipidica e apoproteica (es. ossidazione, glicazione etc..) (Hevonoja et al. 2000). Tali alterazioni si riflettono in alterazioni delle funzioni svolte dalle lipoproteine. Le LDL modificate dal punto di vista strutturale mostrano alterazioni delle loro funzioni e risultano maggiormente aterogeniche. Infatti, le LDL modificate mostrano una maggiore capacità di attivare il reclutamento dei monociti, di promuovere l'adesione dei monociti all'endotelio attraverso l'induzione dell'espressione di molecole di adesione, di fattori chemiotattici e di crescita da parte delle cellule

endoteliali, nonché di promuovere l'attivazione delle piastrine ponendo le basi della formazione della placca aterosclerotica (Gleissner et al. 2005)

Le LDL sono suscettibili a numerose alterazioni che possono essere di origine enzimatica e non enzimatica e che possono coinvolgere la componente lipidica o la componente apoproteica o entrambe. Tra queste le modifiche maggiormente studiate sono l'ossidazione e la glicazione. Un aumento dei livelli di LDL ossidate e/o glicate si osservano in patologie dismetaboliche (obesità, diabete), cronico-degenerative e neuro-degenerative (Alzheimer) ed è stato evidenziato un loro ruolo importante nei meccanismi molecolari alla base dello sviluppo e della progressione di tali patologie (Alique et al. 2015).

Recenti studi hanno evidenziato che le LDL possono essere sensibili a modifiche di origine enzimatica. La sfingomielinasi è un enzima in grado di catalizzare l'idrolisi della sfingomielina in fosforilcolina e ceramide. Un'elevata attività dell'enzima in queste condizioni, può essere il risultato di un maggiore rilascio da parte di macrofagi e cellule endoteliali a seguito dalla stimolazione da parte di citochine pro infiammatorie. Recenti studi hanno dimostrato che le LDL sono sensibili all'azione della sfingomielinasi. LDL trattate con l'enzima mostrano una spiccata tendenza all'auto-aggregazione probabilmente guidata dai legami idrogeno intramolecolari, suggerendo alterazioni delle loro funzioni e un'aumentata aterogenicità (Holopainen et al.

2000). Queste modifiche possono avere rilevanza fisio-patologica in quanto, un aumento dell'attività della sfingomielinasi nel siero o nel plasma si osserva in un'ampia gamma di malattie infiammatorie tra cui diabete, obesità e patologie cardiovascolari (Pan et al. 2014).

Scopo della tesi è stato investigare ulteriormente l'effetto della sfingomielinasi sulle LDL. LDL sono state trattate in presenza dell'enzima e sono state valutate le alterazioni a carico delle caratteristiche composizionali (livelli di ceramide), delle proprietà fisico-chimiche (fluidità e polarità) della componente lipidica e apoproteica delle LDL. L'organizzazione strutturale delle LDL normali e trattate è stata studiata mediante l'analisi della fluorescenza intrinseca del triptofano e mediante l'analisi delle proprietà spettrali della sonda fluorescente Laurdan. Inoltre, sono stati valutati gli effetti di tali alterazioni sulle proprietà funzionali delle LDL (tendenza all'aggregazione e suscettibilità all'ossidazione).

Inoltre, scopo della tesi è stato investigare se altre modifiche composizionali a carico delle LDL, che avvengono *in vivo*, possono influenzare la suscettibilità delle lipoproteine all'azione della sfingomielinasi. A tale scopo, LDL sono state ossidate (ox-LDL) e glicate (gly-LDL) *in vitro* utilizzando protocolli sperimentali messi a punto in studi precedenti. Le ox-LDL e gly-LDL sono

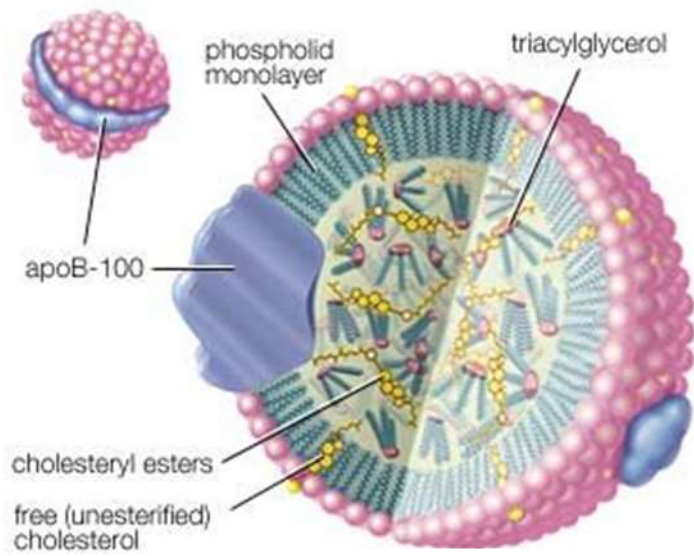
state, successivamente, trattate l'enzima sfingomielinasi e sono stati comparati gli effetti sulle proprietà fisico-chimiche e sulle caratteristiche composizionali.

## **1) Lipoproteine plasmatiche a bassa densità (LDL): struttura e funzioni**

### ***1.1 Le lipoproteine***

Le lipoproteine plasmatiche sono aggregati macromolecolari di elevato peso molecolare e di dimensioni variabili da una decina ad alcune centinaia di nanometri, che risultano costituiti da proteine (apo-proteine) coniugate con una componente lipidica a quali risultano legati ad esse con un legame covalente o non covalente. Presentano una struttura micellare formata da uno strato esterno anfipatico costituito da apoproteine e un singolo strato di fosfolipidi e colesterolo libero e un core interno idrofobico costituito da lipidi non solubili in acqua (idrofobici) quali trigliceridi e colesterolo esterificato (Figura 1).





**Figura 1: Struttura delle LDL.** (*Fonte: Encyclopædia Britannica, Inc.2007*)

Le principali funzioni svolte dalle lipoproteine plasmatiche sono legate al trasporto di lipidi endogeni ed esogeni, all'interazione con recettori presenti sulle membrane biologiche, regolazione della composizione lipidica delle membrane biologiche e delle funzioni cellulari.

Le lipoproteine possono essere classificate in base a differenti parametri quali la densità, mobilità elettroforetica e il contenuto dell'apoproteine.

La classificazione basata sulla densità vede la divisione delle lipoproteine in 6 classi. (Tabella 1). Esse differiscono per la composizione lipidica, apoproteica e per differenze chimico-fisiche. Ogni classe di lipoproteine si caratterizza per una eterogeneità sia da un punto di vista compositivo che funzionale.

<b>Classe di lipoproteine</b>	<b>Densità (g/mL)</b>
Chilomicroni	<0.95
Chilomicroni remnants	<1.006
VLDL	0.95-1.006
IDL	1.006-1.019
LDL	1.019-1.096
HDL	1.063-1.210

**Tabella 1: Classificazione delle Lipoproteine in funzione della loro densità.**

I chilomicroni presentano un elevato contenuto di trigliceridi circa il 87%, un 9% di fosfolipidi, un 3% di colesterolo e infine l'1% di proteine. Andando verso classi di lipoproteine a maggiore densità si nota un aumento del contenuto di colesterolo e della componente proteica e fosfolipidica e un decremento del contenuto di trigliceridi. Le VLDL presentano 55% di trigliceridi, 19% di colesterolo, 18% di fosfolipidi e 8% di proteine.

Le LDL avranno un contenuto di colesterolo pari al 50%, di proteine pari al 22% così come per i fosfolipidi e un 6% di trigliceridi.

In questa tesi si porrà attenzione particolare alla classe delle LDL per il loro ruolo nel trasporto di colesterolo e il loro stretto coinvolgimento nei meccanismi molecolari alla base delle principali patologie cronico-degenerative.

## *1.2 Composizione apoproteica delle LDL*

Le particelle lipoproteiche presentano sulla superficie una componente proteica legata alla parte non polare dei lipidi presenti nelle lipoproteine, le apoproteine. Le  $\alpha$  eliche anfipatiche delle apoproteine sono motivi strutturali comuni e permettono alla componente proteica di interagire con la parte lipidica contribuendo al mantenimento della stabilità della struttura.

Se ne possono distinguere differenti classi dalla A alla E D e ciascuna di esse può essere divisa in sottoclassi, in particolari le Apo B sono le principali costituenti delle LDL e VLDL. Nello specifico l'Apo B100, una glicoproteina di 4536 amminoacidi rappresenta la principale componente apoproteica delle LDL e VLDL (Mackness et al. 1995). Essa proviene dalle particelle VLDL che vengono modificate e trasformate in LDL nei processi metabolici. Attraverso gli spettri di dicroismo circolare delle LDL, è stata evidenziata la struttura dell'Apo B100 che risulta caratterizzata da un'ampia  $\alpha$  (circa 50%), e in minore parte da foglietti  $\beta$  (circa 11%),  $\beta$  turns (circa 27%) e random coil (circa il 13%). (Morita et al. 2003). Sono stati identificati differenti domini funzionali nell'Apo B100 tra i quali il sito di legame per il recettore LDL risulta localizzato nei residui 3359-3369. (Borën et al. 1998). L'Apo B100 svolge un ruolo fondamentale nell'assemblaggio, la secrezione e il metabolismo delle LDL; mantiene l'integrità strutturale delle lipoproteine LDL e modula la loro

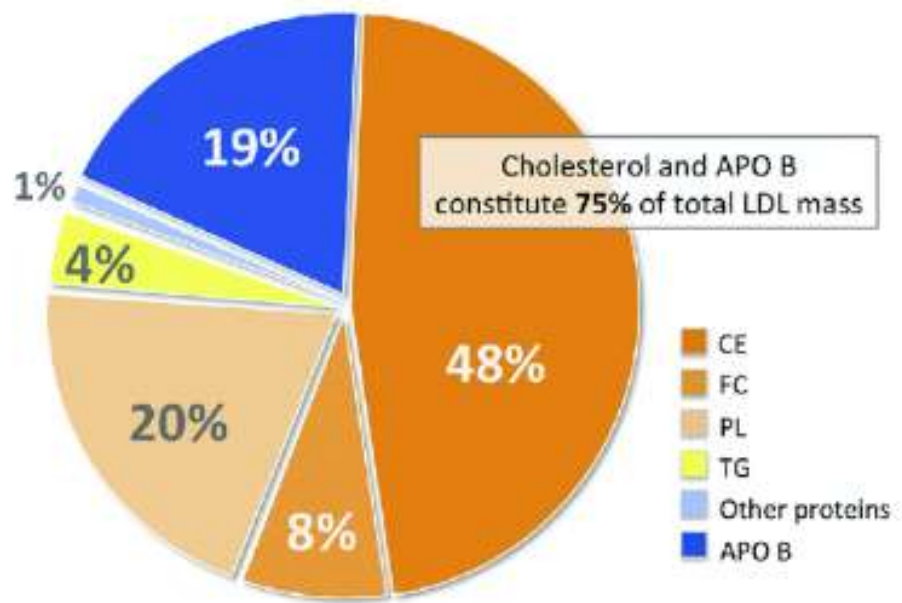
interazione con il recettore LDL (LDLR) presente sulla superficie delle cellule dei tessuti periferici, svolgendo un ruolo fondamentale nel metabolismo del colesterolo.

L'estremità N-terminale dell'Apo B100 lega l'enzima lipoprotein lipasi (LPL) (Sivaram et al. 1994) e l'estremità C-terminale media l'associazione delle LDL con l'enzima PAF (fattore di attivazione delle piastrine) acetilidrolasi. (Stafforini et al. 1999). I residui di lisina e arginina carichi positivamente dell'Apo B100 interagiscono con i glicosamminoglicani (GAG). Tale interazione porta ad un accumulo di aggregati a livello dell'intima vascolare e rappresenta un evento iniziatore della patogenesi dell'aterosclerosi. (Weisgraber et al. 1987; Camejo et al. 1988).

### ***1.3 Composizione Lipidica***

Le LDL presentano un contenuto di colesterolo pari al 50%, di proteine pari al 22% così come per i fosfolipidi e un 6% di trigliceridi (Figura 2). Queste complesse strutture coinvolgono da 2000 a 3000 molecole lipidiche.

Ogni particella di LDL presenta un nucleo lipofilico formato all'incirca da 1600 molecole di esteri di colesterolo e 170 molecole di trigliceridi. Il nucleo risulta circondato da circa 700 molecole di fosfolipidi, inoltre è presente colesterolo libero (Tabelle 2 e 3).



**Figura 2: Composizione LDL.**(Fonte: Masana L. et al. 2018)

<b>Tabella 2</b>	
<b>Componenti della superficie</b>	<b>(mol %)</b>
Colesterolo	42
Fosfolipidi	58
Apoproteine	0,2

<b>Tabella 3</b>	
<b>Componenti del core</b>	<b>(mol %)</b>
Trigliceridi	19
Esteri del colesterolo	81

**Tabelle 2 e 3: Composizione lipidica della superficie e del core delle LDL in mol %.**

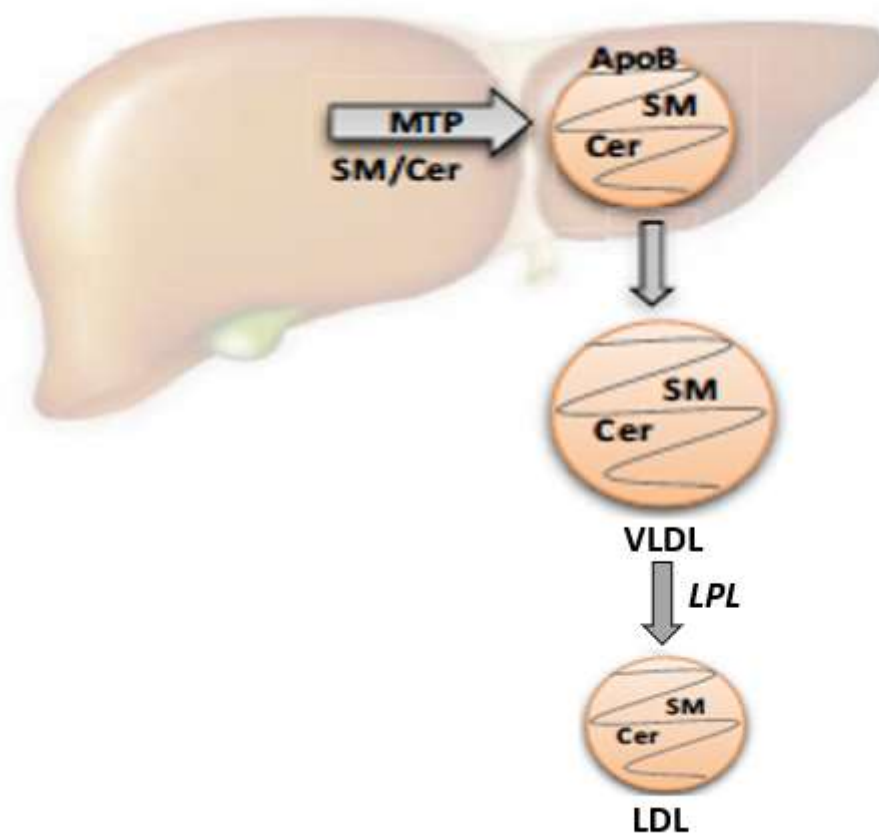
Il numero totale di acidi grassi legati alle differenti classi di LDL è circa 2700, metà dei quali sono acidi grassi polinsaturi (PUFA), di cui i principali sono gli acidi arachidonico e linoleico. Variazioni del contenuto di acidi grassi polinsaturi svolgono un ruolo nel differente comportamento ossidativo dei campioni di LDL.

I fosfolipidi delle LDL sono principalmente costituiti da sfingomieline (30%), costituita da fosforilcolina e ceramide e fosfatidilcolina (66%).

La funzione dei fosfolipidi è rendere le LDL più idrosolubili, in modo che esse siano veicolabili dal torrente sanguigno fino alle cellule predisposte al loro metabolismo.

Gli sfingolipidi presenti sulle LDL vengono prevalentemente sintetizzati de novo nel reticolo endoplasmatico delle cellule epatiche. Una volta sintetizzati sono assemblati e incorporati nelle VLDL grazie alla proteina MTP. A seguito della secrezione in circolo dalle VLDL si ottengono le LDL grazie all'azione dell'enzima LPL (Figura 3).





**Figura 3: Biosintesi degli sfingolipidi.**

Le variazioni nell'organizzazione molecolare dei lipidi / apo-B100 influiscono sulla struttura delle LDL e devono essere considerate come determinanti fisiologici della funzione delle LDL (Prassl et al. 2012). La superficie delle LDL mostra una microeterogenità compositiva che può influenzare il metabolismo *in vivo* delle LDL e il folding dell'apoproteina B100 (Murphy et al. 1997). Infatti, i lipidi dello strato interfacciale non sono distribuiti in modo omogeneo, ma formano microambienti locali (Prassl et al. 2012). Sono stati identificati due micro-domini, uno ricco di sfingomieline e colesterolo libero, l'altro ricco di fosfatidilcolina e povero di colesterolo libero. Il secondo risulta essere associato più strettamente con Apo B100 (Sommer et al. 1992). Questi domini non sono statici o limitati in termini di dimensioni e numero.

### ***1.4 Eterogeneità LDL***

Si può evidenziare una vasta eterogeneità all'interno della classe delle LDL, infatti è possibile suddividerle in sottoclassi che si differenziano per proprietà chimico fisiche (Tabella 4).

Le tre sottoclassi sono:

- LDL 1, LDL grandi e leggere con densità tra 1.030 (g/mL) e 1.033 (g/mL),
- LDL 2 con densità tra 1.033(g/mL) e 1.040(g/mL)
- LDL 3, piccole e con densità tra 1.040 (g/mL) e 1.045(g/mL) caratterizzate da minore contenuto di colesterolo e maggiore contenuto di acidi grassi polinsaturi se confrontate con le sottoclassi meno dense.

L'aumento della densità delle lipoproteine è connesso con un aumento del rapporto proteine/lipidi.

La componente glucidica associata all'Apo B e ai lipidi differisce tra le varie sottoclassi: l'acido salicilico è minore nelle LDL più dense, che risultano inoltre meno ricche in carboidrati rispetto a quelle di densità inferiore (Le Belle et al. 1990).

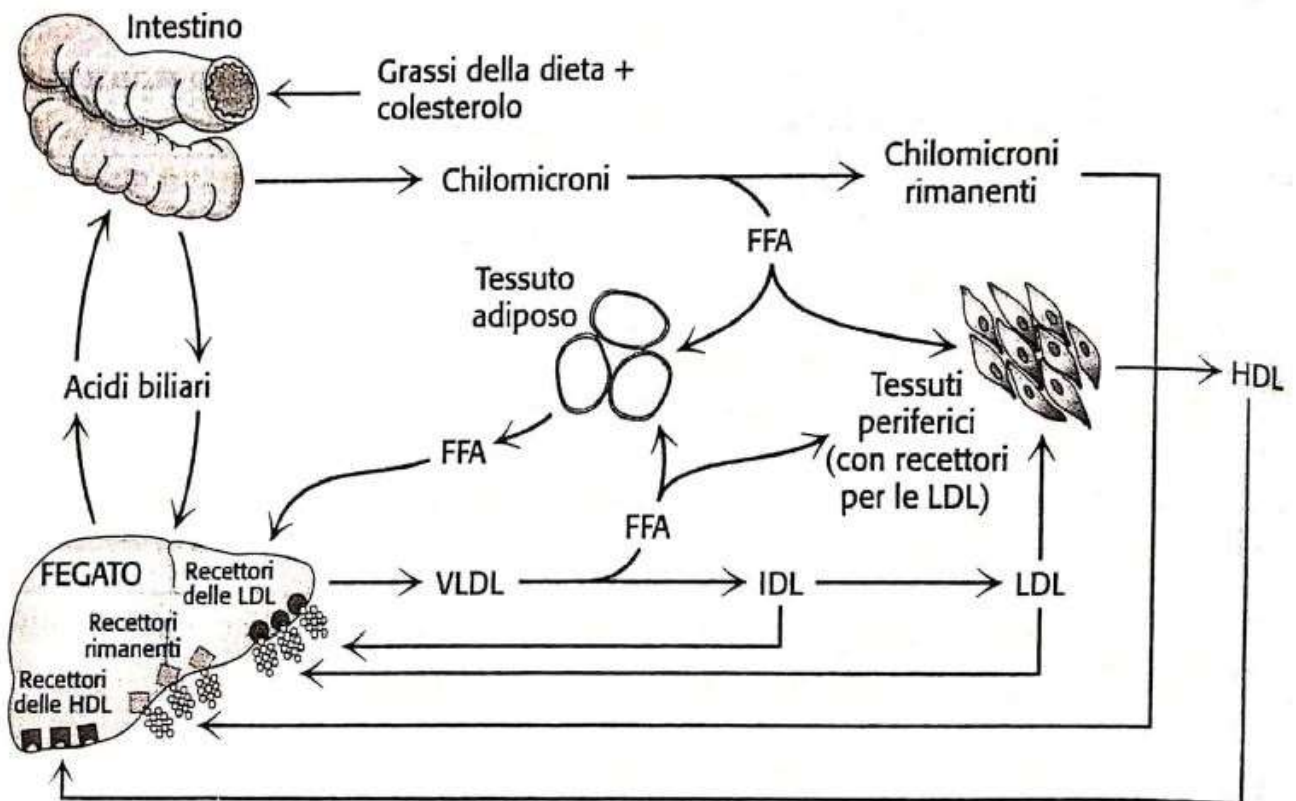
Alle differenze composizionali delle sottoclassi è possibile aggiungere differenze nella struttura secondaria dell'apoproteina ApoB100 come per esempio la riduzione del contenuto di filamenti  $\beta$  nella frazione delle LDL più piccole e dense. (Tanfani et al. 1997)

<b>Caratteristiche chimico-fisiche</b>	<b>LDL1</b>	<b>LDL2</b>	<b>LDL3</b>
Densità (g/ml)	1,030-1,033	10,33-1,040	1,040-1,045
Trigliceridi (%)	4,46	4,29 $\pm$ 1,59	5,71 $\pm$ 2,55
Colesterolo libero	10,8 $\pm$ 1,17	9,85 $\pm$ 1,22	9,38 $\pm$ 1,23
Colesterolo esterificato (%)	39,61 $\pm$ 2,9	39,49 $\pm$ 3,82	35,03 $\pm$ 4,21
Fosfolipidi (%)	21,31 $\pm$ 1,33	20,61 $\pm$ 1,62	19,27 $\pm$ 0,97
Proteine (%)	23,82 $\pm$ 2,98	25,76 $\pm$ 2,74	30,62 $\pm$ 1,85
Colesterolo/proteine	1,46 $\pm$ 0,21	1,31 $\pm$ 0,20	0,99 $\pm$ 0,11
Vitamina E (mg/ g di prot.)	4,53 $\pm$ 0,95	4,66 $\pm$ 0,65	3,73 $\pm$ 0,98
Vitamina E (mg/ g di colest.)	3,06 $\pm$ 0,39	3,46 $\pm$ 0,69	3,81 $\pm$ 1,02
Totale acidi grassi	2097 $\pm$ 400	2273 $\pm$ 572	3005 $\pm$ 473
Totali acidi grassi polinsaturi	1065 $\pm$ 210	1169 $\pm$ 278	1503 $\pm$ 288

**Tabella 4: Caratteristiche fisico-chimiche e composizione lipidica delle LDL umane.**

### 1.5 Metabolismo LDL

I principali enzimi del metabolismo lipoproteico sono la lipoprotein lipasi (LPL), enzima che idrolizza i trigliceridi contenuti nelle VLDL e nei chilomicroni, e la lipasi epatica, la quale idrolizza i fosfolipidi e i trigliceridi contenuti nelle VLDL, HDL e nei chilomicroni. Il fegato svolge un ruolo centrale nel metabolismo lipoproteico (Figura 4).



**Figura 4: Metabolismo delle particelle lipoproteiche.** FFA è l'abbreviazione di acidi grassi liberi (Fonte: Goodman and Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, a cura di J.G. Hardman, L.L. Limbird e A.G. Gilman, Mc-Graw-Hill, 2001, p.975, fig. 36.1.)

I trigliceridi e il colesterolo biosintetizzati nel fegato sono usati per la sintesi di lipoproteine a densità molto bassa (VLDL).

L'idrolisi da parte della lipoprotein lipasi (LPL), presente sulla superficie dei capillari dei trigliceridi, libera acidi grassi che possono restare in circolo o essere internalizzati nelle cellule. Le particelle risultanti dall'azione della LPL sono le lipoproteine a densità intermedia (IDL), che risultano ricche di esteri di colesterolo. Esse possono essere captate dal fegato o essere convertite in LDL ad opera della LPL (McKeone et al. 1993), che ne diminuisce il contenuto di trigliceridi e incrementando al contempo il contenuto di colesterolo esterificato.

### ***1.6 Ruolo delle LDL nell'omeostasi del colesterolo***

Il ruolo principale delle LDL consiste nel trasporto del colesterolo dal fegato ai tessuti periferici, che lo utilizzeranno per funzioni plastiche o metaboliche. Le LDL vengono poi acquisite dalle cellule dei tessuti, grazie al riconoscimento da parte di recettori specifici dell'Apoproteina Apo B100. (Van der Wulp et al. 2013)

Il recettore delle LDL consiste in una glicoproteina transmembrana di 839 amminoacidi che può essere suddiviso in 5 “domini”. Il primo è definito “dominio di legame” e presenta una struttura convoluta a cui si lega una porzione complementare dell'Apoproteina B-100 e dell'Apoproteina E.

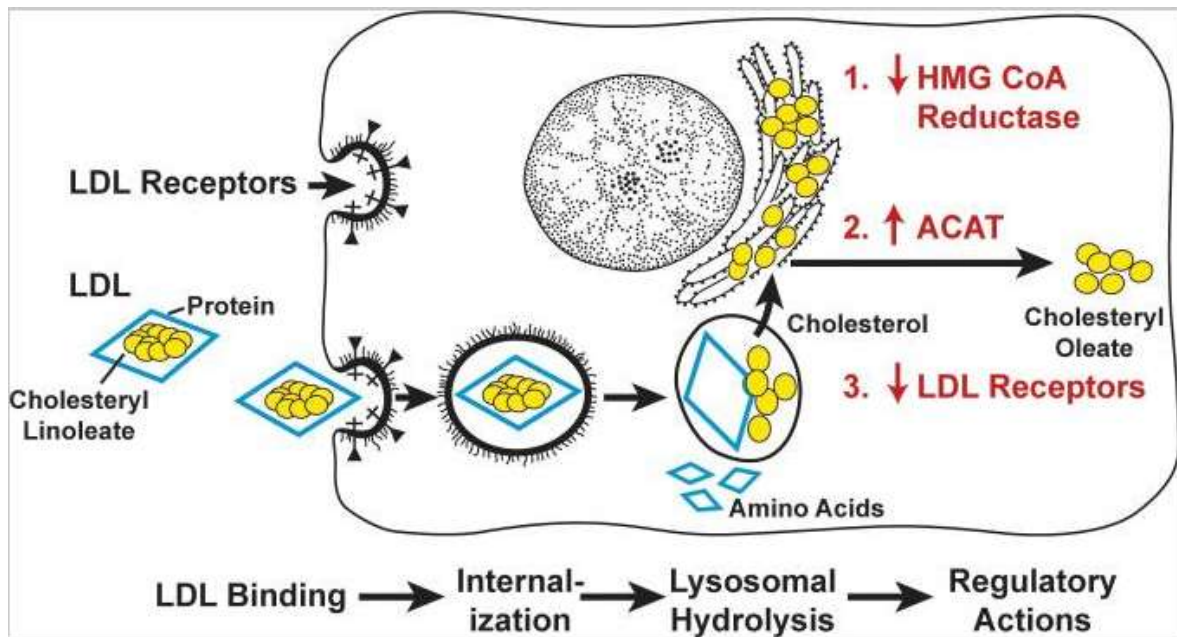
Il “quinto dominio” che è responsabile del raccoglimento dei recettori in aree specializzate, le “fossette rivestite”. Il riconoscimento da parte del recettore promuove un processo di endocitosi grazie al quale le LDL sono trasportate all'interno della cellula tramite endosoma. Si formano delle vescicole di clatrina che, fondendosi con un lisosoma contenente enzimi capaci di idrolizzare gli esteri di colesterolo (proteasi e lipasi), rilasceranno colesterolo libero e acidi grassi. A causa dell'ambiente acido i recettori si dissociano dalle LDL e tornano alla superficie cellulare per un nuovo ciclo.

Per evitare un accumulo di colesterolo intracellulare la sintesi endogena cellulare, viene del tutto soppressa all'ingresso del colesterolo introdotto dalle

LDL captate. L'inibizione viene effettuata agendo sull'enzima chiave della via biosintetica degli steroli: 3-idrossi-3-metilglutaril Coenzima A reduttasi (HMG-CoA reduttasi) (Van der Wulp et al. 2013). Elevati livelli di colesterolo determinano una riduzione della sintesi del recettore delle LDL e viene promosso l'immagazzinamento del colesterolo tramite l'attivazione dell'enzima acil-colesterolo-acil- trasferasi (ACAT) (Figura 5).

Attraverso questi meccanismi di regolazione la cellula è in grado di sopperire al proprio fabbisogno evitando un accumulo di colesterolo.





**Figura 5: Regolazione del metabolismo del colesterolo.** (Fonte: Goldstein J.L. et al. 2009)

## 2) RUOLO DELLE LDL NELLO SVILUPPO DELLE PATOLOGIE CARDIOVASCOLARI

### 2.1 Evidenze epidemiologiche

Le patologie cardiovascolari sono tra le principali cause di morbilità e mortalità nel mondo. I loro fattori di rischio comprendono fattori non modificabili, come sesso ed età, sia fattori modificabili come fumo, ipertensione, obesità e elevati livelli di colesterolo LDL (LDL-C) (Rishi et al. 2016).

Indagini epidemiologiche hanno dimostrato che i livelli di LDL-C sono un fattore predittivo del rischio cardiovascolare (Tabella 5). Le particelle di LDL circolanti sono in grado di penetrare l'endotelio delle pareti arteriose e promuovere l'infiammazione e provocare lesioni sia all'endotelio sovrastante che alle cellule muscolari lisce circostanti. (Ross 1999).

LDL-C (mg/dl)	Rischio cardiovascolare
<130 (normale)	Basso
130-159 (borderline)	Moderato
>160 (alto)	Alto

**Tabella 5: Valori di riferimento per il LDL-C.** (Fonte: Wilson P.W. et al. 1998)

Uomini e donne che presentano livelli di LDL di 160 mg/dL hanno una probabilità maggiore di 1.5 di sviluppare patologie cardiovascolari rispetto a una popolazione di riferimento con livelli di LDL di 130 mg/dL. (Wilson et al. 1998). Il rischio di sviluppare una malattia coronarica aumenta di circa il 40% per ogni aumento incrementale di 39 mg/dL di LDL (Sharrett et al. 2001).

Aumenti persistenti delle LDL circolanti sono stati direttamente connessi alla progressione delle placche aterosclerotiche. Topi con deficit di recettori LDL, presentano elevati livelli circolanti di LDL e mostrano lo sviluppo di una grave aterosclerosi (Veniant et al. 2000). Al contrario, topi con una funzionalità fisiologica del recettore LDL non sviluppano aterosclerosi indipendentemente della dieta e da altri fattori di rischio di malattia coronarica (Lieu et al. 2003).

L'associazione delle LDL con il rischio di sviluppare patologie cardiovascolari è supportata anche da dati provenienti da misure delle lipoproteine aterogene. Per esempio, a livelli identici di LDL-C, la misurazione del numero di particelle LDL circolanti ha un elevato valore prognostico. Un maggiore numero di particelle LDL più piccole e dense è associato a un rischio maggiore di sviluppare patologie cardiovascolari (Otvos et al. 2011). Le particelle LDL piccole e dense sono più suscettibili all'ossidazione e il loro assorbimento da parte del recettore LDL è ridotto (Berneis et al. 2002). Diverse metanalisi di studi epidemiologici osservazionali prospettici come il "Emerging Risk Factors

Collaboration” (ERFC) e allo stesso modo il “Prospective Studies collaboration”, hanno riportato un’associazione lineare continua tra i livelli plasmatici di LDL e il rischio di patologie cardiovascolari. Numerosi studi hanno dimostrato che l’abbassamento dei livelli di LDL con farmaci quali statine riduce il rischio di eventi coronarici maggiori e morte cardiaca (Downs et al 1988; Shepherd et al. 1955) (Tabella 6). I risultati di questi studi supportano la strategia “più basso è meglio” e sostengono un trattamento più precoce e abbassamento più aggressivo dei livelli di LDL per la prevenzione primaria di patologie cardiovascolari (Dean et al. 2009).

Studio	Paese	Periodo di osservazione	Riduzione del rischio cardiovascolare (%)		
			Trattamento con statine	Altre cause	Totale
Bjorck et al., 2009	Svizzera	1986-2002	6,2	39,5	45,7
Flores-Mateo et al., 2011	Spagna	1988-2005	5,6	31,1	36,7
Bandosz et al., 2012	Polonia	1991-2005	3,4	39	42,4
Hughes et al., 2013	Irlanda del Nord	1987-2007	8,7	25,8	34,5
Hotchkiss et al., 2014	Scozia	2000-2010	13,3	8,9	22,2

**Tabella 6: Studi che valutano la riduzione del rischio attribuibile nella mortalità per patologie cardiovascolari determinata dalle statine e da altri cambiamenti che incidono sul totale. (Fonte: Rishi et al. 2016.)**

## ***2.2 Meccanismi molecolari***

La normale funzione delle cellule endoteliali risulta fondamentale nel mantenimento dell'omeostasi del sistema vascolare. Negli ultimi anni numerosi studi hanno dimostrato che patologie come l'aterosclerosi sono manifestazioni della disfunzione endoteliale (Da Luz et al. 2018) (Figura 6).

L'aterosclerosi è una malattia comune in cui i depositi di grasso chiamati placche ateromatose compaiono negli strati interni delle arterie.

La placca aterosclerotiche può essere definita come una degenerazione delle pareti delle arterie a causa del deposito di materiale costituito principalmente da grasso e tessuto cicatriziale. In condizioni patologiche l'endotelio cambia le sue caratteristiche diventando così suscettibile al danno, promuovendo l'infiammazione e la trombosi.

Il processo di formazione e sviluppo delle placche aterosclerotiche è caratterizzato da differenti stadi:

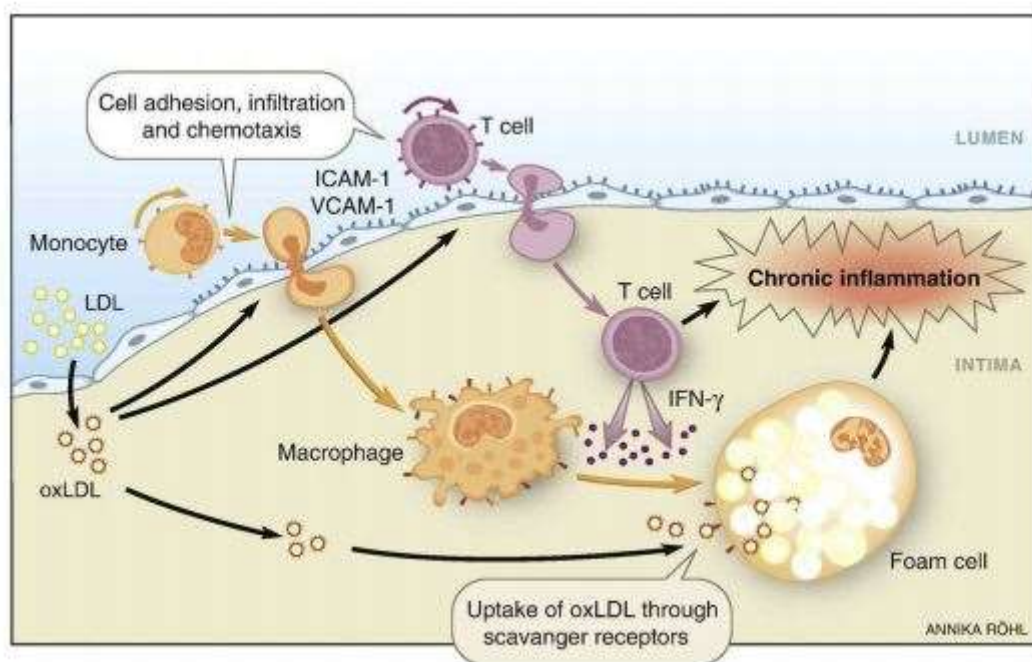
- Adesione, infiltrazione e deposito di particelle LDL nell'intima delle arterie: si ha la formazione della stria lipidica, principalmente connessa con l'eccesso di LDL e al difetto di HDL.
- Processo infiammatorio: è causato dall'intrappolamento e ossidazione dei lipidi, dall'esposizione di molecole di adesione sulla membrana cellulare (VCAM e ICAM) e dal rilascio di sostanze biologicamente attive e

chemiotattiche, come citochine o radicali liberi, che nel complesso facilitano il richiamo e infiltrazione di leucociti, con formazione dei monociti in macrofagi.

- Fagocitazione, da parte dei macrofagi, delle LDL ossidate: i macrofagi possiedono recettori Scavengers per la fagocitosi, tramite i quali legano le particelle LDL ossidate e modificate nella parete dei vasi trasformandosi in cellule schiumose (foam cells), caratteristiche delle strie lipidiche.
- Produzione di molecole pro infiammatorie, radicali liberi e enzimi proteolitici, come le metalloproteasi, che indebolendo la cappa fibrosa dell'ateroma ne favorisce l'ulcerazione.
- Migrazione e proliferazione delle cellule muscolari lisce, che migrando all'intima producono matrice extracellulare che funge da impalcatura dell'ateroma.
- Ispessimento della parete arteriosa, che risulta irreversibile.

La sintesi di citochine infiammatorie, inoltre, richiama cellule immunocompetenti quali linfociti T, monociti e plasmacellule che si moltiplicano nella lesione. Ne consegue che a causa della carenza di sostanze nutrizionali e all'ipossia, conseguenti all'accrescimento della lesione, le cellule muscolari lisce e macrofagi vadano incontro ad apoptosi, con formazione di depositi di calcio che implicano lo sviluppo di lesioni aterosclerotiche

complicate. Si ottiene così la formazione di una lesione con una grandezza variabile formata da un nucleo centrale lipidico circondato da un cappuccio fibroso connettivale, con presenza di noduli di calcio e cellule immunocompetenti.



**Figura 6: Inizio del processo aterosclerotico.** (Fonte: Andersson J. et al. 2010)

### **3) REMODELLING COMPOSIZIONALE DELLE LDL: EFFETTI FISIO-PATOLOGICI**

Se da un lato si è evidenziato come elevati livelli di LDL siano tra le cause principali dello sviluppo di patologie cardiovascolari, risulta dall'altro importante valutare gli aspetti qualitativi delle lipoproteine LDL coinvolte in queste patologie. Vi è un meccanismo a catena che collega queste differenze compositive alle differenze in qualità che predispongono all'aggregazione, all'iniziazione della placca, alla progressione e alla destabilizzazione (Maija et al. 2018).

Le modifiche a cui sono soggette le LDL inducono importanti alterazioni strutturali e mostrano un ruolo significativo nello sviluppo delle disfunzioni endoteliali (Paoletti et al. 2004) (Figura 7). Nel processo aterogeno, le lipoproteine vengono aggregate nell'intima arteriosa dove numerosi fattori risultano essere in grado di modificarne la struttura. Le LDL modificate dal punto di vista strutturale mostrano alterazioni delle loro funzioni e risultano maggiormente aterogeniche. Infatti, le LDL modificate mostrano una maggiore capacità di attivare il reclutamento dei monociti, di promuovere l'adesione dei monociti all'endotelio attraverso l'induzione dell'espressione di molecole di adesione, di fattori chemiotattici e di crescita da parte delle cellule endoteliali,

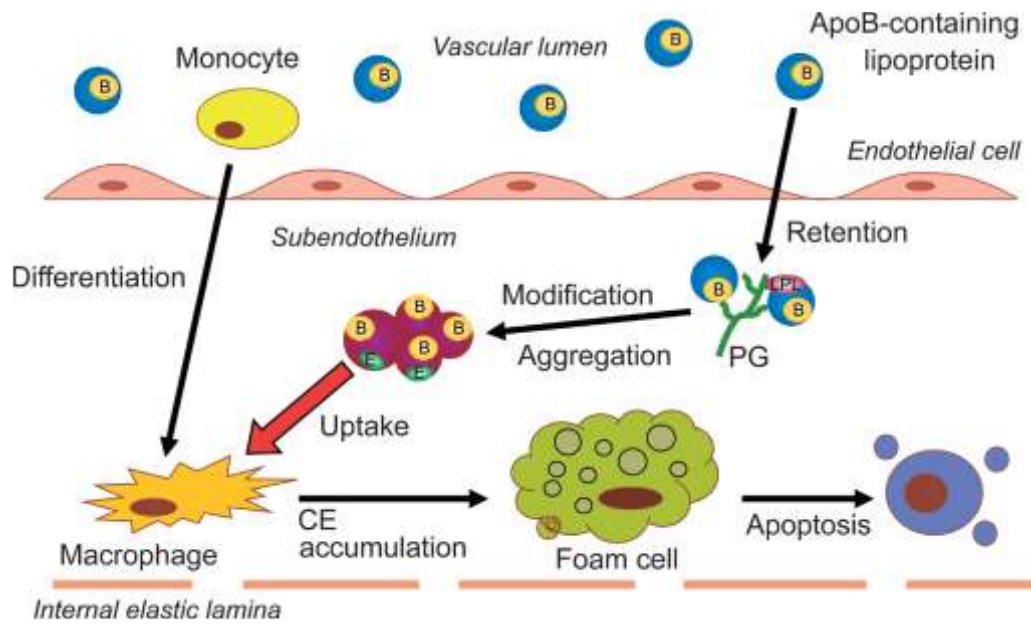


nonché di promuovere l'attivazione delle piastrine ponendo le basi della formazione della placca aterosclerotica (Gleissner et al. 2005).

Le LDL sono suscettibili a numerose alterazioni che possono essere di origine enzimatica e non enzimatica e che possono coinvolgere la componente lipidica o la componente apoproteica o entrambe (Tabella 7). Tra queste le modifiche maggiormente studiate sono: lipolisi (lipoprotein lipasi), aggregazione (sfingomielinasi e fosfolipasi), fusione (fosfolipasi), ossidazione, protolisi, glicazione, acetilazione, metilazione, omocisteinilazione, complessazione con proteoglicani, incorporazione in immuno complessi (Tabas et al. 2007; Öörni et al. 2000; Hevonoja et al. 2000)

<b>Principali modifiche a carico delle LDL</b>	<b>Target molecolare</b>
Modifiche chimiche	
Glicazione	Componente lipidica e proteica
Ossidazione	Componente lipidica e proteica
Metilazione	Componente proteica
Carbossilazione	Componente proteica
Acetilazione	Componente proteica
Omocisteinilazione	Componente lipidica e proteica
Modifiche enzimatiche	
Proteolisi (chimotripsina, tripsina)	componente proteica
Lipolisi (fosfolipasi e sfingomielinasi)	componente lipidica

**Tabella 7: Principali modifiche a carico delle LDL**



**Figura 7: Sviluppo dell'arteriosclerosi associato alle Lipoproteine modificate.** (Fonte: Morita S.Y. et al. 2016)

### ***3.1 Alterazioni strutturali e funzionali delle LDL ossidate***

L'ossidazione delle LDL è un processo mediato da radicali liberi, che implicano una serie di cambiamenti strutturali legati ad un evento iniziale che consiste nella perossidazione dei PUFA delle LDL.

Durante l'ossidazione si hanno cambiamenti anche nella componente proteica, con scissione ossidativa dell'apoB100 con conseguente frammentazione (Parthasarathy et al. 1989; Esterbauer et al. 1992).

Gli agenti ossidanti possono danneggiare le LDL tramite molteplici percorsi (Sourav et al. 2014). *In vitro* le LDL possono essere modificate ossidativamente in presenza di agenti fisici e chimici. La maggior parte degli studi sull'ossidazione sono stati condotti utilizzando come agenti ossidanti metalli quali ferro, rame e alluminio. Inoltre l'ossidazione può essere indotta incubando le lipoproteine con differenti tipi cellulari quali cellule endoteliali, della muscolatura liscia o monociti-macrofagi.

L'ossidazione delle LDL avviene *in vivo*. Infatti, numerosi studi hanno dimostrato un aumento dei livelli di LDL ossidate in patologie dismetaboliche (obesità, diabete), cronico-degenerative e neuro-degenerative (Alzheimer) (Gorska et al. 2003, Lee et al. 2014). *In vivo* i meccanismi fisiologici che portano all'ossidazione delle LDL sono molteplici e molti non ancora chiariti, tra di essi vi sono l'azione dell'anione superossido, che promuove l'ossidazione

dei lipidi delle LDL attraverso la mediazione con le cellule della muscolatura liscia e di fagociti (Heinecke et al. 1986) e la via che vede coinvolta la NADPH ossidasi legata alla membrana dei fagociti attivati.

Alcuni enzimi cellulari, come la mieloperossidasi dei fagociti attivati e la lipossigenasi prodotta dalle cellule endoteliali e macrofagi convertono gli acidi grassi polinsaturi in idroperossidi che ossidano le LDL (Parthasarathy et al. 1989). Altri agenti di rilievo per l'ossidazione delle LDL sono l'ossido nitrico e il perossinitrito prodotto da cellule endoteliali e macrofagi.

Tra le alterazioni composizionali e strutturali principali delle LDL ossidate riscontriamo: aumento della carica negativa delle LDL, probabilmente legato alla derivatizzazione di cariche positive dei gruppi amminici attraverso la formazione di una base di Schiff con aldeidi (Steinbrecher et al. 1987), aumento motilità elettroforetica, diminuzione dei gruppi amminici associati alle apoproteine, frammentazione delle apoproteine, diminuzione della fluorescenza del triptofano, incremento della densità, aumento della fluidità, diminuzione dell'ordine molecolare, aumento degli indici di perossidazione lipidica (Tabella 8).

<b>ALTERAZIONI COMPOSIZIONALI E STRUTTURALI</b>	<b>COMPONENTE COINVOLTA</b>
Aumento mobilità elettroforetica	Proteica
Diminuzione dei gruppi amminici associati alle apoproteine	Proteica
Diminuzione della fluorescenza del triptofano	Proteica
Frammentazione apoproteine	Proteica
Incremento della densità (small-dense LDL mostrano una maggiore suscettibilità alla ossidazione)	Lipidica
Aumento fluidità	Lipidica e Proteica
Diminuzione dell'ordine molecolare	Lipidica
Aumento degli indici di perossidazione lipidica come sostanze reattive all'acido tiobarbiturico (TBARS), dieni coniugati, idroperossidi	Lipidica

**Tabella 8: Alterazioni composizionali e strutturali delle LDL ossidate.**

<b>ALTERAZIONI FUNZIONALI</b>
Incremento uptake macrofagi
Incremento proprietà chemiotattiche nei confronti dei linfociti T
Effetto citotossico nei confronti di cellule in cultura
Inibizione della vasodilatazione indotta ossido nitrico
Stimolazione dei processi coagulativi
Stimolazione dell'attività piastrinica
Immunogenicità e possibile formazione di anticorpi
Maggiore suscettibilità all'aggregazione e precipitazione spontanea

**Tabella 9: Alterazioni funzionali delle LDL ossidate**

Le modifiche delle caratteristiche strutturali e composizionali si riflettono in alterazioni della loro struttura fisiologica (Tabella 9). Le LDL ossidate possono contribuire all'inizio e alla progressione del processo aterogenico (Steinberg et al. 1989). Esse possono indurre l'adesione dei leucociti all'endotelio e la secrezione della proteina 1 chemiotattica dei monociti e del fattore macrofagico che ne stimola la formazione di colonie (M-CSF) (Berliner et al. 1995), ciò promuove il reclutamento dei monociti nell'endotelio e la loro migrazione nello spazio subendoteliale dove il fattore M-CSF ne promuove la differenziazione in macrofagi tissutali. Le LDL modificate ossidativamente sono particelle pro-infiammatorie capaci di attivare citochine e promuovere l'adesione dei monociti (Berliner et al. 1996; Osterud et al. 2003). Si ritiene che la modifica ossidativa delle LDL svolga un ruolo critico nell'infiltrazione dei monociti e nella formazione di cellule schiumose cariche di lipidi presenti della lesione arteriosclerotica (Steinberg et al. 1989; Diaz et al. 1997). Inoltre le LDL ossidate sono state associate a cambiamenti nell'omeostasi delle cellule endoteliali attraverso la soppressione di importanti microRNA endoteliali (miRNA) (Leitinger 2005).

Le lipoproteine ossidate sono caratterizzate da citotossicità prevalentemente legata alla frazione lipidica con conseguente effetto aterogenico e potente

stimolazione della formazione di cellule espansive da parte dei macrofagi ed effetti procoagulanti (Timothy et al. 1993).

La modifica ossidativa dell'Apo B100 nelle cellule endoteliali promuove l'assorbimento delle LDL ossidate a parte del recettore scavengers CD-36 dei macrofagi causando una disfunzione endoteliale e di conseguenza l'insorgenza di placche arteriosclerotiche (Collot-Teixeira S. et al. 2007; Endemann G. et al. 1993). Inoltre induce la formazione di una serie di frammenti proteolitici dalla singola catena polipeptidica dell'ApoB-100 (Fong et al. 1987), che potrebbe essere sufficiente per interrompere la conformazione di questa proteina necessaria per il corretto orientamento dei residui responsabili dell'attività catalitica e ne altera il riconoscimento da parte del recettore LDL. Ne consegue che queste LDL ossidate vengano riconosciute dal recettore aspecifico scavenger presente nei macrofagi con formazione di cellule schiumose in seguito all'accumulo di colesterolo intracellulare.

È stato dimostrato che le LDL ossidate stimolano la formazione di anticorpi, e gli aggregati di immunocomplessi delle LDL sono facilmente internalizzati dai macrofagi per mezzo del recettore Fc (Gisinger et al. 1991).

Infine le LDL ossidate possono indurre alterare innumerevoli pathway di segnali cellulari che possono portare alla morte cellulare come il rilascio di ceramide, alterata omeostasi del calcio e attivazione di lipasi.



### ***3.2 Alterazioni strutturali e funzionali delle LDL glicate***

Un'elevata concentrazione di glucosio nel sangue costituisce un elevato fattore di rischio per lo sviluppo di patologie cardiovascolari e aterosclerotiche, con alterazioni a carico del tessuto vascolare e delle lipoproteine. In presenza di elevate concentrazioni di glucosio, interagisce con le principali macromolecole presenti sia nell'ambiente extra che intracellulare a seguito della reazione di Maillard. Questa reazione coinvolge i gruppi idrossilici del glucosio e i gruppi amminici dei residui di lisina delle proteine. La reazione di Maillard vede un'iniziale formazione di prodotti denominati Basi di Schiff i quali, a causa della loro estrema labilità, si riarrangiano formando prodotti con maggiore stabilità denominati composti di Amadori. Questi prodotti sono denominati "Early glycation products". In una seconda fase della reazione, una serie di riarrangiamenti porta alla formazione dei Prodotti di Glicazione Avanzata (AGEs). La glicazione delle LDL coinvolge sia la componente apoproteica (Bucala et al. 1995) che quella lipidica con conseguenti modifiche strutturali quali l'aumento di fluidità e la diminuzione dell'ordine molecolare (Ferretti et al. 2002) nonché composizionali con alterazioni della funzione svolta dalle LDL (Tabella 10).

<b>ALTERAZIONI COMPOSIZIONALI E STRUTTURALI</b>
Diminuzione della fluorescenza del triptofano
Aumento di fluidità
Diminuzione dell'ordine molecolare
Aumento degli indici di perossidazione lipidica come sostanze reattive all'acido tiobarbiturico (TBARS), dieni coniugati, idroperossidi

**Tabella 10: Alterazioni composizionali e strutturali LDL glicate.**

<b>ALTERAZIONI FUNZIONALI</b>
Incremento dell'uptake da parte dei macrofagi
Induzione della proliferazione delle cellule muscolari
Incremento delle proprietà chemiotattiche dei confronti dei monociti e linfociti T
Effetto citotossico nei confronti di cellule in cultura
Incremento formazione ossido nitrico da parte delle piastrine
Incremento della concentrazione di calcio intracellulare nelle piastrine
Maggiore suscettibilità all'ossidazione

**Tabella 11: Alterazioni funzionali LDL glicate**

In particolare essa interferisce con la clearance delle LDL, a causa della glicazione dei residui di lisina dell'Apo B100 nella regione di riconoscimento, si ha un'alterazione del riconoscimento delle LDL da parte del recettore delle LDL, ciò promuove una maggiore permanenza in circolo e facilita il riconoscimento da parte dei recettori Scavengers dei macrofagi promuovendo la formazione di cellule schiumose. La glicazione delle LDL, inoltre, promuove: la generazione di radicali liberi dell'ossigeno (ROS) con conseguente danno ossidativo alle componenti lipidiche e proteiche delle LDL e delle macromolecole vicine (Minhal et al. 2018); aumento del legame covalente di LDL nelle pareti dei vasi; aumento dell'aggregazione piastrinica e formazione di complessi immuni al LDL. La glicazione incrementa la percentuale di lipoproteine che vengono assorbite dalle cellule infiammatorie e diminuisce la percentuale assorbita dagli epatociti attraverso i recettori LDL classici (Veiraiah et al. 2005).

La glicazione delle LDL è una modifica che avviene *in vivo*. Infatti, numerosi studi hanno dimostrato un aumento dei livelli di LDL glicate nel diabete e altre in patologie dismetaboliche (Steinbrecher et al. 1984; Bucala et al. 1993; Klein et al. 1995; Howard et al. 1999; Alique et al. 2015).

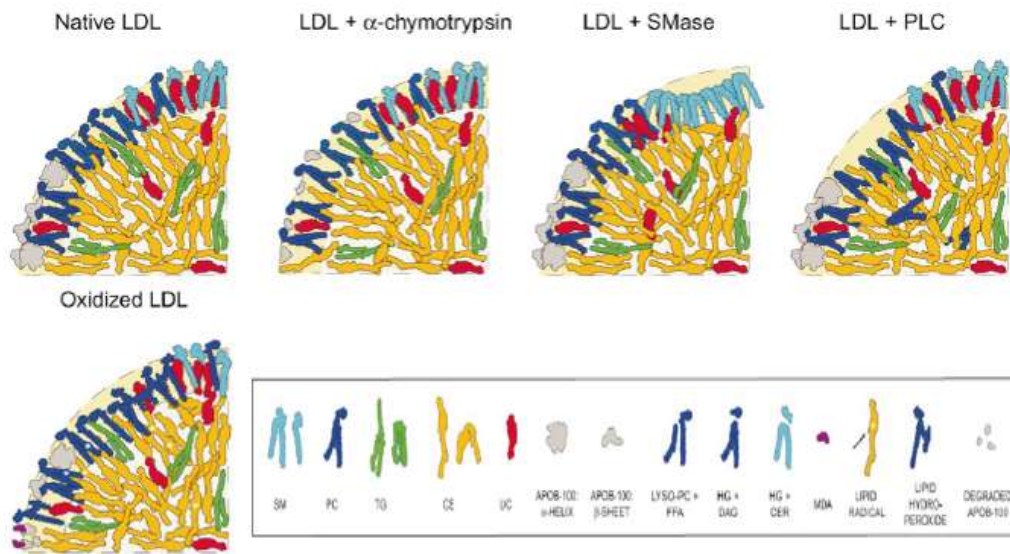
Tra i meccanismi molecolari che sono stati proposti per spiegare la maggiore aterogenicità delle LDL glicate vi è la relazione tra glicazione e ossidazione

delle LDL. La combinazione di glicazione ed ossidazione che coesistono in vivo è definita glicossidazione. Anche in assenza di Ossigeno o Ros, i radicali liberi si possono generare dal glucosio e dai prodotti di Amadori. Durante la glicazione si possono formare LDL ossidate, ma le LDL ossidate non sono necessariamente glicate (Imanaga et al. 2000) (Tabella 11).

### ***3.3 Modifiche enzimatiche***

Tra le modifiche principali legate all'attività enzimatica si hanno quelle indotte da enzimi proteolitici (tripsina o  $\alpha$  chimotripsina), che causano la frammentazione e/o la degradazione dell'Apo B 100 (Piha et al. 1995). Nello specifico, modifiche dell'Apo B100 distruggono l'abilità delle LDL di legare il recettore LDL (Avogaro et al. 1991). Inoltre si è evidenziato che, per la fusione delle particelle LDL, non è richiesta solo la frammentazione dell'Apo B100 ma anche la perdita dei suoi frammenti (Hevonoja et al. 2000).

La fosfolipasi C idrolizza le molecole di fosfatidilcolina, rilasciando diacilgliceroli e gruppi di fosforicolina. La formazione di diacilgliceroli, aumenta l'idrofobicità delle particelle LDL (Hevonoja. et al. 2000). Vengono, quindi, rilasciati i gruppi idrofilici mentre le molecole idrofobiche, quali i diacilgliceroli, sono accumulati nelle particelle. Questo comporta: un'instabilità della particella (Pollard et al. 1969), un aumento della torbidità (Suits et al 1989) e aggregazione e fusione delle particelle (Liu et al. 1993) (Figura 8).



**Figura 8: Illustrazione schematica dei principali aspetti strutturali delle particelle LDL modificate. (Fonte: Hevonoja et al. 2000)**

Le principali modifiche a carico della componente lipidica si hanno in seguito all'azione dell'enzima sfingomielinasi, il quale idrolizza la sfingomielina legata alla membrana delle lipoproteine, scindendo il suo gruppo principale, la fosforilcolina, ed esponendo la ceramide nel monostrato fosfolipidico sulla superficie delle LDL. La rilevanza fisiopatologica delle modifiche indotte all'enzima sfingomielinasi sulle LDL verrà descritta nel capitolo successivo.

## 4) LDL e SFINGOMIELINASI

### *4.1 Classificazione delle sfingomielinasi*

La sfingomielinasi appartiene alla classe delle idrolasi, enzimi che catalizzano l'idrolisi di un legame chimico.

È possibile classificare la sfingomielinasi in differenti categorie (Samet et al. 1999):

-Sfingomielinasi Acida: si tratta di una glicoproteina solubile, che presenta un pH ottimale intorno al 5 e risulta localizzata nei lisosomi (Goñi et al. 2002), con una distribuzione pressoché ubiquitaria nei tessuti dei mammiferi (Weinreb et al. 1968). L'espressione di un solo gene SMPD1 nelle cellule di mammifero, comporta la formazione di due varianti dell'enzima (lisosomiale e secretoria) che si differenziano per diverse caratteristiche. Le due forme di sfingomielinasi subiscono una glicosilazione differenziale nell'apparato del Golgi, che implicherà una differente suscettibilità all'endoglicosidasi H: la sfingomielinasi lisosomiale è altamente suscettibile alla sua azione mentre la sfingomielinasi secreta non ne viene influenzata. Entrambe sono sensibili alla peptide- N-glicosidasi F (PNGase F) (Schissel et al. 1998). La sfingomielinasi Acida non richiede ioni zinco ( $Zn^{2+}$ ) per l'attivazione ed è glicosilata principalmente con oligosaccaridi ad elevato contenuto di mannosio. L'assenza

della sfingomielinasi Acida è connessa con un disordine neurologico noto come sindrome Niemann-Pick.

- Sfingomielinasi Secretoria, essa deriva dal prodotto del gene della sfingomielinasi Acida, in seguito a un percorso differenziale di un precursore proteico comune, che modificato attraverso l'aggiunta di residui oligosaccardici ad elevato contenuto di mannosio, può essere trasferito nella via lisosomiale (sfingomielinasi Acida Lisosomiale) o al pathway secretorio del Golgi (sfingomielinasi Secretoria) (Schissel et al. 1998). Questo enzima che si trova nell'ambiente extracellulare, presenta un complesso modello di glicazione e ha un'emivita più lunga rispetto alla sfingomielinasi acida lisosomiale (Kornhuber et al. 2015). Viene attivato dalle concentrazioni fisiologiche di Zinco ( $Zn^{2+}$ ), ma ne esiste una forma indipendente (Schissel et al. 1998). La sfingomielinasi Secretoria presenta un ruolo nell'aterogenesi. Inoltre l'attività di questo enzima risulta elevata nei macrofagi umani e murini, nei fibroblasti della pelle umana e dalle cellule microgliali (Schissel et al. 1996). Inoltre risulta particolarmente elevata durante la differenziazione dei monociti a macrofagi. (Schissel et al. 1996).

- Sfingomielinasi Neutra dipendente dal Magnesio (nSMasi): proteina integrale di membrana nei mammiferi e solubile nei batteri. Delle diverse tipologie di sfingomielinasi Neutre identificate nei mammiferi, la sfingomielinasi 2- Neutra



sembra essere quella predominante nei sistemi cellulari, essendo implicata in numerosi processi fisiologici così come in numerose patologie, tra le quali infiammazione, Alzheimer e cancro (Shamseddine et al. 2014). L'enzima dei mammiferi ha un pH ottimale intorno al 7 e richiede concentrazioni millimolari di Magnesio ( $Mg^{2+}$ ). Questo enzima risulta ubiquitario nei tessuti dei mammiferi ma la sua più alta attività si riscontra nel cervello (Goñi et al. 2002). Essa risulta attivata, sia direttamente che indirettamente, da un'ampia gamma di molecole, tra cui le LDL ossidate e il fattore TNF- $\alpha$ , collegandola all'apoptosi e all'arteriosclerosi. Si ritiene che a causa della sua inibizione da parte del glutatione sia attivata dallo stress (Sawai et al. 1999). Una attività nSMasi è stata identificata nelle LDL, in particolare è stato dimostrato che questa attività è posseduta dall'Apoproteina Apo B100, la quale mostra una parziale omologia di sequenza con la sfingomielinasi batterica (Holopainen et al. 2000). Il ruolo fisiologico di questa attività, potrebbe essere connesso con l'ingresso delle LDL nelle cellule tramite endocitosi non mediata dal recettore.

- Sfingomielinasi Alcalina, è espressa nel tratto intestinale, è attivato dai sali biliari, risulta essere Magnesio dipendente e non è inibito dal glutatione. Il deficit di questo enzima potrebbe essere connesso alla carcinogenesi al colon (Nilsson et al. 1999).

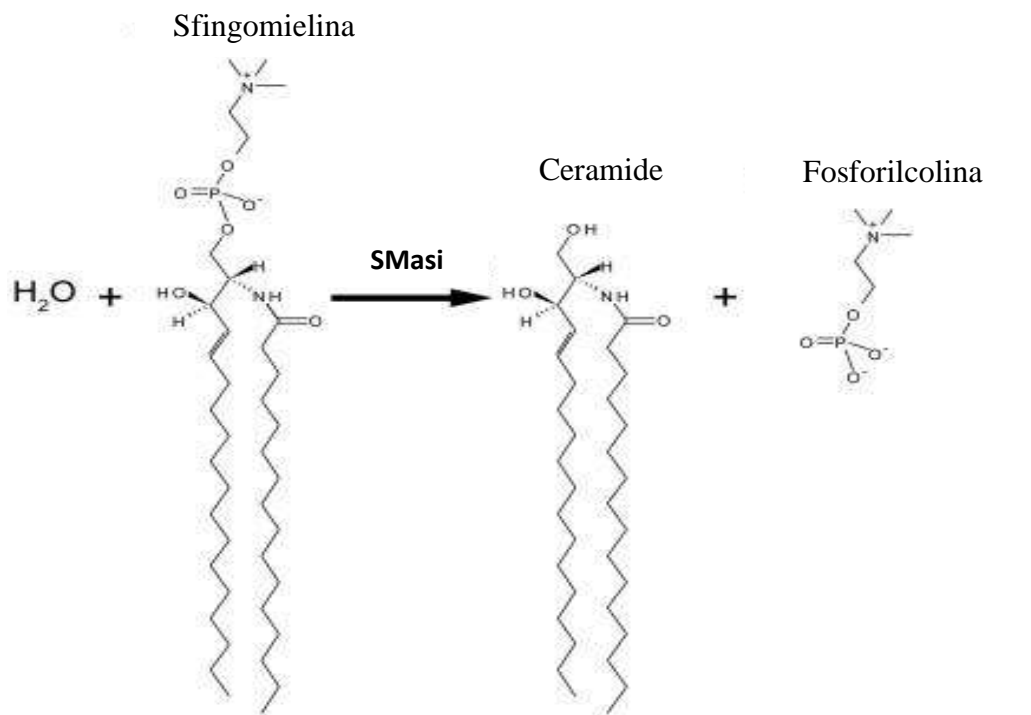
## ***4.2 Struttura della sfingomielinasi***

La maggior parte delle sfingomielinasi neutre condividono un nucleo catalitico di tipo DNasi I che suggerisce un meccanismo comune per l'idrolisi della sfingomielina (Clarke et al. 2006). Il sito attivo è caratterizzato da 8 residui di legame metallico che legano insieme ioni  $Mg^{2+}$  (Ago et al. 2006). Altri residui altamente conservati, si trovano vicino al sito attivo e sembrano essere importanti per l'attività catalitica. Tutte le sfingomielinasi neutre contengono un dominio idrofobico, che collega il dominio catalitico alla membrana e sembra svolgere numerose funzioni tra le quali, la localizzazione subcellulare e la regolazione dell'attività enzimatica.

La massa molecolare dell'enzima è di circa di 92 kDa, sebbene si trovino isoenzimi più piccoli, che possono derivare dalla proteolisi o dall'elaborazione alternativa di trascrizioni comuni. Ciascun delle tipologie di sfingomielinasi neutre differisce nella localizzazione, questo suggerisce che ciascun enzima di responsabile dell'idrolisi della sfingomielina in organelli specifici (Airolo et al. 2013).

### 4.3 Funzione

La sfingomielinasi svolge un ruolo centrale nel metabolismo degli sfingolipidi perché catalizza l'idrolisi della sfingomielina a ceramide e fosforilcolina (Figura 9).

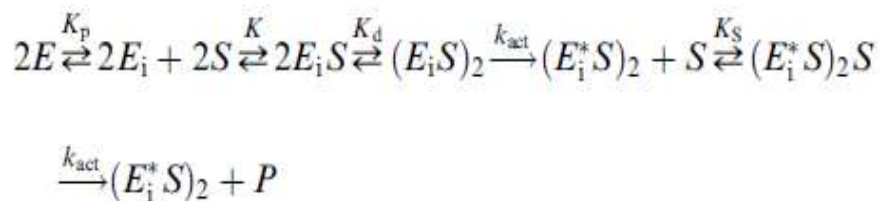


**Figura 9: Reazione della sfingomielinasi.**(Fonte: Jenkins R.W. et al. 2009)

Si possono definire tre fasi nell'attività enzimatica (Goñi et al. 2002):

- un periodo di latenza, nel quale il legame del substrato rappresenta una parte del complesso fenomeno che coinvolge l'adsorbimento superficiale e eventi precatalitici,
- un periodo di attività enzimatica allo stato stazionario con un tasso costante di degenerazione del substrato,
- un periodo in cui si ha una graduale interruzione della formazione del prodotto.

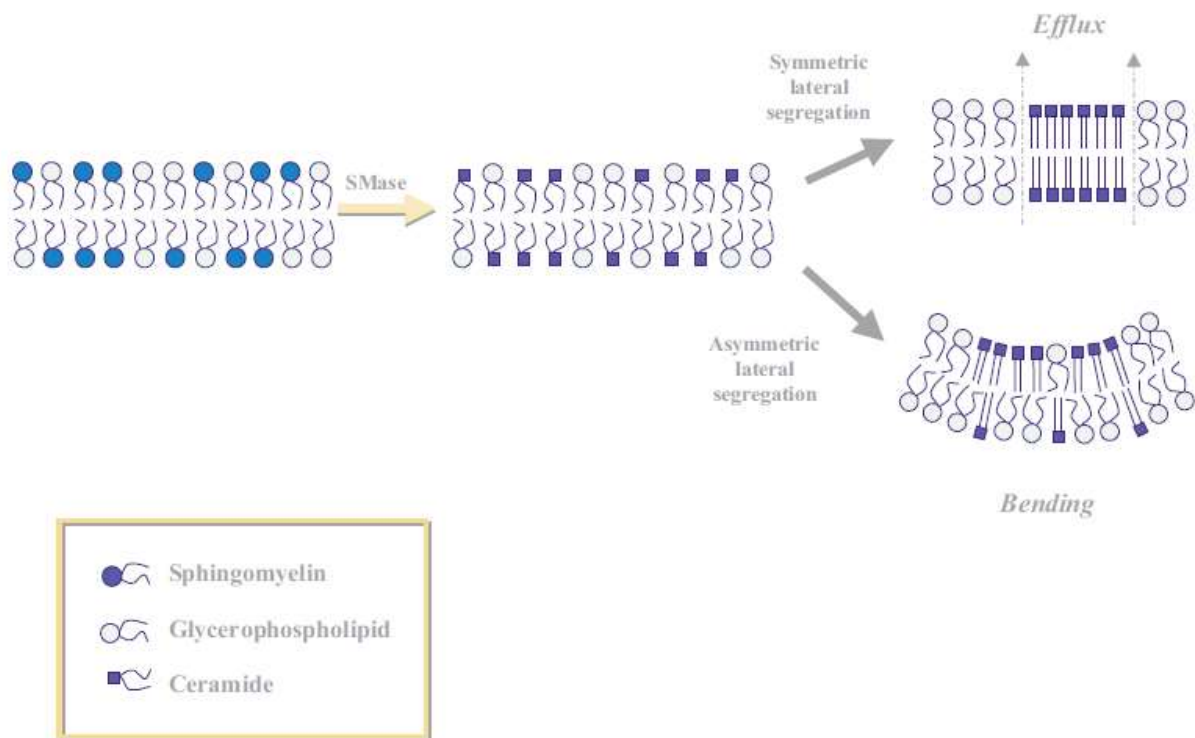
Analizzando da un punto di vista quantitativo la fase di attivazione della reazione della sfingomielinasi, lo schema cinetico trovato è il cosiddetto modello V (Fanani et al. 2000):



La ceramide può essere ulteriormente metabolizzata dalle ceramidasi in sfingosina, la quale fosforilata promuove la sopravvivenza cellulare (Oliviera et al. 1999). La ceramide e i prodotti correlati sono importanti molecole segnale, svolgendo un ruolo centrale in un'ampia varietà di processi molecolari

e cellulari (apoptosi, crescita cellulare e l'infiammazione) e in numerose malattie umane (Kornhuber et al. 2015).

La formazione di ceramide nel doppio strato della membrana cellulare induce un efflusso di vescicole o contenuto cellulare (Ruiz-Arguello et al. 1996). Nel processo di rimodellamento della membrana, che porta all'efflusso di soluti, sembrano essere importanti due proprietà della ceramide: la prima è la sua capacità di indurre una curvatura "negativa" del monostrato delle membrane cellulari (Kolesnick et al. 2000) (Figura 10) e la seconda è la tendenza a separarsi in domini arricchiti in ceramide (Holopainen et al. 1998), che rappresentano la regione dell'efflusso. La formazione di grandi domini arricchiti di ceramide comporta un raggruppamento di Recettori e molecole di segnalazione (Staneva et al. 2008). Il ruolo della Sfingomielinasi nella segnalazione cellulare è connesso con la sua capacità di rimodulare la membrana plasmatica, riorganizza e attiva le proteine di segnalazione all'interno dei microdomini di ceramide, aumentando o abbassando la soglia per la segnalazione a valle (Grassme et al. 2007).



**Figura 10: Rappresentazione schematica dell'effetto della sfingomielinasi sui doppi strati lipidici. (Fonte: Goñi M.F. et al. 2002)**

#### ***4.4 Sfingomielinasi in condizioni patologiche.***

L'aumento dell'attività della sfingomielinasi secretoria nel siero o nel plasma è un indicatore di un'ampia gamma di malattie, in particolare di infiammazioni dell'endotelio e del fegato (Kornhuber et al. 2015). Un'elevata attività dell'enzima, può essere il risultato di un maggiore rilascio indotto dalla stimolazione delle citochine o una maggiore attività enzimatica legata allo stress ossidativo. Diversi studi hanno dimostrato la correlazione tra l'attività della sfingomielinasi e la mortalità indotta da gravi malattie infiammatorie (Kornhuber et al. 2015). Un incremento dell'attività della sfingomielinasi, e di conseguenza della ceramide, è stato osservato nel siero di pazienti con linfocitopenia (Jenkins et al. 2010), nei pazienti con patologie cardiache (Pan et al. 2014) e in pazienti colpiti da stress post traumatico (Hammad et al. 2012).

L'enzima presenta un ruolo in numerose patologie, tra le quali:

- malattie da accumulo lisosomiale, come la malattia Niemann-Pick C, in cui i pazienti mostrano una marcata inibizione dell'attività della sfingomielinasi che avviene tramite meccanismi post traduzionali. Questa malattia è caratterizzata da mutazione di proteine (NPC1, NPC2) coinvolte nel traffico di colesterolo nel compartimento endolisosomiale, con conseguente accumulo di colesterolo non esterificato nei lisosomi (Kornhuber et al. 2015).

- diabete (insulino-resistenza dovuta all'incremento di ceramide), questo disturbo metabolico è strettamente connesso ai cambiamenti del metabolismo della ceramide. Lo stato diabetico implica un aumento dei livelli di ceramide plasmatici e renale conseguente a un aumento dell'attività della sfingomielina secretoria (Kobayashi et al. 2013).
- sviluppo di sepsi, cambiamenti composizionali e strutturali, indotti dalla formazione di domini di ceramide, in seguito all'idrolisi da parte della sfingomielinasi svolgono un ruolo chiave nell'internalizzazione microbica (Reithmuller et al. 2006). La sfingomielinasi è stata associata con infezioni di *Pseudomonas* e *Lysteria Monocytogenes*.
- anemia, a causa dell'aumento dell'attività della Sfingomielinasi, vi è un incremento del numero di eritrociti che espongono ceramide o fosfatidilserina sulla superficie ciò ne implica una rapida eliminazione, con conseguente sviluppo della patologia (Kornhuber et al. 2015).
- tumori, la sfingomielinasi risulterebbe essere sotto regolata contribuendo così a un ridotto contenuto di ceramide, implicando un aumento della proliferazione delle cellule e una diminuzione dell'apoptosi. Inoltre questa alterazione può svolgere un ruolo nella resistenza ai farmaci (Smith et al. 2008).



- patologie cardiovascolari, a causa di una accelerata aterosclerosi. Tra i meccanismi proposti vi è l'azione dell'enzima sulle LDL, come verrà descritto di seguito.

A causa dell'aumentata attività della Sfingomielinasi osservata in diverti stati patologici, essa può essere utilizzata come marker generale che riflette infiammazione, rilascio di citochine, stress ossidativo e danno endoteliale. Per quanto non possa essere utilizzato come biomarcatore per una singola patologia, monitorarne i livelli può essere utile per valutare la progressione della malattia, la gravità e l'efficacia dei trattamenti terapeutici (Kornhuber et al. 2015).

#### ***4.5 Interazione Sfingomielinasi-LDL e possibili sviluppi patologici***

Le LDL possono andare incontro a legame con la sfingomielinasi a livello delle pareti arteriose.

Come descritto nei capitoli precedenti, il cambiamento più rilevante nella struttura chimica dei lipidi, conseguente alla reazione di idrolisi da parte della sfingomielinasi, è la perdita del gruppo polare della fosforilcolina della sfingomielina; ne consegue che le molecole di ceramide più idrofobiche tendano a disporsi in modo da proteggersi dall'ambiente acquoso polare, causando aggregazione delle LDL (Walters et al. 2011).

Il meccanismo molecolare osservato in seguito al trattamento con sfingomielinasi è la formazione di domini arricchiti in ceramide, che risultano essere più compatti dei vari nanoambienti presenti delle particelle LDL native (Hevonoja et al. 2000); ciò è legato alle particolari caratteristiche del suo gruppo polare, contenente sia donatori che accettori di idrogeno, che presenta una spiccata tendenza alla segregazione laterale nelle membrane guidata dalla formazione di una rete di legami idrogeno intermolecolari (Holopainen et al. 2000). Inoltre, una serie di riarrangiamenti può rendere queste strutture altamente compatte (Swartzendruber et al. 1989). La ceramide costituisce nella forza trainante per l'aggregazione ed è stata evidenziata una chiara relazione

tra la sua concentrazione e le dimensioni dell'aggregato, che risultano maggiori al crescere della concentrazione di ceramide (Walters et al. 2008).

Le LDL trattenute nelle lesioni aterosclerotiche sono soggette all'azione di una SMasi presente nelle cellule endoteliali vascolari che risulta dipendente dalla concentrazione cationi  $Zn^{2+}$  e da citochine infiammatorie (IL-1 $\beta$  e IFN  $\gamma$ ) (Schissel et al. 1996; Marathe et al. 1998), suggerendo così un possibile ruolo per questo enzima nello sviluppo dell'aterosclerosi.

L'aggregazione delle LDL nelle pareti delle arterie rappresenta un punto critico nell'iniziazione della patologia (Ross 1993), essa infatti, migliora il legame delle lipoproteine alla matrice extracellulare arteriosa (Oörni et al. 2000) e le loro dimensioni rendono impossibile l'uscita dell'endotelio (Borén et al. 2016).

I cambiamenti indotti dall'azione della sfingomielinasi implicano alterazioni del packing lipidico con un incremento della fluidità di membrana (Rivas-Urbina et al. 2019) e alterazione della componente proteica delle lipoproteine con cambiamenti della struttura dell'Apo B100 legati a una drastica riduzione del suo contenuto di  $\alpha$  eliche, cambiamento strutturale fondamentale per l'aggregazione che può essere evidenziata con un decremento del segnale del triptofano (Nguyen et al. 2015).

L'infiammazione svolge un ruolo centrale nello sviluppo dell'arterosclerosi, e l'aumento della concentrazione della sfingomielinasi contribuisce alla

stimolazione dell'attività infiammatoria in questo processo patologico (Wong et al. 2000). Le LDL aggregate, a causa dell'azione della sfingomielinasi, possono innescare una significativa risposta delle Cellule T nei confronti dell'Apo B (Maija et al. 2018), questo meccanismo immunologico potrebbe accelerare la progressione dell'arterosclerosi e lo sviluppo dell'instabilità della placca (Ketelhuth et al. 2013).

Inoltre, il contatto di questi aggregati di LDL con le cellule endoteliali vascolari promuove la formazione catalitica di ceramide nelle cellule, scatenando non solo l'apoptosi ma anche un ulteriore accumulo di ceramide (Royer et al. 1971.). Questo schema risulterebbe compatibile con le elevate quantità di ceramide e sfingomielinasi rinvenute nelle placche aterosclerotiche (Schissel et al. 1996).

<b>Principali alterazioni indotte da SMasi</b>	<b>Studio condotto</b>
Aumento Aggregazione	Walters et al. 2008
	Ruuth et al. 2018
	Sneck et al. 2012
	Plithari et al. 2010
Aumento dimensioni degli aggregati	Walters et al. 2008
Riduzione fluidità di membrana	Rivas-Urbina et al. 2019
Riduzione fluorescenza del triptofano	Nguyen et al. 2015

**Tabella 12: Modifiche LDL e Sfingomileinasi.**

## **5) Materiali e Metodi**

I campioni di LDL utilizzati nei seguenti protocolli sono stati acquistati dall'azienda Prospec-Tany TechnoGene Ltd. (Israel). I reagenti inclusa sfingomielinasi, solfato di rame, metilgliossale, Hepes, PBS, EDTA, NaCl, xylenol orange, ammonio ferro solfato esaidrato e Ter-Butil Idroperossido (tBu-O-OH) sono stati acquisiti dall'azienda Sigma (USA). Il Laurdan è stato acquistato dalla Molecular Probe; il reattivo Bradford sono stati acquistati dall'azienda BioRad (USA) ed infine il kit Amplex Red dall'azienda Invitrogen (USA).

### ***5.1 Dosaggio delle proteine LDL***

Per la determinazione della concentrazione proteica delle LDL è stato utilizzato il metodo Bradford (Bradford 1976). Come standard di riferimento è stata utilizzata albumina del siero bovino (14.6  $\mu\text{g}$  /100 ml).

### ***5.2 Modifiche delle LDL indotte in vitro***

Le LDL (Prospec-Tany TechnoGene Ltd.) sono state sottoposte a vari trattamenti (ossidazione, glicazione e trattamenti enzimatici con sfingomielinasi) seguendo protocolli sperimentali in accordo con la letteratura.

I trattamenti sono descritti in dettaglio nei prossimi paragrafi.

### ***5.2.1 Glicazione in vitro delle LDL***

Per la glicazione è stato selezionato il metilgliosale (MG), un agente con azione glicante superiore a quella del glucosio (Mir et al. 2015). Le LDL (1 mg/ml) sono state incubate cinque giorni con metilgliosale (MG) 10 mM a 37 °C in tampone 0.01 M PBS e 2 mM EDTA. LDL di controllo, incubate in assenza di agenti glicanti, hanno seguito lo stesso periodo di incubazione. I campioni, in periodi differenti (24 ore e 6 giorni), sono stati prelevati per le successive analisi (valutazione della torbidità, fluorescenza degli Ages, ipercromicità, intensità triptofano, saggio Laurdan e saggio Amplex Red). Prima di eseguire ciascuna prova è stata effettuata una dialisi dei campioni in un apposito buffer (5mM Hepes, 150 mM NaCl, pH 7.4) per 24 ore a 4 °C al fine di eliminare l'eccesso di MG.

### ***5.2.2 Ossidazione in vitro delle LDL***

Le LDL (1 mg/ml) sono state ossidate mediante incubazione per 24 ore a 37°C con solfato di rame 5µM, poi dializzate in 5 mM Hepes +150 mM NaCl pH 7.4, per ulteriori 24 ore a 7 °C.

### ***5.2.3 Trattamento con Sfingomielinasi***

Le LDL non modificate, glicate e ossidate, sono state sottoposte al trattamento con la SMasi proveniente da *Bacillus cereus* in accordo con Nishiwaki et al.

(2004). Le LDL sono state incubate 24 ore a 37° C con concentrazioni differenti di SMasi (50 mU/mL e 100 mU/mL).



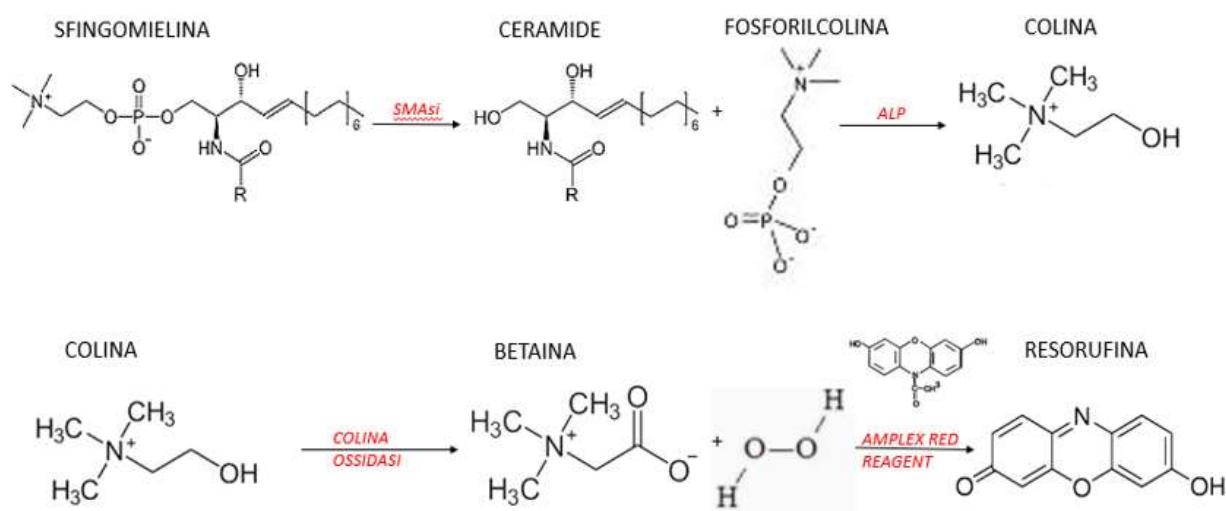
### **5.3 Saggi per valutare gli effetti delle modifiche in vitro**

#### **5.3.1 Dosaggio concentrazione ceramide contenuta nelle LDL**

Amplex red sphingomyelinase assay kit (Invitrogen) fornisce un metodo sensibile per la misurazione dell'attività della SMasi *in vitro*, usando un lettore di micropiastre in fluorescenza. Il kit è progettato per individuare livelli di SMasi, tuttavia, per gli scopi di questa tesi, il kit è stato utilizzato per valutare i livelli di fosforilcolina, che si trova in un rapporto 1:1 con la ceramide, nei campioni di LDL trattati nelle diverse condizioni sperimentali. Pertanto la procedura è stata modificata, sostituendo la sfingomieline, con i campioni di LDL da esaminare.

Il saggio utilizza il reagente Amplex Red (10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine), una sonda fluorescente sensibile all' $H_2O_2$ .

Come mostrato nella figura 11, la sfingomielinasi catalizza l'idrolisi della sfingomieline in ceramide e fosforilcolina. In seguito all'azione di una fosfatasi alcalina, la fosforilcolina è convertita in betaina e  $H_2O_2$ . Quest'ultima, in presenza di una perossidasi di rafano, reagisce con il reagente Amplex Red in una stechiometria 1:1 per generare un prodotto altamente fluorescente, resorufina.



**Figura 11: Meccanismo funzionamento Kit Amplex Red**

La resofurina presenta un assorbimento massimo approssimativamente a 571 nm, un'emissione fluorescente massima a 585 nm e una lunghezza d'onda di eccitazione a 571 nm. L'assorbimento e la fluorescenza sono pH dipendenti, per questo la reazione deve essere effettuata a un pH compreso fra 7-8.

In dettaglio la procedura ha previsto la preparazione della Working Solution di reagente Amplex Red 100µM contenente 2U/ml di Perossidasi di Rafano (HRP), 0.2 U/mL di Colina Ossidasi, 8U/mL di Fosfatasi Alcalina sono stati utilizzati:

- 100µL di reagente Amplex Red stock solution
- 100µL di HRP stock solution
- 100 µL di colina ossidasi stock solution

- 200  $\mu$ L di alcalina fosfatasi stock solution
- 8.5 mL di 1X Reaction Buffer

In ogni pozzetto sono stati posti 100  $\mu$ L di campione e 100  $\mu$ L di Working Solution.

Le LDL incluse in questo trattamento sono state diluite sino a raggiungere una concentrazione di 0,4 mg/ml, per i parametri di incubazione secondo letteratura (Walters et al. 2008). Sono stati utilizzati campioni modificati come sopra descritto e di controllo. Una parte dei campioni è stata direttamente inserita nel pozzetto, contemporaneamente all'enzima (50 mU/mL e 100 mU/mL), un'altra è stata precedentemente sottoposta a 24 ore di incubazione con sfingomielinasi (SMasi) a concentrazioni di 50 mU/mL e 100 mU/mL. Lo strumento è stato impostato per effettuare una lettura ogni 5 minuti per 3 ore, per rilevare la formazione del fluoroforo e costruire così una curva.

## 5.4 Proprietà chimico-fisiche delle LDL

### 5.4.1 Saggio Laurdan

Per la valutazione se i trattamenti delle LDL si riflettono in modificazioni delle proprietà chimico-fisiche delle LDL, è stata utilizzata la sonda fluorescente Laurdan (6-dodecanoil-2-dimetil-aminonaftalene). Questa molecola anfipatica, che si localizza sulla superficie delle LDL, può essere utilizzata per rilevare i cambiamenti nelle proprietà di fase della membrana grazie alla sua sensibilità delle sue proprietà spettroscopiche alla polarità dell'ambiente nel monostato delle LDL (Parasassi et al. 1986). La sonda è stata incorporata nelle LDL incubando 40µl di campione LDL (0.4 mg/ ml) con 4µl della sonda Laurdan (1µM) e 756 µL di 5 mM HEPES + 150 mM NaCl a pH 7.4 per 30 minuti a 37 °C, ottenendo una diluizione finale del campione 1:20.

Dagli spettri di emissione ottenuti, sono prese in esame le intensità a 440 nm e 490 nm. Le proprietà spettroscopiche della fluorescenza del Laurdan vengono descritte attraverso il parametro GP (Generalized Polarization)

(BiochimBiophys Acta. 2002) calcolato tramite l'equazione

$$GP = \frac{(I_{440} - I_{490})}{I_{440} + I_{490}}$$

Un alto valore di GP è associato ad una bassa fluidità di membrana e una bassa polarità dell'ambiente.

## **5.5 Effetto sulla componente proteica**

### ***5.5.1 Studio fluorescenza intrinseca Triptofano***

La fluorescenza intrinseca derivante dalla presenza di amminoacidi aromatici nella componente apoproteica (triptofano, tirosina) è ampiamente usata nello studio di proprietà strutturali di proteine in soluzione o in sistemi più complessi (membrane, lipoproteine). Pertanto è stata utilizzata per studiare aspetti strutturale nelle LDL di controllo e in quelle trattate. Sono stati analizzati gli spettri di emissione (exc = 295 nm), è noto che la posizione del massimo di emissione della fluorescenza del triptofano è sensibile all'idrofobicità dell'ambiente circostante (Ferretti et al. 1993). I campioni trattati hanno subito una diluizione 1:20 in tampone 5 mM Hepes + 150 Mm NaCl a pH 7.4. Gli spettri di emissione di ogni campione, sono stati registrati utilizzando una lunghezza d'onda di eccitazione di 280 nm (spettrofluorimetro Perkin Elmer LS 55) (Allarakha et al. 2015). Nei grafici ottenuti sono stati presi in considerazione la posizione del massimo di emissione e l'intensità.

### ***5.5.2 Valutazione della ipercromicità***

L'ipercromicità, riflette l'esposizione di residui amminoacidi aromatici derivati dall'unfolding e dalla frammentazione della componente proteica in seguito alla glicazione e in parte alla formazione di aggregati (Abidiet al. 2018). I campioni di LDL sono stati diluiti 1:20 in tampone 5 mM Hepes + 150 mM

NaCl pH 7.4. Il profilo di assorbimento ultravioletto dei campioni in analisi, è stato valutato in un intervallo di lunghezza d'onda da 200 a 400 nm tramite spettrofluorimetro Perkin Elmer LS 55 utilizzando cuvette di quarzo. L'ipercromicità di questi campioni è stata misurata determinando l'assorbimento a 282 nm.

### ***5.5.3 Studio della fluorescenza degli Ages***

La fluorescenza degli AGEs è stata analizzata sia sui campioni di controllo tramite lo spettrofluorimetro Perkin Elmer LS 55 che in quelli trattati per evidenziare una differenza nella formazione dei prodotti di glicazione avanzata. Questi composti, se eccitati a 340 nm emettono fluorescenza.

Il fluorimetro è stato settato come segue

	<b>Range di emissione (nm)</b>	<b>Eccitazione (nm)</b>
AGES totali	360-500	340

Gli spettri di emissione prodotti sono stati confrontati prendendo come parametro di riferimento l'intensità di emissione e il suo massimo.

## **5.6 Valutazione dello stato di ossidazione delle LDL**

### ***5.6.1 Saggio Dieni coniugati***

Le LDL (200 µg/ml) sono state incubate con 5 µM CuSO<sub>4</sub> e dove indicato è stata aggiunta sfingomielinasi a concentrazione di 100 mU/mL, prima dell'inizio dell'ossidazione. L'esperimento è stato effettuato con buffer 5 mM Hepes + 150 mM NaCl a pH 7.4. La formazione dei dieni coniugati è stata monitorata per 5 ore mediante la misurazione dell'assorbanza a 234 nm ad intervalli di 5 minuti.

### ***5.6.2 Valutazione idroperossidi lipidici***

Gli idroperossidi rappresentano un marker tardivo della perossidazione lipidica (LPO), e derivano dall'attività di idrogeno estrazione di un radicale perossilipidico (LOO•) a carico di acidi grassi adiacenti, con attività di propagazione della reazione radicalica. I livelli di idroperossidi nelle LDL incubate in assenza e in presenza di CuSO<sub>4</sub> sono stati determinati mediante ossidazione con ioni ferro in presenza di Xilenol orange (FOX Assay) (Jiang Z.Y. et al. 1992).

Un'aliquota di LDL (100 µg) viene aggiunta a 900 µl del reattivo FOX (250mM ammonio ferro solfato esaidrato, 100µM Xilenol orange, 25 mM acido solforico e 4 mM BHT in acido solforico e 90% metanolo v/v). Dopo un'incubazione di 30 minuti a temperatura ambiente, i campioni sono stati

centrifugati a 4500 rpm per 20 minuti e l'assorbanza del soprannatante è stata misurata a 560 nm. I livelli degli idroperossidi lipidici sono stati calcolati usando una soluzione standard a concentrazioni crescenti di Ter-Butil idroperossido (tBu-O-OH). I risultati sono stati espressi come  $\mu\text{mol}$  di idroperossidi lipidici per mg di LDL.

### **5.7 Valutazione dell'aggregazione delle LDL**

Per valutare se l'aggiunta di SMasi a concentrazioni differenti dell'enzima (50 mU/mL, 100 mU/mL), glicazione e ossidazione, inducessero un'aggregazione delle LDL è stato valutato il parametro di torbidità. La torbidità dei campioni è stata misurata determinando l'assorbanza a 450 nm allo spettrofotometro (Ahmed et al. 2018).

#### ***Statistica***

I dati sono espressi come media  $\pm$  deviazione standard. Le differenze tra i valori dei biomarkers sono state analizzate da un punto di vista statistico. Le differenze sono state considerate significative ad un valore di  $p < 0,05$  mediante Student's test.



## **6) RISULTATI E DISCUSSIONE**

### ***6.1 Effetto del trattamento con sfingomielinasi sulle LDL***

I campioni di LDL sono stati trattati con differenti concentrazioni di SMasi (50 mU/mL e 100mU/mL) e diversi tempi. Al termine dell'incubazione sono stati valutati gli effetti del trattamento sulle caratteristiche composizionali e sulle proprietà fisico-chimiche delle lipoproteine.

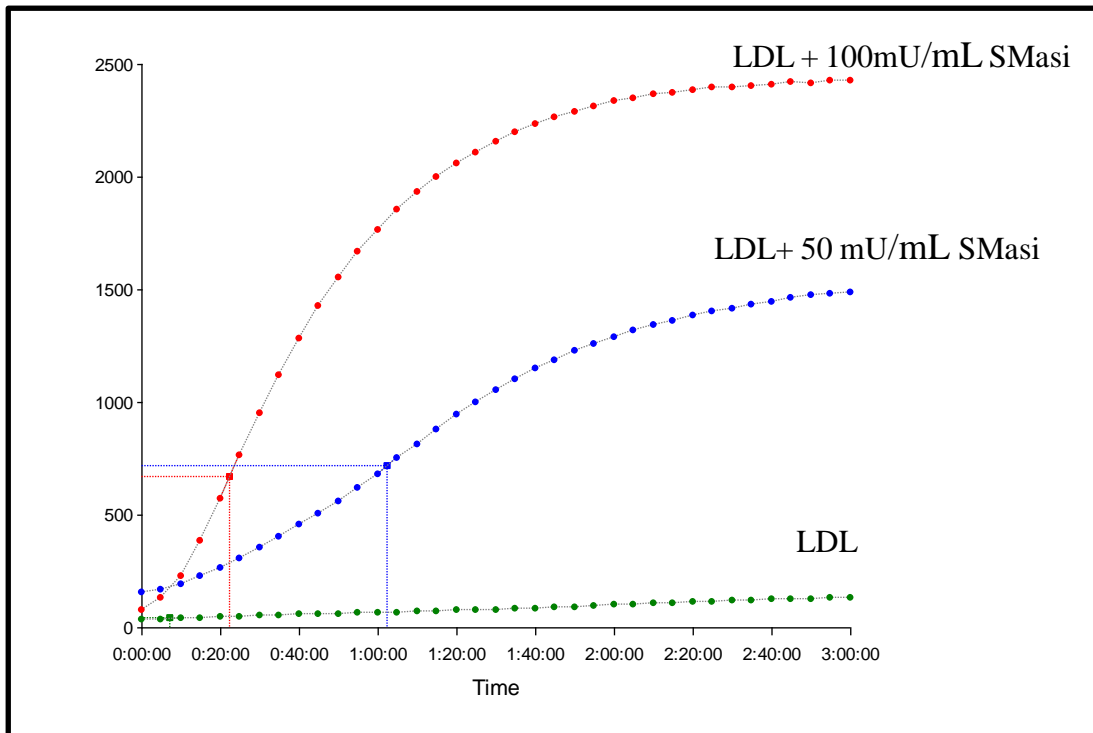
#### ***6.1.1 Livelli di ceramide delle LDL trattate con SMasi***

La formazione di ceramide sulle LDL a seguito dell'azione della sfingomielinasi sulle LDL, è stata monitorata mediante il saggio Amplex Red per 3 ore.

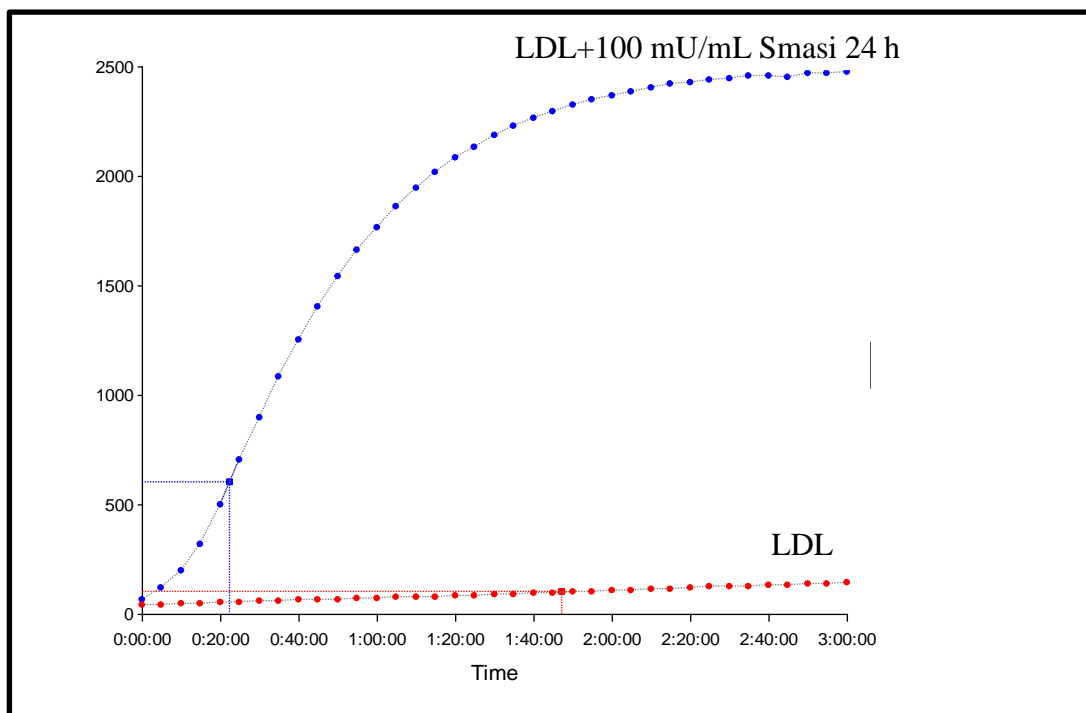
Nella figura 12 nessuna variazione dei livelli di ceramide si osserva nelle LDL incubate in assenza di enzima. Un significativo aumento dei livelli di ceramide si osservano nelle LDL incubate con crescenti concentrazioni di SMasi (50 e 100 mU/mL). Questi risultati confermano che la sfingomielinasi è in grado di idrolizzare la sfingomielina presente sulla superficie delle LDL con conseguente arricchimento di quest'ultime di ceramide. L'effetto è dipendente dalla concentrazione di enzima.

La formazione di ceramide, mediante Amplex Red, è stata valutata anche in LDL trattate con SMasi (100mU/mL) per 24 ore a 37°C. Come mostrato nella figura 13, nessuna modifica dei livelli di ceramide si osserva nelle LDL





**Figura 12: Formazione della ceramide nelle LDL trattate con SMasi (50 mU/mL e 100 mU/mL) mediante saggio Amplex Red.**

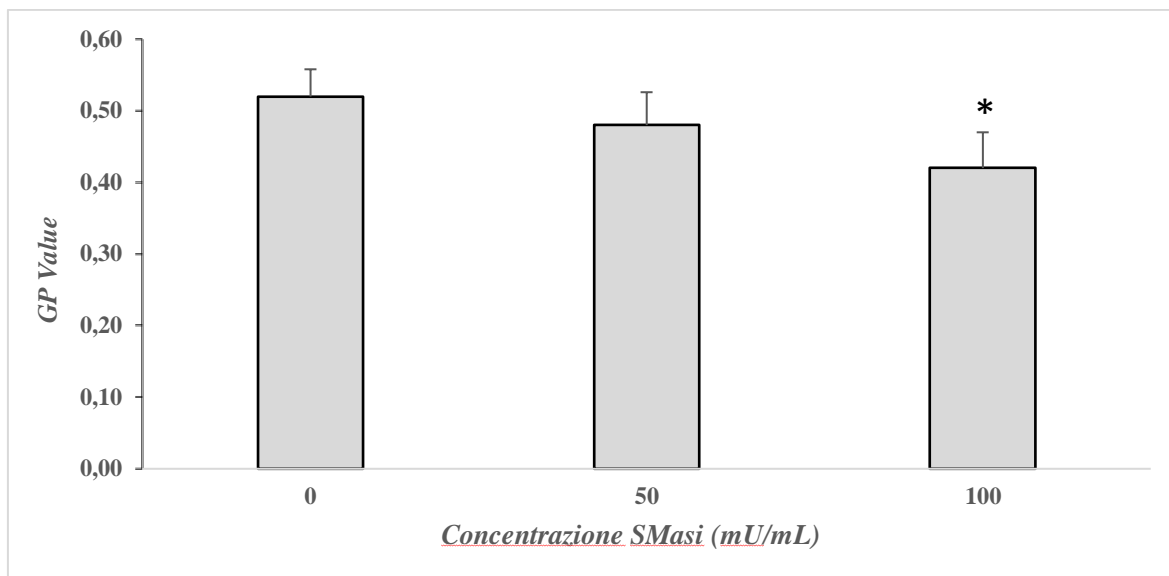


**Figura 13: Formazione della ceramide nelle LDL incubate per 24 ore a 37°C in assenza e presenza di SMasi (100 mU/mL).**

### ***6.1.2 Proprietà fisico-chimiche della componente lipidica delle LDL trattate con SMasi***

Le alterazioni della componente lipidica delle LDL indotta dal trattamento con SMasi sono confermate dallo studio degli spettri di emissione di fluorescenza della sonda Laurdan. La sonda si inserisce sulla superficie fosfolipidica delle LDL e la sua emissione di fluorescenza è sensibile alle modifiche delle proprietà fisico-chimiche dl micro-ambiente in cui si localizza (Parasassi et al.1986).

La valutazione dell'intensità a 440 nm e 490 nm dello spettro di emissione permette il calcolo del valore di polarizzazione generalizzata (GP). I risultati hanno evidenziato un decremento del valore di GP nei campioni di LDL incubati con SMasi, rispetto alle LDL non trattate con l'enzima. Tale variazione del valore di GP indica una maggiore fluidità e polarità del microambiente fosfolipidico in cui è incorporata la sonda, a seguito del trattamento con la SMasi. L'effetto è dipendente dalla concentrazione della SMasi ed è significativo a concentrazione maggiori di enzima (100mU/mL) (Figura 14).

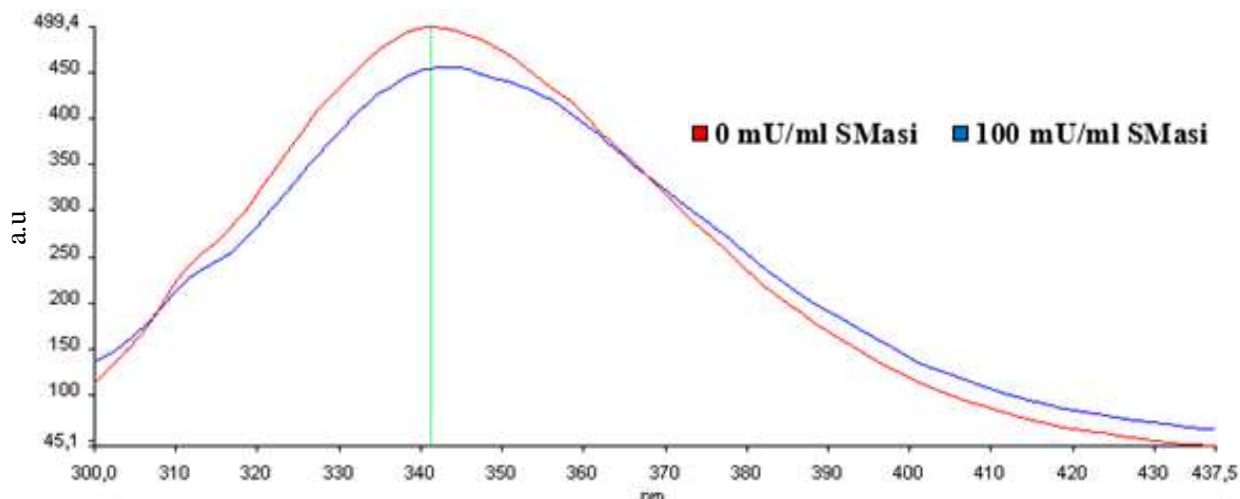


**Figura 14: Valore di GP relativo agli spettri di emissione della sonda Laurdan nei campioni di LDL incubati 24 ore a 37 °C in assenza e in presenza di SMasi (50 mU/mL e 100 mU/mL). \*  $p < 0.05$  vs LDL incubate in assenza di SMasi**

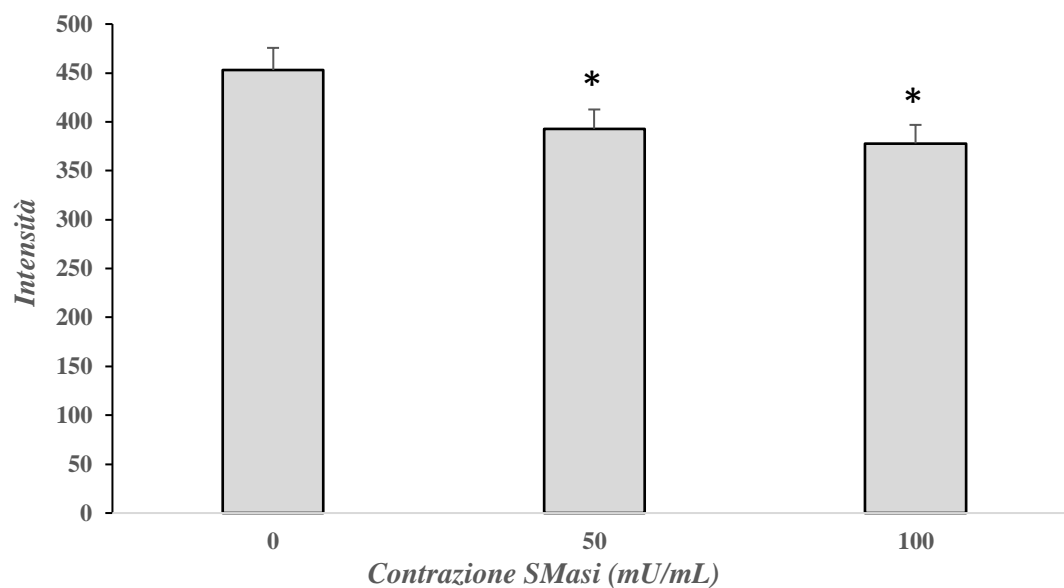
### ***6.1.3 Alterazioni conformazioni della componente apoproteica delle LDL trattate con SMasi***

Le alterazioni a carico della componente apoproteica delle LDL a seguito del trattamento con SMasi, sono state investigate grazie all'analisi degli spettri di emissione della fluorescenza intrinseca dei residui di triptofano (Trp) presenti sull'Apo B100 e alla valutazione dell'ipercromicità.

Come mostrato nella figura 15 il trattamento per 24 ore delle LDL con SMasi induce un decremento dell'intensità di emissione della fluorescenza intrinseca dei residui di Trp. Le modifiche dipendono dalla concentrazione di SMasi e sono significative a concentrazione di enzima maggiori (100mU/mL). Questi dati dimostrano che le modifiche della componente lipidica si riflettano in cambiamenti conformazionali dell'Apo-B associata alle LDL (Parasassi et al. 2001)(Figura 16).



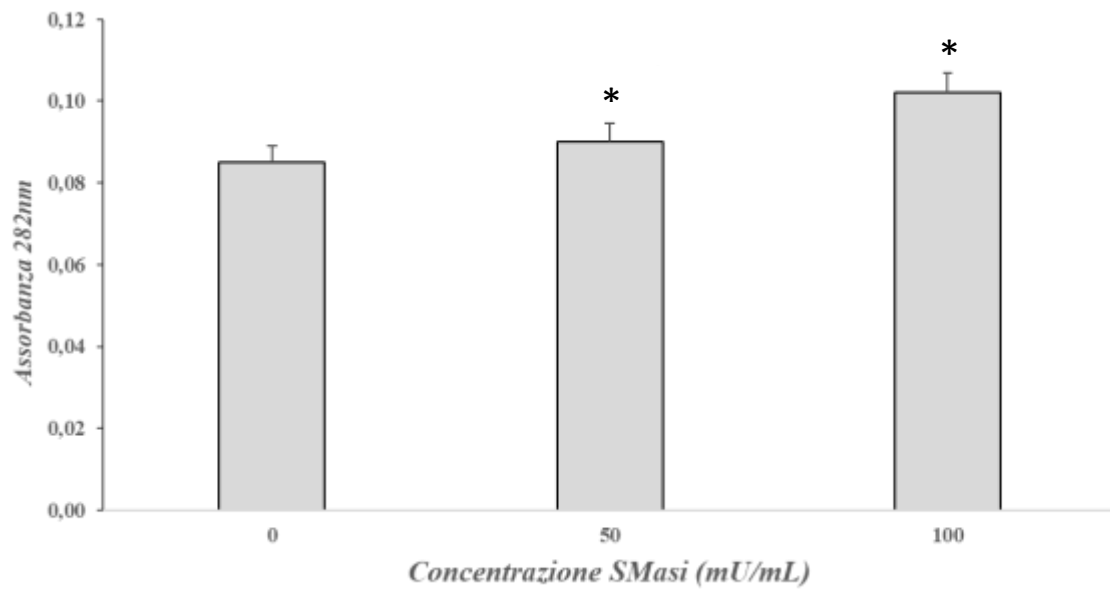
**Figura 15: Spettri di emissione di fluorescenza dei residui di triptofano in campioni incubati 24 ore a 37°C in assenza e in presenza di SMasi (100 mU/mL).**



**Figura 16: Intensità degli spettri di emissione di fluorescenza dei residui di triptofano in campioni di LDL incubati 24 ore a 37 °C in assenza e in presenza di SMasi (50 mU/mL e 100 mU/mL). \*:  $p < 0.05$  vs LDL incubate in assenza di SMasi**

Le modifiche della componente apoproteica delle LDL trattate con SMasi sono state indagate anche mediante la valutazione dell'ipercromicità (282nm). Come mostrato nella figura 17 nei campioni di LDL si osserva un incremento dell'assorbanza a 282nm a seguito del trattamento con SMasi. L'aumento è significativo (incremento percentuale del 16.7%) a concentrazioni maggiori di enzima (100mU/mL) e suggerisce una maggiore esposizione di residui amminoacidici aromatici dell'ApoB100 e formazione di aggregati (Abidi et al. 2018).

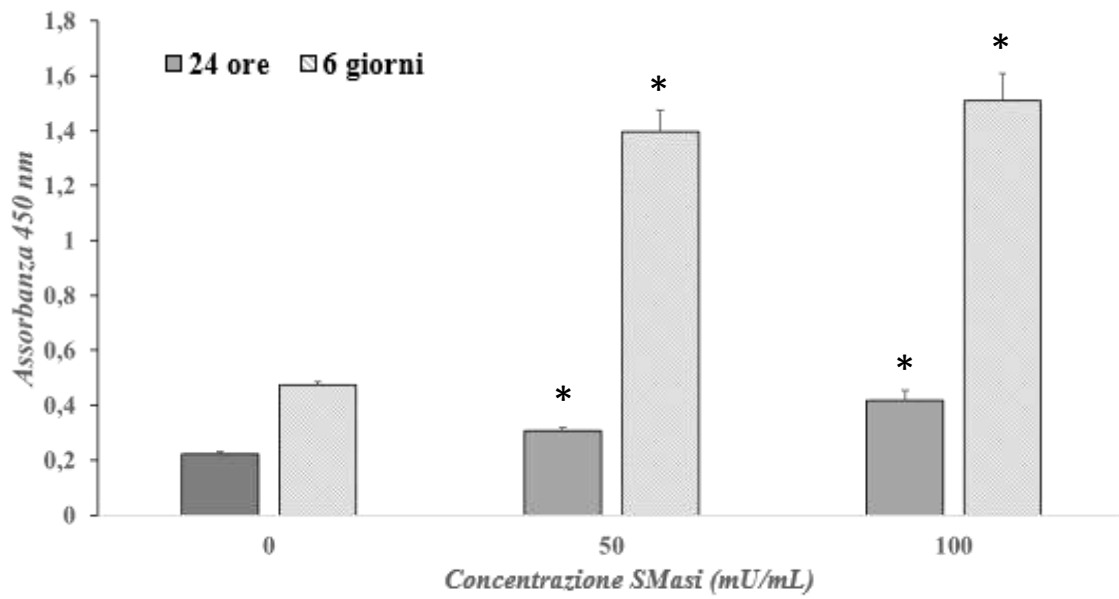




**Figura 17: Ipercromicità nelle LDL incubate 24 ore a 37 °C in assenza e in presenza di SMasi (50 mU/mL e 100 mU/mL) \*:  $p < 0.05$  vs LDL incubate in assenza di SMasi.**

#### ***6.1.4 Aggregazione delle LDL trattate con SMasi***

Un significativo aumento della torbidità si è osservato nei campioni di LDL incubati con SMasi (50 e 100 mU/mL) rispetto ai campioni incubati in assenza di enzima (Figura 18). Questi dati suggeriscono che le LDL trattate con SMasi, tendono ad aggregarsi più facilmente. Come mostrato nella figura 18 l'effetto è dipendente dalla concentrazione di enzima e dal tempo di incubazione (0-6 giorni). L'aumento della torbidità in funzione del tempo, suggerisce che, sebbene la reazione dell'enzima si concluda in pochi minuti, il processo di formazione di domini ricchi di ceramide, che mediano il processo di aggregazione, sia un processo più lento e graduale (Holopainen et al. 1998).



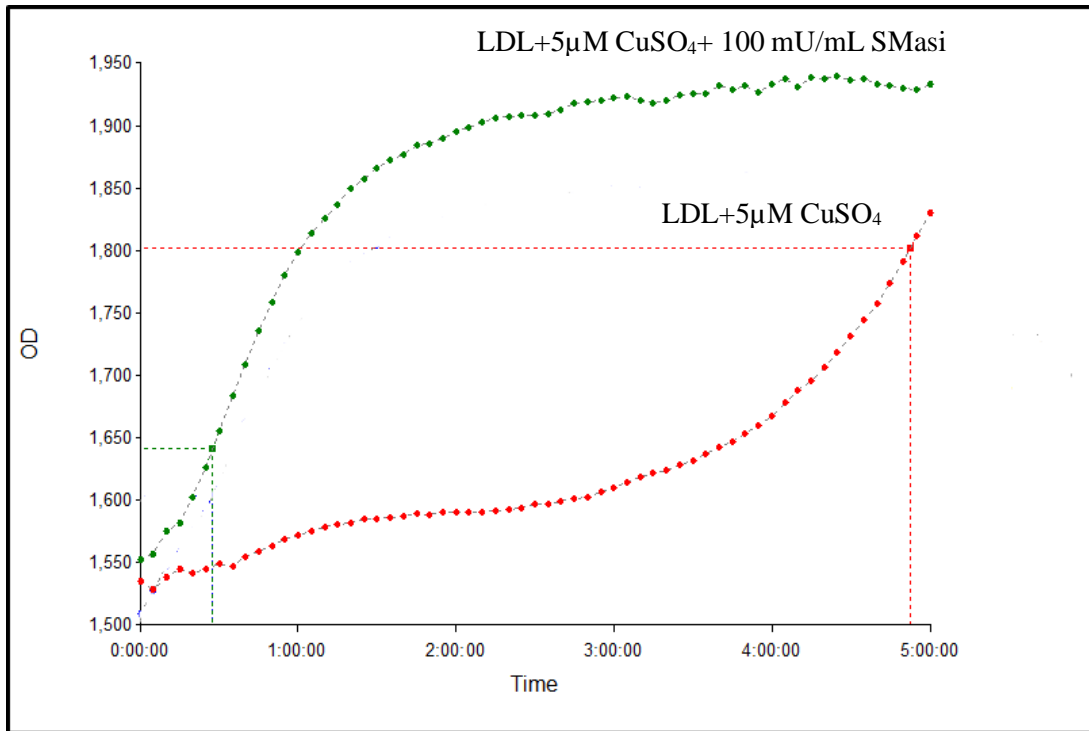
**Figura 18: Torbidità dei campioni di LDL trattati in assenza e in presenza di SMasi (50 mU/mL e 100mU/mL) a tempi di incubazione differenti.**

\*:  $p < 0.05$  vs LDL incubate in assenza di SMasi

### ***6.1.5 Suscettibilità alla ossidazione indotta in vitro delle LDL trattate con SMasi***

Al fine di studiare l'effetto trattamento con SMasi sulla suscettibilità delle LDL all'ossidazione, le LDL (200 $\mu$ g/mL) sono state incubate con CuSO<sub>4</sub> (5 $\mu$ M), come agente ossidante, in presenza e in assenza di enzima (100 mU/mL). L'ossidazione è stata seguita monitorando la cinetica di formazione dei dieni coniugati, uno dei markers precoci di perossidazione lipidica delle lipoproteine. Come mostrato nella figura 19, la cinetica di ossidazione delle LDL incubate con rame (5 $\mu$ M) mostra il classico andamento descritto in letteratura (Papasani et al. 1999); con una fase di latenza (30 minuti) seguita da un rapido aumento della formazione dei dieni coniugati fino a raggiungere un valore massimo costante.

Le LDL incubate con rame in presenza di SMasi, mostrano una significativa riduzione della fase di latenza (Figura 19) indicando che la presenza della SMasi aumenta la sensibilità all'ossidazione delle lipoproteine.



**Figura 19: Formazione dei dieni coniugati in ox-LDL trattate con SMasi.**

## **6.2 Effetto del trattamento con sfingomielinasi sulle LDL glicate e ossidate *in vitro***

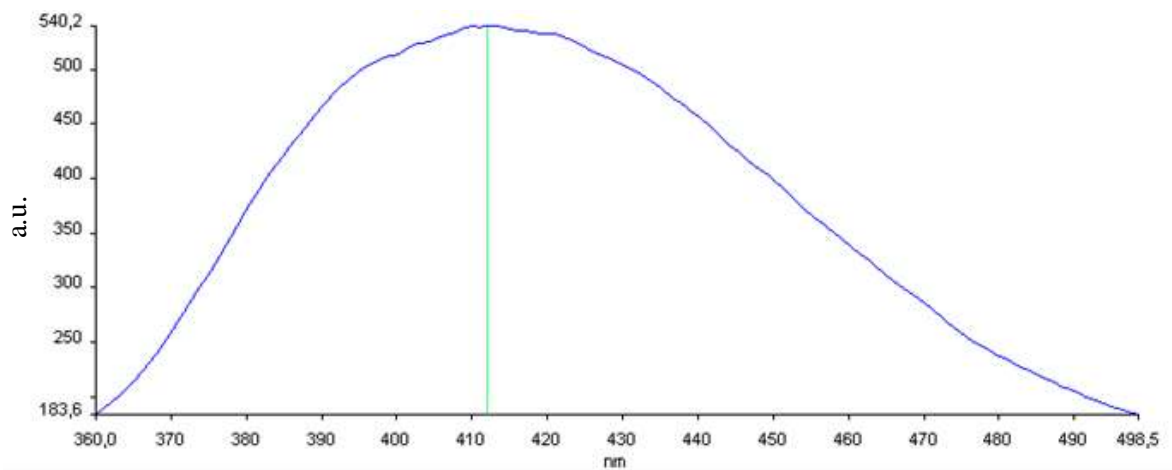
Come descritto nella parte introduttiva della tesi, le LDL in circolo sono sensibili a diverse modifiche composizionali, tra queste l'ossidazione e la glicazione sono le maggiormente studiate per la loro rilevanza fisio-patologica. Pertanto, al fine di investigare se queste modifiche delle LDL possono influenzare la suscettibilità delle lipoproteine all'azione della SMasi, LDL ossidate (ox-LDL) e glicate (gly-LDL) *in vitro* sono state trattate con l'enzima nelle nostre condizioni sperimentali.

L'ossidazione delle LDL (ox-LDL) è stata indotta *in vitro* mediante incubazione (24 ore) con 5 $\mu$ M CuSO<sub>4</sub>. L'ossidazione è stata confermata da un significativo aumento dei livelli di idroperossidi lipidici valutati attraverso il saggio Fox nelle ox-LDL rispetto alle LDL incubate in assenza di solfato di rame (LDL) (LDL: 1.09 $\pm$ 0.3 $\mu$ M, ox-LDL: 2.11 $\pm$ 0.2 $\mu$ M, p<0,05).

La glicazione delle LDL (gly-LDL) è stata indotta *in vitro* mediante incubazione con metilgliosale (MG 10 mM) per 5 giorni. Come mostrato nella figura 20 i campioni incubati con MG mostrano un significativo aumento della fluorescenza intrinseca valutata a 340 nm, conseguente la formazione di composti di glicazione avanzata (AGEs) fluorescenti, rispetto alle LDL incubate in assenza di MG (LDL:180 $\pm$ 9 a.u, gly-LDL:500 $\pm$ 24 a.u).

Questi dati confermano che il trattamento con MG induce la glicazione non enzimatica delle LDL, nelle nostre condizioni sperimentali.

Sia le ox-LDL sia le gly-LDL sono state trattate con SMasi (100mU/mL) per 24 ore e le alterazioni della componente lipidica e apoproteica sono state confrontate a quelle indotte dal SMasi nelle LDL non trattate (C-LDL).



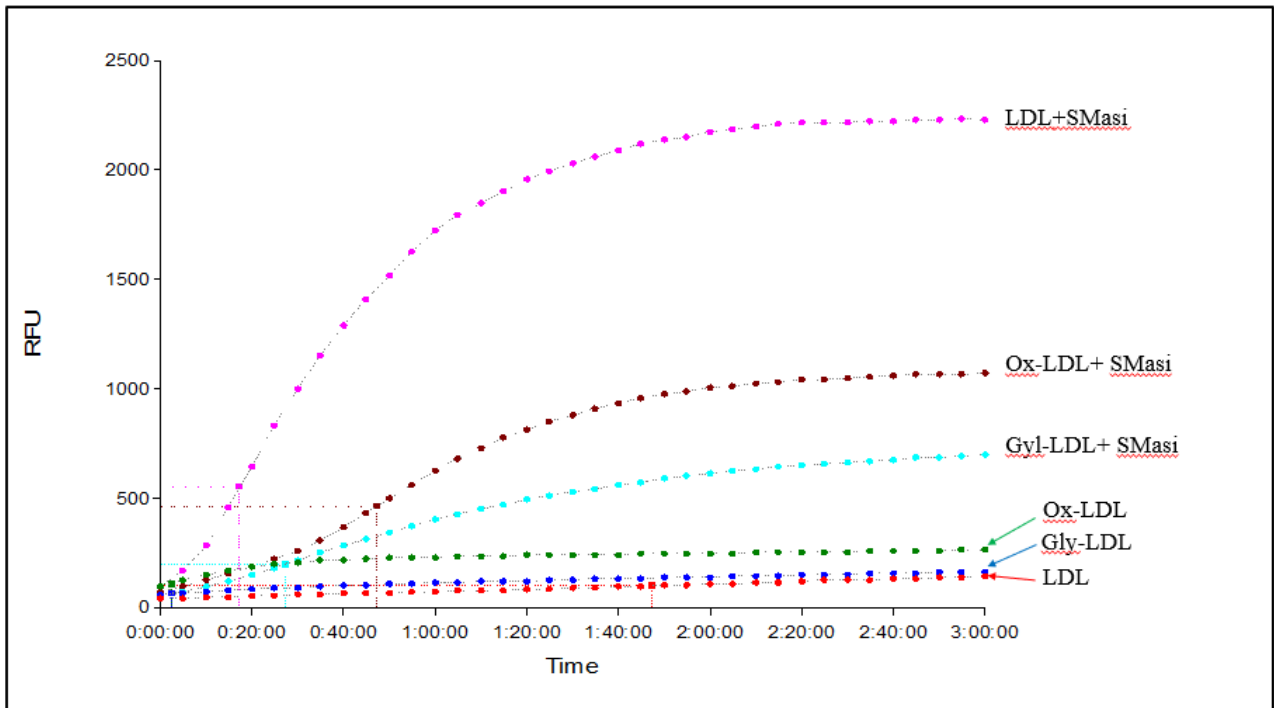
**Figura 20: Spettro d'emissione della fluorescenza intrinseca conseguente alla formazione di AGEs in LDL incubate con MG (10 mM).**

### ***6.2.1 Formazione di ceramide nelle ox-LDL e Gly-LDL trattate con SMasi***

Lo studio dei livelli di ceramide mediante Amplex-Red, non ha evidenziato differenze nelle ox-LDL, gly-LDL rispetto alle LDL non trattate (c-LDL), questi dati indicano che la glicazione e l'ossidazione non attivano l'enzima SMasi endogeno delle LDL.

Nella figura 21, è mostrata la formazione di ceramide nelle c-LDL, ox-LDL e gly-LDL trattate con SMasi (100mU/mL) per 24 ore. Dal confronto delle cinetiche ottenute mediante il saggio Amplex-Red emergono delle differenze. Le ox-LDL e gly-LDL a seguito del trattamento con SMasi, mostrano minori livelli di ceramide rispetto alle c-LDL. Questi risultati suggeriscono un minore effetto dell'enzima Smasi sulle LDL ossidate e glicate e una minore accessibilità della sfingomielina all'enzima.



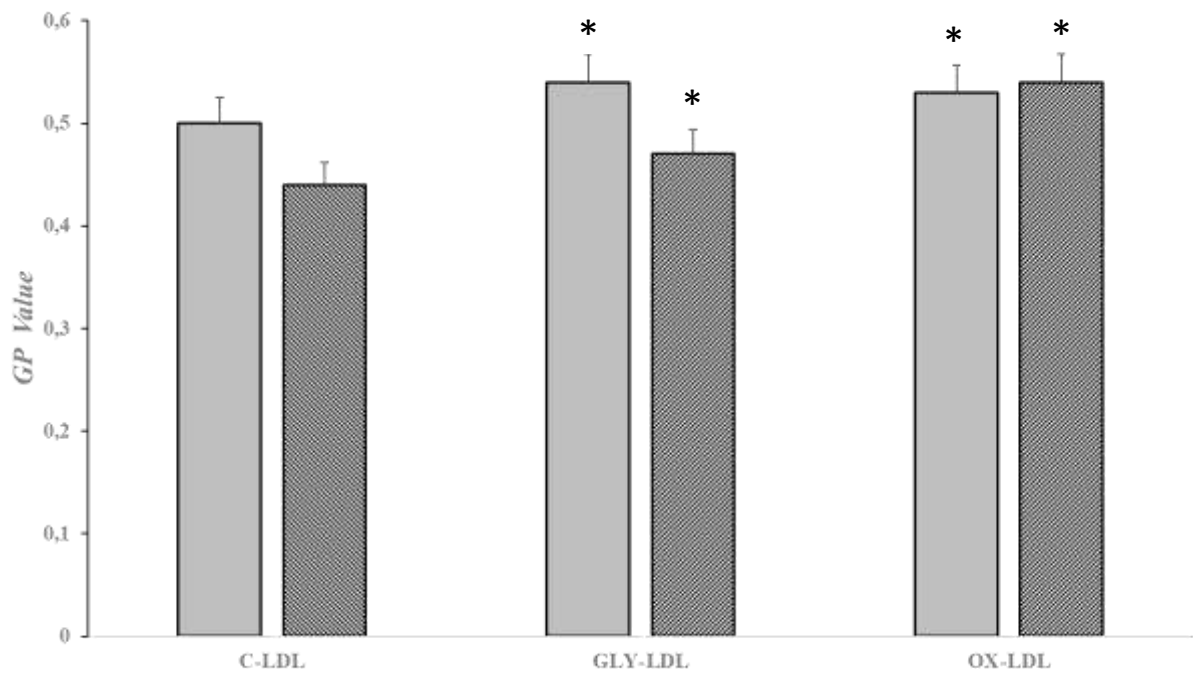


**Figura 21: Formazione della ceramide nelle c-LDL, ox-LDL, gly-LDL incubate in assenza (.) e in presenza di SMasi (100 mU/mL).**

### ***6.2.2 Proprietà chimico-fisiche della componente lipidica delle ox-LDL e gly-LDL trattate con SMasi***

Lo studio degli spettri di emissione della fluorescenza della sonda Laurdan incorporata nelle gly-LDL e nelle ox-LDL evidenziano modifiche delle proprietà fisico-chimiche della superficie fosfolipidica rispetto alle c-LDL. In particolare, si osserva un aumento dei valori di GP nelle gly-LDL e nelle ox-LDL, indicando minore fluidità e polarità nel microambiente lipidico circostante la sonda.

Come mostrato nella figura 22, le gly-LDL trattate con SMasi mostrano una significativa diminuzione del valore di GP. Simili valori di GP si osservano nelle gly-LDL e nelle c-LDL trattate con l'enzima. Nessuna modifica si osserva nelle ox-LDL a seguito del trattamento con la SMasi.

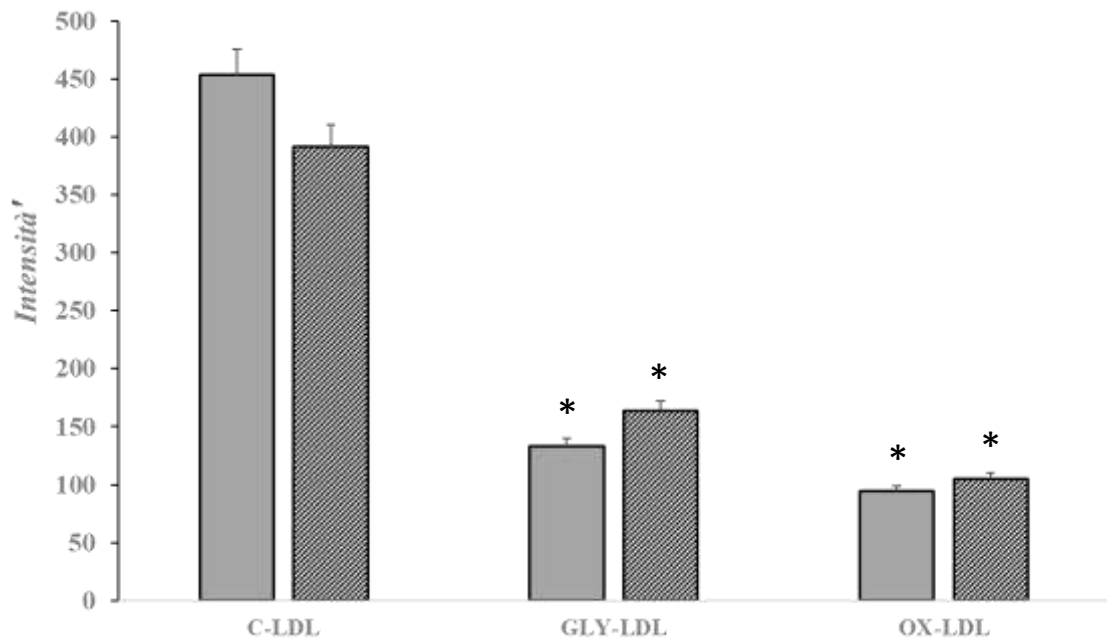


**Figura 22: Valore di GP relativo agli spettri di emissione della sonda Laurdan incorporata nelle c-LDL, ox-LDL e gly-LDL incubate in assenza (.) o in presenza di SMasi (100mU/mL). □ 0 mU/ml SMasi ▨ 100 mU/ml SMasi**  
 \*:  $p < 0.05$  vs C-LDL

### ***6.2.3 Alterazioni della componente proteica nelle ox-LDL e gly-LDL trattate con SMasi***

L'analisi degli spettri di fluorescenza dei residui di triptofano dell'Apo B100, ha evidenziato una diminuzione dell'intensità di emissione nelle gly-LDL e nelle ox-LDL (Figura 23), rispetto alle c-LDL. Questi dati suggeriscono alterazioni dell'ApoB100 a seguito dell'ossidazione e della glicazione delle LDL, in accordo con la letteratura (Ferretti et al. 2004).

Il trattamento con SMasi nelle gly-LDL e nelle ox-LDL non induce significative modifiche, suggerendo che il trattamento con l'enzima non è associato ad ulteriori alterazioni della componente proteica delle LDL. I valori di emissione nelle ox-LDL e gly-LDL trattate con SMasi sono, tuttavia, significativamente minori rispetto a quelli osservati nelle c-LDL trattate con l'enzima.



**Figura 23: Intensità di emissione degli spettri di fluorescenza dei residui di triptofano in c-LDL, ox-LDL e gly-LDL incubate in assenza ( . ) o in presenza di SMasi (100mU/mL). ■ 0 mU/ml SMasi ▨ 100 mU/ml SMasi**

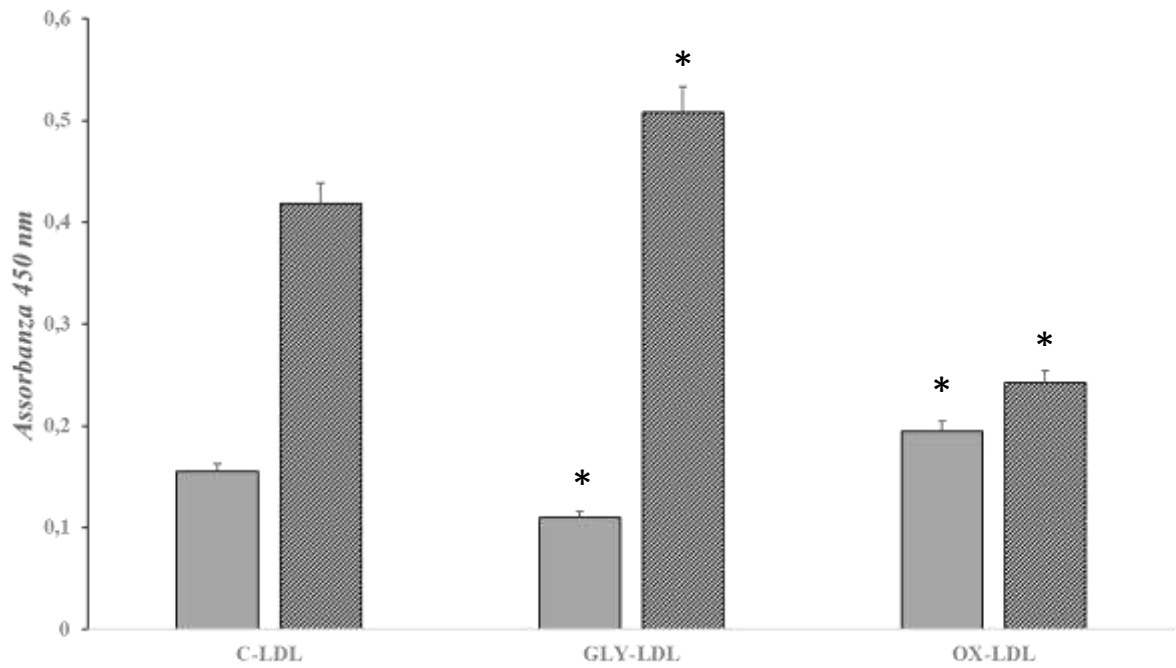
\*:  $p < 0.05$  vs c- LDL

#### ***6.2.4 Aggregazione nelle ox-LDL e gly-LDL trattate con SMasi***

Come mostrato nella figura 24 le ox-LDL e le gly-LDL non mostrano differenze nella torbidità rispetto alle c-LDL, indicando che l'ossidazione e la glicazione non inducono l'aggregazione delle LDL, nelle nostre condizioni sperimentali.

Il trattamento con SMasi induce un aumento dell'aggregazione sia nelle ox-LDL che nelle gly-LDL, rispetto alle lipoproteine non trattate con l'enzima. Dal confronto dell'effetto della SMasi sulle gly-LDL non emergono differenze significative rispetto a quelle osservate sulle c-LDL (Figura 24). Le ox-LDL a seguito del trattamento con SMasi mostrano valori di torbidità inferiori rispetto alle c-LDL.

Questi dati suggeriscono che la glicazione e l'ossidazione non aumentano la sensibilità delle LDL all'aggregazione indotta da SMasi.



**Figura 24: Torbidità in campioni di LDL in c-LDL, ox-LDL e gly-LDL incubate in assenza (.) o in presenza di SMasi (100mU/ml).**

□ 0 mU/ml SMasi    ▨ 100 mU/ml SMasi

\*:  $p < 0.05$  vs controllo

## 7) CONCLUSIONI

Oltre alle loro funzioni fisiologiche, le LDL sono ben note per il loro ruolo nella progressione dei fenomeni aterosclerotici, così che una loro elevata concentrazione nel sangue favorisce lo sviluppo della placca (Wilson et al. 1998). Numerosi studi hanno evidenziato che anche alterazioni della composizione lipidica e apoproteica delle LDL possono essere coinvolte nei meccanismi molecolari dell'aterosclerosi. Si è dimostrato che le LDL sono una classe lipoproteica particolarmente sensibile a modificazioni composizionali che intervengono durante la loro vita in circolo (Hevonoja et al. 2000).

Tra i fattori responsabili delle modificazioni composizionali vi sono enzimi (es. lipossigenasi, mieloperossidasi) o livelli elevati di metalli di transizione (rame o ferro) che possono provocare l'ossidazione della componente lipidica e apoproteica delle LDL (Tabas et al. 2007). L'ossidazione provocata da fattori diversi, è una delle modifiche aterogeniche più studiate infatti, le LDL ossidate presentano modifiche strutturali dell'ApoB100 e non interagiscono correttamente con i recettori cellulari (Esterbauer et al. 1992). Tali alterazioni provocano la formazione della placca aterosclerotica. Anche la glicazione delle LDL è considerata una modifica aterogenica. Un aumento delle LDL glicate si osserva nei pazienti diabetici che sono considerati soggetti a rischio per complicanze cardiovascolari. A livello molecolare si è dimostrato che le LDL



glicate mostrano alterazioni dell'ApoB100 dovute alle interazioni tra alcuni amminoacidi, glucosio e/o prodotti di glicazione. Le alterazioni composizioni delle LDL glicate si riflettono in alterazioni strutturali e funzionali ritenute responsabili della maggiore aterogenicità (Veiraiah et al. 2005).

I lipidi che si trovano nel monostrato esterno delle LDL svolgono un ruolo conformazionale nei confronti delle apoproteine. Pertanto le alterazioni composizionali della fase lipidica si riflettono in alterazioni delle proprietà delle apoproteine con conseguenti alterazioni delle interazioni lipidi-apoproteine e delle proprietà chimico-fisiche (polarità, fluidità, ordine). Tra le modifiche composizionali a cui possono andare incontro i fosfolipidi delle LDL vi sono le alterazioni provocate dall'enzima sfingomielinasi che catalizza l'idrolisi della sfingomielina. L'interesse per queste alterazioni si basa sulle evidenze scientifiche che dimostrano che i livelli plasmatici della sfingomielina, che dopo idrolisi enzimatica da parte della sfingomielinasi (SMasi) produce ceramide, sono correlati alla gravità della malattia coronarica (Pan et al. 2014). La formazione di ceramide dalla sfingomielina potrebbe quindi rappresentare un passaggio critico nell'aterosclerosi. Recentemente si è dimostrato che la stessa LDL possiede attività SMasica e si è suggerito che questa attività possa essere intrinseca all'ApoB-100 (Holopainen et al. 2000). Il possibile ruolo fisiologico di questa attività è incerto, ma potrebbe essere

coinvolto nell'ingresso mediante endocitosi non mediata dai recettori di LDL nelle cellule.

Precedenti studi hanno dimostrato che un ruolo nelle alterazioni funzionali delle LDL è la loro propensione intrinseca ad aggregare. Una maggiore aggregazione delle LDL, contribuisce infatti alla maggiore aterogenicità delle LDL (Ross 1993). In un modello animale, l'alterazione della composizione delle LDL e una minore suscettibilità alla SMasi si riflette in una riduzione della sua aggregabilità e un rallentamento dei processi aterosclerotici (Deevska et al. 2012). Infine, si è visto come gli aggregati di LDL siano in grado in vitro di attivare macrofagi e cellule T, attori chiave nello sviluppo della placca aterosclerotica (Kubo et al.1997).

I dati ottenuti nella parte sperimentale hanno dimostrato che le LDL, nelle nostre condizioni sperimentali, sono suscettibili alla azione della sfingomielinasi con produzione di ceramide. Abbiamo anche osservato modificazioni strutturali dell'ApoB100 come evidenziano i cambiamenti dell'intensità di fluorescenza intrinseca e della ipercromicità. I cambiamenti conformazionali dell'ApoB100 e della componente lipidica si riflettono in una maggiore aggregazione con un aumento della torbidità a 450 nm. Tale aumento è da collegare all'incremento dei livelli di ceramide che ha una spiccata tendenza all'auto aggregazione, presumibilmente guidata da legami idrogeno

intermolecolari (Holopainen et al 2000). Le alterazioni composizioni si riflettono anche in una diminuzione di ordine, come evidenziato dallo studio dei valori del GP della sonda Laurdan. Poiché sia LDL che sfingomielinasi sono presenti nelle lesioni aterosclerotiche, si può ipotizzare che le LDL modificate con sfingomielinasi rappresentino un evento fisiologico che porta ad un maggiore assorbimento delle lipoproteine attraverso l'endocitosi e successiva formazione di cellule schiumose dai macrofagi.

Lo studio delle modificazioni composizionali e apoproteiche nelle LDL ossidate e glicate, sottoposte all'azione della sfingomielinasi, ha dimostrato che le LDL che presentano un maggior contenuto di ceramide sono più sensibili alla ossidazione indotta dal rame 5  $\mu$ M. Studi precedenti hanno dimostrato che il livello di sfingomielina protegge dall'ossidazione le LDL (Papasani et al. 1999). Pertanto i nostri dati sono in accordo con questo potenziale ruolo protettivo esercitato dallo sfingolipide.

Nella parte sperimentale abbiamo anche studiato l'effetto della perossidazione lipidica e glicazione sulla suscettibilità alla SMasi. I dati ottenuti confermano che sia la perossidazione lipidica sia la glicazione indotta dal metilgliosale provocano alterazioni della componente apoproteica come evidenziato dallo studio della fluorescenza intrinseca del triptofano. Nelle LDL incubate con il

MG si inoltre ha un incremento dei livelli di AGEs che conferma alterazioni composizionali nelle nostre condizioni sperimentali.

Nelle LDL ossidate o glicate si ha una formazione minore di ceramide dopo incubazione con SMasi. Alcune ipotesi possono essere formulate per commentare i dati ottenuti. È possibile che durante l'ossidazione o glicazione si attivino delle fosfolipasi che idrolizzano la sfingomieline e/o che vi sia una minore accessibilità della sfingomielinasi dovuta alle perturbazioni delle interazioni lipidi-proteine alla superficie delle LDL trattate.

In conclusione abbiamo dimostrato che la sfingomieline, svolge un ruolo sia strutturale sia modulatore della perossidazione lipidica. L'aumento di ceramide che si ha nelle LDL trattate con SMasi si riflette in una maggiore aggregazione che è considerata una tappa che favorisce l'aterogenicità delle LDL (Kinnunen et al. 2002). Inoltre si osservano alterazioni della struttura dell'ApoB100 in accordo con il ruolo conformazionale dei lipidi nei confronti delle apoproteine. Per quanto riguarda la rilevanza fisio-patologica dei dati ottenuti, un'attività sfingomielinasi sia neutra che acida è stata evidenziata in molti tessuti diversi, inclusa la parete arteriosa e il siero, quindi è possibile che LDL vengano modificate dall'enzima prima o dopo l'ingresso nella parete arteriosa (Marathe et al. 1998). Inoltre le sfingomielinasi sia acida che neutra possono essere rilasciate da cellule necrotiche nelle lesioni aterosclerotiche e potrebbero agire

sulle LDL (Marathe et al. 1999). Una maggiore attività della sfingomielinasi è stata osservata nelle lesioni aterosclerotiche rispetto alle arterie normali (Walters et al. 2008).

In relazione all'aterogenesi, dall'esame della letteratura emerge inoltre che il livello di ceramide nel plasma umano è positivamente correlato sia con i livelli di colesterolo totale che di apolipoproteina B-100 ossidata (oxLDL) (Ichi et al. 2006).

## 8) Bibliografia

Abdul R.M., Moinuddin, Safia H., Farzana K., Khursheed A., Asif A. Structural changes in histone H2A by methylglyoxal generate highly immunogenic amorphous aggregates with implications in auto-immune response in cancer. *Glycobiology* (2015):26(2);129-41.

Abidi M., Khan M. S., Ahmad S., Tasneem K., Nayeem S. M., Sidra I., Asif A., Khursheed A., Moinuddia. Biophysical and biochemical studies on glycooxidatively modified human low density lipoprotein. *Archives of Biochemistry and Biophysics* (2018):645;87–99.

Ago H., Oda M., Takahashi M., Tsuge H., Ochi S., Katunuma N., Miyano M., Sakurai J. Structural basis of the sphingomyelin phosphodiesterase activity in neutral sphingomyelinase from *Bacillus cereus*. *J Biol Chem.* (2006):281(23);16157–16167.

Ahmed A., Shamsi A., Shahnawaz Khan, Husain F.M., Bano B. Methylglyoxal induced glycation and aggregation of human serum albumin: Biochemical and biophysical approach. *International Journal of Biological Macromolecules* (2018):113;269–276.

Airola M.V., Hannun Y.A. Sphingolipid Metabolism and Neutral Sphingomyelinases. *Sphingolipids: Basic Science and Drug Development* (2013):215; 57-76.

Ala-Korpela M., Pentikäinen M.O., Korhonen A., Hevonoja T., Lounila J., Kovanen P.T. Detection of low density lipoprotein particle fusion by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Lipid Res.* (1998):39;1705-1712.

Alique M., Luna C., Carracedo J., Ramírez R. LDL biochemical modifications: a link between atherosclerosis and aging. *Food & Nutrition Research* (2015):59;29240.

Allarakha S., Ahmad P., Ishtikhar M., Zaheer M.S., Shafiq S., Moinuddin, Asif A. Fructosylation generates neo-epitopes on human serum albumin. *IUBMB Journals* (2015):67 (5);338-347.

Andersson J., Libby P., Hansson G.K. Adaptive immunity and atherosclerosis. *Clinical Immunology* (2010):134(1);33-46

Arósa F., Cuñatb J., Loma-Osorioa A., Torradoc E., Xavier B., Rodríguez J. J., López Bescósf L., Ancillo P., Pabónh P., Herasd M., Marrugat J. Management of Myocardial Infarction in Spain in the Year 2000. The PRIAMHO II Study. *Rev Esp Cardiol.* (2001):54(9);1033-40.

Austin M.A., Breslow J.L., Hennekens C.H., Buring J.E., Willett W.C., Krauss R.M. Low-density lipoprotein subclass patterns and risk of myocardial infarction. *JAMA* (1988):260;1917–1921.

Avogaro P., Cazzolato G., Bittolo-Bon G. Some questions concerning a small, more electronegative LDL circulating in human plasma. *Atherosclerosis* (1991):91(1-2);163-71.

Bandosz P., O’Flaherty M., Drygas W., Rutkowski M., Koziarek J., Wyrzykowski B., Bennett K., Zdrojewski T., Capewell S. Decline in mortality from coronary heart disease in Poland after socioeconomic transformation: modelling study. *BMJ.* (2012);344.

Berliner J.A., Navab M., Fogelman A.M., Frank J.S., Demer L.L., Edwards P.A., Watson A.D., Lusis A.J. Atherosclerosis: Basic Mechanisms Oxidation, Inflammation, and Genetics. *Circulation* (1995):91;2488–2496.

Berliner J.A., Heinecke J.W. The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis. *Free Radical Bio. Med* (1996):20;707–727.

Berneis K.K., Krauss R.M. Metabolic origins and clinical significance of LDL heterogeneity. *J Lipid Res* (2002):43;1363-1379.

Bjorck L., Rosengren A., Bennett K., Lappas G., Capewell S. Modelling the decreasing coronary heart disease mortality in Sweden between 1986 and 2002. *Eur Heart J.* (2009):30;1046–1056.

Borén J., Lee I., Zhu W., Arnold K., Taylor S., Innerarity T.L. Identification of the low density lipoprotein receptorbinding site in apolipoprotein B100 and the modulation of its binding activity by the carboxyl terminus in familial defective apo-B100. *J. Clin. Invest.* (1998):101(5);1084-1093.

Borén J., Williams K.J. The central role of arterial retention of cholesterol-rich apolipoprotein-B-containing lipoproteins in the pathogenesis of atherosclerosis: a triumph of simplicity. *Curr Opin Lipidol* (2016):27;473–483.

Borodzicz S., Czarzasta K., Kuch M., Cudnoch-Jedrzejewska A. Sphingolipids in cardiovascular diseases and metabolic disorders. *Lipids Health Dis.* (2015):14;55.

Bowie A., Owens D., Collins P., Johnson A., Tomkin G.H. Glycosylated low density lipoprotein is more sensitive to oxidation: implications for the diabetic patient? *Atherosclerosis* (1993):102(1);637.

Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* (1976):72;248-54.

Bucala R., Makita Z., Koschinsky T., Cerami A., Vlassara H. Lipid advanced glycosylation: pathway for lipid oxidation in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* (1993):90(14);6434-8.



Bucala R., Mitchell R., Arnold K., Innerarity T., Vlassara H., Cerami A. Identification of the major site of apolipoprotein B modification by advanced glycosylation end products blocking uptake by the low density lipoprotein receptor. *J Biol Chem.* (1995):270(18);10828-32.

Camejo G., Olofsson S.O., Lopez F., Carlsson P., Bondjers G. Identification of apoB-100 segments mediating the interaction of low density lipoproteins with arterial proteoglycans. *Arteriosclerosis* (1988):8;368-377.

Chakraborty S., Yang Caia, Tarr M.A. In vitro oxidative footprinting provides insight into apolipoprotein B-100 structure in low density lipoprotein. *Proteomics* (2014):14;2614–2622.

Chao R., Khan W., Hannun Y.A. Retinoblastoma protein dephosphorylation induced by D-erythro-sphingosine. *J Biol Chem.* (1992):267;23459–23462.

Clarke C.J., Snook C.F., Tani M., Matmati N., Marchesini N., Hannun Y.A. The extended family of neutral sphingomyelinases. *Biochemistry* (2006):45(38);11247–11256.

Collot-Teixeira S., Martin J., McDermott-Roe C., Poston R., McGregor J.L. CD36 and macrophages in atherosclerosis. *Cardiovasc. Res* (2007):75;468–477.

Da Luz Lemos P., Palandri A.C., Paulo C., Dourado M., Laurindo F. Endothelium in Atherosclerosis: Plaque Formation and Its Complications. *Endothelium and Cardiovascular Diseases Vascular Biology and Clinical Syndromes* (2018):33;493-512.

De Graaf J., Hak-Lemmers H.L., Hectors M.P., Demacker P.N., Hendriks J.C., Stalenhoef A.F. Enhanced susceptibility to in vitro oxidation of the dense lowdensity lipoprotein subfraction in healthy subjects. *Arterioscler Thromb.* (1991):11(2);298-306.

Dean G., Karalis MD. Intensive Lowering of Low-Density Lipoprotein Cholesterol Levels for Primary Prevention of Coronary Artery Disease. *Mayo Clin Proc.* (2009);84(4);345-352.

Deevska G. M., Sunkara M., Morris A.J., Nikolova-karakashian M.N. Characterization of secretory sphingomyelinase activity, lipoprotein sphingolipid content and LDL aggregation in *ldlr* - / - mice fed on a high-fat diet. *Biosci. Rep.* (2012);479-490.

Diaz M. N., Frei B., Vita J. A., Keaney J. F. Antioxidants and atherosclerotic heart disease. *N. Engl. J. Med.* (1997);337;408-416.

Downs J.R., Clearfield M., Weis S., Whitney E., MD; Shapiro D.R., Beere P.A., Langendorfer A., Stein E.A., Kruyer W., Gotto A.M. Primary prevention of acute coronary events with lovastatin in men and women with average cholesterol levels: results of AFCAPS/TexCAPS. *JAMA* (1998);279(20);1615-1622.

Dreon D.M., Fernstrom H.A., Williams P.T., Krauss R.M. LDL subclass patterns and lipoprotein response to a low-fat, high-carbohydrate diet in women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* (1997);17(4);707-14.

Endemann G., Stanton L.W., Madden K.S., Bryant C.M., White R.T., Protter A.A. CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein. *J. Biol. Chem.* (1993);268;11811-11816.

Esterbauer H., Gebicki J., Puhl H., Jürgens G. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radical Biology and Medicine* (1992);13(4); 341-390.

Fanani M.L., Maggio B. Kinetic steps for the hydrolysis of sphingomyelin by *Bacillus cereus* sphingomyelinase in lipid monolayers. *J. Lipid Res.* (2000);41;1832-1840.

Feingold K.R., Grunfeld C. Introduction to Lipids and Lipoproteins. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc. (2018);2000-.

Ferretti G., Taus M., Dousset N., Solera M.L., Valdiguie P., Curatola G. Physico-chemical properties of copper-oxidized high density lipoprotein: a fluorescence study. *Biochem Mol Biol Int.* (1993);30(4);713-9.

Ferretti G., Rabini R.A., Bacchetti T., Vignini A., Salvolini E., Ravaglia F., Curatola G., Mazzanti L. Glycated Low Density Lipoproteins Modify Platelet Properties: A Compositional and Functional Study. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* (2002);87(5);2180–2184.

Ferretti G., Bacchetti T., Moroni C., Vignini A., Nanetti L., Curatola G. Effect of homocysteinylation of low density lipoproteins on lipid peroxidation of human endothelial cells. *J Cell Biochem.* (2004);92(2);351-60.

Flores-Mateo G., Grau M., O'Flaherty M., Ramos R., Elosua R., Violan-Fors C., Quesada M., Marti R., Sala J., Marrugat J., Capewell S. Analyzing the coronary heart disease mortality decline in a Mediterranean population: Spain 1988-2005. *Rev Esp Cardiol.* (2011);64;988–996.

Fong L.G., Parthasarathy S., Witztum J.L., Steinberg D. Nonenzymatic oxidative cleavage of peptide bonds in apoprotein B-100. *J Lipid Resv* (1987);28;1466–1477.

Gary J. N., Freeman N.K. The Phospholipid and Phospholipid Fatty Acid Composition of Human Serum Lipoprotein Fractions. *J. Biol. Chem.* (1960);235;578-.

Gisinger C., Virella G.T., Lopes-Virella M.F. Erythrocyte-bound low-density lipoprotein immune complexes lead to cholesteryl ester accumulation in human monocyte-derived macrophages. *Clinical Immunology and Immunopathology* (1991);59(1);37-52.

Gleissner C.A., Leitinger N., Ley K. Effects of Native and Modified Low-Density Lipoproteins on Monocyte Recruitment in Atherosclerosis. *Hypertension*(2007):50;276–283.

Goldberg I.J., Kandel J.J., Blum C.B., Ginsberg H.N. J. Association of plasma lipoproteins with postheparin lipase activities *Clin Invest.* (1986):78;1523.

Goldstein J.L., Brown M.S. History of Discovery: The LDL Receptor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* (2009):29(4);431–438.

Goñi M.F., Alonso A. Sphingomyelinases: enzymology and membrane activity. *FEBS Lett* (2002):531(1);38-46.

Górska M., Baranczuk E., Dobrzyn A. Secretory Zn<sup>2+</sup>-dependent sphingomyelinase activity in the serum of patients with type 2 diabetes is elevated. *Horm. Metab. Res.* (2003): 35;506–507.

Grassme H., Riethmuller J., Gulbins E. Biological aspects of ceramide-enriched membrane domains. *Prog Lipid Res.* (2007):46;161–170.

Grundy S.M., Benjamin I.J., Burke G.L., Chait A., Eckel R.H., Howard B.V., Mitch W., Smith Jr S.C., Sowers J.R. Diabetes and cardiovascular disease: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association. *Circulation* (1999):100(10);1134-46.

Guarino A. J., Lee S.P., Tulenko T. N., Wrenn S. P. J. Aggregation kinetics of low density lipoproteins upon exposure to sphingomyelinase. *Colloid Interface. Sci.* (2004):279;109–116.

Gustafsson M., Levin M., Skalen K., Perman J., Friden V., Jirholt P., Olofsson S.O., Fazio S., Linton M.F., Semenkovich C.F., Olivecrona G., Boren J. Retention of low-density lipoprotein in atherosclerotic lesions of the mouse: evidence for a role of lipoprotein lipase. *Circ Res.* (2007):101;777.

Hannun Y.A., Obeid L.M. Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nat Rev Mol Cell Biol.* (2008):9(2);139-50.

Harris F.M., Best K.B., Bell J.D. Use of laurdan fluorescence intensity and polarization to distinguish between changes in membrane fluidity and phospholipid order. *Biochim Biophys Acta.* (2002):1565(1);123-8.

Heinecke J.W., Baker L., Rosen H., Chait A. Superoxide-mediated Modification of Low Density Lipoprotein by Arterial Smooth Muscle Cells. *J Clin. Invest.* (1986):77;757-62.

Hevonoja T., Pentikainen M.O., Hyvonen M.T., Kovanen P.T., Ala-Korpela M. Structure of low density lipoprotein (LDL) particles: basis for understanding molecular changes in modified LDL. *Biochim. Biophys. Acta* (2000):1488;189–210.

Holopainen J.M., Subramanian M., Kinnunen P.K. Sphingomyelinase Induces Lipid Microdomain Formation in a Fluid Phosphatidylcholine/Sphingomyelin Membrane. *Biochemistry* (1998):37;17562-17570.

Holopainen J.M., Penate M.O., Metso A.J, Kinnunen P.K.J. Sphingomyelinase activity associated with human plasma low density lipoprotein: possible functional implications. *J Biol Chem* (2000):275;16484–16489.

Hotchkiss J.W., Davies C.A., Dundas R., Hawkins N., Jhund S.P., Scholes S., Bajekal M., O'Flaherty M., Critchley J., Leyland A.H., Capewell S. Explaining trends in Scottish coronary heart disease mortality between 2000 and 2010 using IMPACTSEC model: retrospective analysis using routine data. *BMJ*. (2014):348;1088.

Hughes J., Kee F., O'Flaherty M., Critchley J., Cupples M., Capewell S., Bennett K. Modelling coronary heart disease mortality in Northern Ireland between 1987 and 2007: broader lessons for prevention. *Eur J Prev Cardiol*. (2013):20;310–321.

Ichi I., Nakahara K., Miyashita Y., Hidaka A., Kutsukake S., Inoue K., Maruyama T., Miwa Y., Harada-Shiba M., Tsushima M., Kojo S., and Kisei Cohort Study Group. Association of Ceramides in Human Plasma with Risk Factors of Atherosclerosis. *Lipids* (2006):41; 859–863.

Imanaga Y., Sakata N., Takebayashi S., Matsunaga A., Sasaki J., Arakawa K., Nagai R., Horiuchi S., Itabe H., Takano T. In vivo and in vitro evidence for the glycooxidation of low density lipoprotein in human atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis* (2000):150;343–355.

Jenkins R.W., Canals D., Hannun Y.A. Roles and Regulation of Secretory and Lysosomal Acid Sphingomyelinase. *Cellular Signalling* Volume(2009):21(6);836-846.

Jenkins R.W., Canals D., Idkowiak-Baldys J., Simbari F., Roddy, P. Perry, D.M., Kitatani K., Luberto C., Hannun Y.A.. Regulated secretion of acid sphingomyelinase: implications for selectivity of ceramide formation. *J. Biol. Chem*. (2010):285;35706–35718.

Jiang Z.Y., Hunt J.V., Wolff S.P. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. *Anal Biochem*. (1992):202(2);384-9.

Ketelhuth D.F.J., Gistera A., Johansson D.K., Hansson G.K. T cell-based therapies for atherosclerosis. *Curr Pharm Des* (2013):19;5850–5858.

Kinnunen Paavo K.J. and Holopainen J.M. Sphingomyelinase Activity of LDL: A Link between Atherosclerosis, Ceramide, and Apoptosis? *Trends in Cardiovascular Medicine* (2002):12;37-42.

Klein R.L., Laimins M., Lopes-Virella M.F. Isolation, characterization, and metabolism of the glycosylated and nonglycosylated subfractions of low-density lipoproteins isolated from type I diabetic patients and nondiabetic subjects. *Diabetes* (1995):44(9);1093-8.

Kobayashi K., Nagata E., Sasaki K., Harada-Shiba M., Kojo S., Kikuzaki H. Increase in secretory sphingomyelinase activity and specific ceramides in the aorta of apolipoprotein E knockout mice during aging. *Biol. Pharm. Bull.* (2013):36;1192–1196.

Kolesnick R.N., Goni F.M., Alonso A. Compartmentalization of ceramide signaling: physical foundations and biological effects. *J. Cell Physiol.* (2000):184;285-300.

Kornhuber J., Rhein C., Muller C. P., Muhle C. Secretory sphingomyelinase in health and disease. *Biol. Chem.* (2015):396;707–736.

Kubo N., Kikuchi J., Furukawa J. Sakai T., Ohta H., Iwase S., Yamada H., Sakurabayashi I. Regulatory effects of aggregated LDL on apoptosis during foam cell formation of human peripheral blood monocytes. *FEBS Letters* (1997):409(2);177-182.

Le belle M., Krauss R.M. Differences in carbohydrate content of low density lipoproteins associated with low density lipoprotein subclass patterns. *J Lipid Res* (1990):31(9);1577-88.

Lee J.K., Jin H.K, Park M.H., Kim B.R., Lee P.H., Nakauchi H., Carter J.E., He X., Schuchman E.H., Bae J.S. Acid sphingomyelinase modulates the autophagic process by controlling lysosomal biogenesis in Alzheimer's disease. *J. Exp.Med.* (2014):211; 1551–1570.

Leitinger N. Oxidized phospholipids as triggers of inflammation in atherosclerosis. *Mol Nutr Food Res* (2005):49(11);1063-1071.

Lieu H.D., Withycombe S.K., Walker Q., Rong J.X., Walzem R.L., Wong J.S., Hamilton R.L., Fisher E.A., Young S.G. Eliminating atherogenesis in mice by switching off hepatic lipoprotein secretion. *Circulation* (2003):107;1315-1321.

Liu H., Scraba D.G., Ryan R.O. Prevention of phospholipase-C-induced aggregation of low density lipoprotein by amphipathic apolipoproteins, *FEBS Lett.* (1993):316;27-33.

Lyons T.J., MD. Glycation and oxidation: A role in the pathogenesis of atherosclerosis. *MRCP* (1993):71(6);26-31.

Mackness M.I., Durrington P.N. HDL, its enzymes and its potential to influence lipid peroxidation. *Atherosclerosis.* (1995):115(2);243-53.

Marathe S., Schissel S. L., Yellin M.J., Beatini M., Mintzer R., Williams K.J., Tabas, I. Human Vascular Endothelial Cells Are a Rich and Regulatable Source of Secretory Sphingomyelinase *J. Biol. Chem.* (1998):273;4081–4088.

Marathe S., Kuriakose G., Williams K.J., Tabas I. Sphingomyelinase, an enzyme implicated in atherogenesis, is present in atherosclerotic lesions and binds to specific components of the subendothelial extracellular matrix. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* (1999):19;2648-2658.



Masana L., Girona J., Ibarretxe D., Rodríguez-Calvo R., Rosales R., Vallvé J., Rodríguez-Borjabad C., Guardiola M., Rodríguez M., Guaita-Esteruelas S., Oliva I., Martínez-Micaelo N., Heras M., Ferré R., Ribalta J., Plana N. Clinical and pathophysiological evidence supporting the safety of extremely low LDL levels-The zero-LDL hypothesis. *J Clin Lipidol* (2018):12(2);292-299.

McKeone B.J., Patsch J.R., Pownall H.J. Plasma triglycerides determine lowdensity lipoprotein composition, physical properties, and cell-specific binding incultured cells. *J Clin Invest.* (1993):91(5);1926-33.

Mir A.R., Habib S., Khan F., Alam K., Ali A. Structural changes in histone H2A by methylglyoxal generate highly immunogenic amorphous aggregates with implications in auto-immune response in cancer. *Glycobiology* (2015):26(2);129-41.

Moore D.J., Rerek M.E., Mendelsohn R. FTIR spectroscopy studies of the conformational order and phase behaviour of ceramides. *J Phys Chem B* (1997):101;8933–8940.

Morita S.Y., Kawabe M., Nakano M., Handa T. Pluronic L81 affects the lipid particle sizes and apolipoprotein B conformation. *Chem. Phys. Lipids* (2003):126;39–48.

Morita S.Y. Metabolism and Modification of Apolipoprotein B-Containing Lipoproteins Involved in Dyslipidemia and Atherosclerosis. *Biol. Pharm. Bull.* (2016):39;1–24.

Murphy H.C., Ala-Korpela M., White J. J., Raof A., Bell J. D., Barbard M. L., Burns S. P., Iles R. A. Evidence for distinct behaviour of phosphatidylcholine and sphingomyelin at the low density lipoprotein surface. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1997):234;733–737.

Nguyen S.D., Javanainen M., Rissane S., Zha H., Huusko J., Kive A.M., Ylä-Herttua S., Mohama N., Fogelman A.M., Vattulainen I., Kovanen P.T., Öörni K. Apolipoprotein A-I mimetic peptide 4F blocks sphingomyelinase-induced LDL aggregation. *J Lipid Res.* (2015);56(6);1206–1221.

Nilsson A., Duan R.D. Alkaline sphingomyelinases and ceramidases of the gastrointestinal tract. *Chem. Phys. Lipids* (1999);102; 97-105.

Nishiwaki H., Ito K., Otsuki K., Yamamoto H., Komai K., Matsuda K. Purification and functional characterization of insecticidal sphingomyelinase C produced by *Bacillus cereus*. *Eur J Biochem* (2004);271(3);601-6.

Nordestgaard B.G., Wootton R., Lewis B. Selective retention of VLDL, IDL, and LDL in the arterial intima of genetically hyperlipidemic rabbits in vivo. Molecular size as a determinant of fractional loss from the intima-inner media. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* (1995);15;534–542.

Olivera A., Kohama T., Edsall L., Nava V., Cuvillier O., Poulton S., Spiegel S. Sphingosine kinase expression increases intracellular sphingosine-1-phosphate and promotes cell growth and survival. *J Cell Biol.* (1999);147;545–558.

Öörni K., Hakala J.K., Annala A., Ala-Korpela M., Kovanen P.T. Sphingomyelinase induces aggregation and fusion, but phospholipase A2 only aggregation, of low density lipoprotein (LDL) particles. Two distinct mechanisms leading to increased binding strength of LDL to human aortic proteoglycans. *J. Biol. Chem.* (1998);273;29127–29134.

Öörni K., Pentikainen M.O., Ala-Korpela M., Kovanen P.T.J. Aggregation, fusion, and vesicle formation of modified low density lipoprotein particles: molecular mechanisms and effects on matrix interactions. *Lipid Res.* (2000);41;1703–1714.

Orekhov A.N., Bobryshev Y.V., Sobenin I.A., Melnichenko A.A., Chistiakov D.A. Modified low density lipoprotein and lipoprotein- containing circulating immune complexes as diagnostic and prognostic biomarkers of atherosclerosis and type 1 diabetes macrovascular disease. *Int J Mol Sci* (2014):15(7);12807-41.

Osterud B., Bjorklid E. Role of monocytes in atherogenesis. *Physiol. Rev.* (2003):83;1069–1112.

Otvos J.D., Mora S., Shalurova I. Clinical implications of discordance between low-density lipoprotein cholesterol and particle number. *J Clin Lipidol* (2011):5;105-113.

Pan W., Yu J., Shi R., Yan L., Yang T., Li Y., Zhang Z., Yu G., Bai Y., Schuchman E.H. Elevation of ceramide and activation of secretory acid sphingomyelinase in patients with acute coronary syndromes. *Coron. Artery Dis* (2014):25;230–235.

Paoletti R., Gotto A.M., Hajjar D.P. Inflammation in atherosclerosis and implications for therapy. *Circulation* (2004):109(23); III20\_6.

Papasani V.S., Veeramali S.S., Wang K. Novel Physiological Function of Sphingomyelin in Plasma: inhibition of lipid peroxidation in low density lipoproteins. *J Biol Chem* (1999):274(51);36409-14.

Parasassi T., Conti F, Gratton E. Time-resolved fluorescence emission spectra of Laurdan in phospholipid vesicles by multifrequency phase and modulation fluorometry. *Cell Mol Biol.*(1986):32(1);103-8.

Parasassi T., Bittolo-Bon G., Brunelli R., Cazzolato G., Krasniwska E.K., Mei G., Sevanian A., Ursini F. Loss of apoB-100 secondary Structure and conformation in hydroperoxide rich, electronegative LDL2. *Free Radical Biology & Medicine* (2001):31;82–89.

Park K.D., Mun K.C., Chang E.J., Park S.B., Kim H.C. Inhibition of erythropoietin activity by cyanate. *Scand J Urol Nephrol* (2004):38(1);69-72.

Parthasarathy S., Quinn M.T., Schwenke D.C., Carew T.E., Steinberg D. Oxidative modification of beta-very low density lipoprotein. Potential role in monocyte recruitment and foam cell formation. *Arteriosclerosis* (1989):9;398–404.

Pentikainen M.O., Lehtonen E.M.P., Oörni K., Lusa S., Somerharju P., Jauhiainen M., Kovanen P.T. Human arterial proteoglycans increase the rate of proteolytic fusion of low density lipoprotein particles, *J. Biol. Chem.* (1997):272;25283-25288.

Piha M., Lindstedt L.K., Kovanen P.T. Fusion of proteolyzed low-density lipoprotein in the fluid phase: a novel mechanism generating atherogenic lipoprotein particles, *Biochemistry* (1995):34;10120-10129.

Plihtari R., Hurt-Camejo E., Öörni K., Kovanen P.T. Proteolysis sensitizes LDL particles to phospholipolysis by secretory phospholipase A2 group V and secretory sphingomyelinase. *J Lipid Res.* (2010):51(7);1801–1809.

Pollard H., Scanu A.M., Taylor E.W. On the geometrical arrangement of the protein subunits of human serum lowdensity lipoprotein: evidence for a dodecahedral model. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1969):64;304-310.

Posner I., DeSanctis J. Kinetics of product inhibition and mechanisms of lipoprotein lipase activation by apolipoprotein C-II. *Biochemistry* (1987):26;3711.

Prassl R., Laggner P. Lipoprotein Structure and Dynamics: Low Density Lipoprotein Viewed as a Highly Dynamic and Flexible Nanoparticle. *Lipoproteins - Role in Health and Diseases* (2012).

Ramirez R., Carracedo J., Nogueras S., Buendia P., Merino A., Cañadillas S., Mariano R., Tetta C., Martin-Malo Al., Aljama P. Carbamylated darbepoetin derivative prevents endothelial progenitor cell damage with no effect on angiogenesis. *J Mol Cell Cardiol* (2009):47(6);781-8.

Reisfeld N., Lichtenberg D., Dagan A., Yedgar S. Apolipoprotein B exhibits phospholipase A1 and phospholipase A2 activities. *FEBS Lett* (1993):315;267–270.

Riethmüller J., Riehle A., Grassmé H., Gulbins E. Membrane rafts in host-pathogen interactions. *Biochim. Biophys. Acta* (2006):1758; 2139–2147.

Rivas-Urbina A., Rulla A., Montoliu-Gayab L., Pérez-Cuellar M., Ordóñez-Llanosa J., Villegas S., Sánchez-Quesada J.L. Low-density lipoprotein aggregation is inhibited by apolipoprotein J derived mimetic peptide D- [113–122] apoJ. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* (2019):1865;158541.

Ross R. The pathogenesis of arteriosclerosis: a prospective for the 1990s. *Nature* (1993):362;801-809.

Ross R. Atherosclerosis is an inflammatory disease. *Am Heart J* (1999):138; S419-S420.

Royer M., Foote J.L. The identification of ceramides and glyceryl ethers in unsaponifiable lipid of human aorta. *Chem Phys Lipids* (1971):7;266–678.

Ruiz-Arguello M.B., Basanez G., Goni F.M., Alonso A. Different effects of enzyme-generated ceramides and diacylglycerols in phospholipid membrane fusion and leakage. *J Biol Chem.*(1996):271(43);26661-21.

Ruiz-Arguello M.B., Goni F.M., Alonso A. Vesicle Membrane Fusion Induced by the Concerted Activities of Sphingomyelinase and Phospholipase C. *J.Biol.Chem.* (1998):273;22977-22982.

Ruuth M., Nguyen S.D., Vihervaara T., Hilvo M., Laajala T.D., Kondadi P.K., Gistera A., Lahteenmaki H., Kittila T., Huusko J., Uusitupa M., Schwab U., Savolainen M.K., Sinisalo J., Lokki M., Nieminen M.S., Jula A., Perola M., Ylä-Herttula S., Rudel L., Öörni A., Baumann M., Baruch A., Laaksonen R., Ketelhuth D.F.J., Aittokallio T., Jauhiainen M., Käkelä R., Borén J., Williams K.J., Kovanen P.T., Öörni K. Susceptibility of low-density lipoprotein particles to aggregate depends on particle lipidome, is modifiable, and associates with future cardiovascular deaths. *European Heart Journal* (2018):39;2562–2573.

Samet D., Barenholz Y. Characterization of acidic and neutral sphingomyelinase activities in crude extracts of HL-60 cells. *Chem. Phys. Lipids* (1999): 102;65- 77.

Sasset L., Yi Zhang, Dunn T.M., Di Lorenzo A. Sphingolipid De Novo Biosynthesis: A Rheostat of Cardiovascular Homeostasis. *Trends Endocrinol Metab.* (2016):27;807–819.

Sawai H. and Hannun Y.A. Ceramide and sphingomyelinases in the regulation of stress responses. *Chem. Phys. Lipids* (1999):102;141-147.

Schissel S. L., Tweedie-Hardman J., Rapp J. H., Graham G., Williams K. J., Tabas I. Rabbit aorta and human atherosclerotic lesions hydrolyze the sphingomyelin of retained low-density lipoprotein. Proposed role for arterial-wall sphingomyelinase in subendothelial retention and aggregation of atherogenic lipoproteins. *J. Clin. Invest.* (1996):98;1455–1464.

Schissel S.L., Jiang X-C., Tweedie-Hardman J., Jeong T-S., Camejo E.H., Najib J., Rapp J.H., Williams K.J., Tabas I. Secretory sphingomyelinase, a product of the acid sphingomyelinase gene, can hydrolyze atherogenic lipoproteins at neutral pH Implications for atherosclerotic lesion development. *J Biol Chem* (1998):273;2738–2746.

Schissel S.L., Keesler G.A., Schuchman E.H., Williams K.J., Tabas I. The cellular trafficking and zinc dependence of secretory and lysosomal sphingomyelinase, two products of the acid sphingomyelinase gene. *J. Biol. Chem.* (1998):273;18250–18259.

Shamseddine A.A., Airola M.V., Hannun Yusuf A. Roles and regulation of Neutral Sphingomyelinase-2 in cellular and pathological processes. *Adv Biol Regul* (2015):57;24-41.

Sharrett A.R., Ballantyne C.M., Coady S.A., Heiss G., Sorlie P.D., Catellier D., Patsch W. Atherosclerosis Risk in Communities Study Group. Coronary heart disease prediction from lipoprotein cholesterol levels, triglycerides, lipoprotein(a), apolipoproteins A-I and B, and HDL density subfractions: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Circulation* (2001):104;1108-1113.

Shepherd J., Cobbe S.M., Ford I., Isles C.G., Lorimer A.R., MacFarlane P.W., McKillop J.H., Packard C.J. West of Scotland Coronary Prevention Study Group. Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. *N Engl J Med.* (1995):333(20);1301-1307.

Sivaram P., Choi S.Y., Curtiss L.K., Goldberg I.J. An amino-terminal fragment of apolipoprotein B binds to lipoprotein lipase and may facilitate its binding to endothelial cells, *J. Biol. Chem.* (1994):269;9409-9412.

Skipski V.P., Barclay M., Barclay R.K., Fetzer V.A., Good J.J., Archibald F. M. Lipid composition of human serum lipoproteins. *Biochem. J.* (1967):104;340–352.

Smith E.L., Schuchman E.H. The unexpected role of acid sphingomyelinase in cell death and the pathophysiology of common diseases. *FASEB J.* (2008):22(10);3419–3431.

Sneck M., Kovanen P.T., Öörni K. Decrease in pH strongly enhances binding of native, proteolyzed, lipolyzed, and oxidized low density lipoprotein particles to human aortic proteoglycans. *J. Biol. Chem.* (2005):280;37449 – 37454.

Sneck M., Nguyen S.D., Pihlajamaa T., Gebrenegus Y., Riekkola M-L., Ross M., Kovanen P. T., Öörni K. Conformational changes of apoB-100 in SMase-modified LDL mediate formation of large aggregates at acidic pH. *J. Lipid Res* (2012):53; 1832–1839.

Sommer A., Prenner E., Gorges R., Stütz, H., Grillhofer H., Konstner G. M., Paltauf F., Hermetter, A. Organization of phosphatidylcholine and sphingomyelin in the surface monolayer of low density lipoprotein and lipoprotein(a) as determined by time-resolved fluorometry. *J. Biol. Chem* (1992):267;24217–24222.

Sot J., Ibarguren M., Busto J.V., Montes L.R., Goñi F.M., Alonso, A. Cholesterol displacement by ceramide in sphingomyelin-containing liquid-ordered domains, and generation of gel regions in giant lipidic vesicles. *FEBS Lett.* (2008):582;3230–3236.

Stafforini D.M., Tjoelker L.W., McCormick S.P., Vaitkus D., McIntyre T.M., Gray P.W., Young S.G., Prescott S.M. Molecular basis of the interaction between plasma platelet-activating factor acetylhydrolase and low density lipoprotein. *J. Biol. Chem.* (1999):274;7018-7024.

Staneva G., Momchilova A., Wolf C., Quinn P.J., Koumanov K. Membrane microdomains: role of ceramides in the maintenance of their structure and functions. *Biochim. Biophys. Acta* (2009):1788;666–675.



Steinbrecher U.P., Witztum J.L. Glucosylation of low-density lipoproteins to an extent comparable to that seen in diabetes slows their catabolism. *Diabetes* (1984):33(2);130-4.

Steinberg D., Parthasarathy S., Carew T. E., Khoo J. C., Witztum J. L. Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N. Engl. J. Med.* (1989):320;915–924.

Steinbrecher U.P., Witztum J.L., Parthasarathy S., Steinberg D. Decrease in reactive amino groups during oxidation or endothelial cell modification of LDL. Correlation with changes in receptor-mediated catabolism. *Arteriosclerosis* (1987):7;135–143.

Suits A.G., Chait A., Aviram M., Heinecke J.W. Phagocytosis of aggregated lipoprotein by macrophages: low density lipoprotein receptor-dependent foam-cell formation, *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1989):86;2713-2717.

Swartzendruber D.C., Wertz P.W., Kitko D.J., Madison K.C., Downing D.T. Molecular models of the intercellular lipid lamellae in mammalian stratum corneum. *J. Invest Dermatol* (1989):92;251– 257.

Tabas I. Secretory sphingomyelinase. *Chem Phys Lipids* (1999):102(1-2);123-30.

Tabas I., Williams K.J., Boren J. Subendothelial lipoprotein retention as the initiating process in atherosclerosis: update and therapeutic implications. *Circulation* (2007):116;1832–1844.

Tanfani F., Galeazzi T., Curatola G., Bertoli E., Ferretti G. Reduced beta-strand content in apoprotein B-100 in smaller and denser low-density lipoprotein subclasses as probed by Fourier-transform infrared spectroscopy. *Biochem J.* (1997):322(3);765–769.

Tanford C. *The Hydrophobic Effect: Formation of Micelles and Biological Membranes*. Wiley-Interscience, New York (1980);233.

Van der Wulp M.Y.M., Verkade H.J., Groen A.K. Regulation of cholesterol homeostasis, Molecular and cellular. *Endocrinology* (2013);368;1-16.

Veiraiah A. Hyperglycemia, lipoprotein glycation, and vascular disease. *Angiology* (2005);56(4):431-8.

Veniant M.M., Sullivan M.A., Kim S.K., Ambroziak P., Chu A., Wilson M.D., Hellerstein M.K., Rudel L.L., Walzem R.L., Young S.G. Defining the atherogenicity of large and small lipoproteins containing apolipoprotein B100. *J Clin Invest.* (2000);106;1501-1510.

Wadhera R.K., Steen D.L., Khan I.,Giugliano R.P., Foody J.M. A review of low-density lipoprotein cholesterol, treatment strategies, and its impact on cardiovascular disease morbidity and mortality.*Journal of Clinical Lipidology* (2016);10: 472–489.

Walters M.J., Wrenn S.P. Mechanistic Roles of Lipoprotein Lipase and Sphingomyelinase in Low Density Lipoprotein Aggregation. *Journal of Colloid and Interface Science.* (2011);363;268-274.

Walters M.J., Wrenn S.P. Effect of Sphingomyelinase-Mediated Generation of Ceramide on Aggregation of Low-Density Lipoprotein. *Langmuir* (2008);24,17;9642–9647

Weinreb N.J., Brady R.O., Tappel A.L. The lysosomal localization of sphingolipid hydrolases. *Biochim. Biophys. Acta* (1968);159; 141–146.

Weisgraber K.H., Rall Jr S.C. Human apolipoprotein B- 100 heparin-binding sites. *J. Biol. Chem.* (1987);262;11097-11103.

Wilson P.W., D'Agostino R.B., Lev D. Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. *Circulation* (1998): 97;1837-1847.

Wong M.L., Xie B., Beatini N., Phu P., Marathe S., Johns A., Gold P.W., Hirsch E., Williams K.J., Licinio J. Acute systemic inflammation up-regulates secretory sphingomyelinase in vivo: a possible link between inflammatory cytokines and atherogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2000):97;8681–8686.

Younis N., Sharma R., Soran H., Charlton-Menys V., Elseweidy M., Durrington P. Glycation as an atherogenic modification of LDL. *Current Opinion in Lipidology* (2008):19(4);378-384.