





**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CAMERINO**  
**SCUOLA DI BIOSCIENZE E MEDICINA VETERINARIA**

*Master's Degree in Biological sciences (LM-6)*

*Curriculum: NUTRIZIONE PER IL BENESSERE E LO SPORT*

**I NUOVI BIOMARCATORI**  
**PER LA COSTRUZIONE DI UN PANNELLO DI**  
**RISCHIO CARDIOMETABOLICO**

*Tesi sperimentale in*

*Parametri biochimico-clinici e stato nutrizionale*

*Laureanda*

*Giulia Angelozzi*

*Relatori:*

*Dott.ssa Laura Bonfili*

*Dr. Antonio Fusco*

*Dr. Spina Michele*

ANNO ACCADEMICO 2023 / 2024

## **INDICE**

### **INTRODUZIONE**

#### **1. PROFILO DI RISCHIO CARDIOMETABOLICO**

**1.1 Markers pro-aterogeni**

**1.2 Il microbiota intestinale come nuovo marker**

**1.3 Il ruolo dell'alimentazione, dello stile di vita e della nutraceutica**

#### **2. MATERIALI E METODI**

**2.1 Ipotesi di lavoro**

**2.2 Questionario anamnestico del paziente**

**2.3 Costruzione del database**

**2.4 Kit ELISA LPS**

#### **3. SCOPO**

#### **4. RISULTATI**

#### **5. DISCUSSIONE**

#### **BIBLIOGRAFIA**

## Astratto

Le patologie cardiovascolari ed i disordini del metabolismo sono tra le maggiori cause di malattie croniche. I principali fattori per lo sviluppo di tali patologie sono lo scarso controllo dei valori pressori, gli elevati valori di colesterolo e di glicemia spesso associati alla coesistenza di sovrappeso od obesità con importante danno multiorgano.

Nei Paesi Occidentali, l'aderenza al trattamento, tra i pazienti affetti da malattie croniche cardiovascolari e dismetaboliche arriva solo al 50%, con risultati clinici subottimali. Pertanto, la prevenzione è un argomento più che attuale e cruciale.

Le malattie cardiovascolari, più che nell'eredità del DNA, affondano le radici principalmente nell'infiammazione cronica silente e nello stress ossidativo, condizioni che si sviluppano fin da giovani, ma che non si manifestano con sintomi evidenti e sono diagnosticabili solo attraverso esami di laboratorio particolari e specifici che valutano:

- *Lo stato delle membrane cellulari*, indicativo di eventuale infiammazione cronica nascosta (Lipidomica di membrana eritrocitaria);
- *Lo stress ossidativo*, che rappresenta il rapporto tra la produzione di radicali liberi e antiossidanti (d-ROMs);
- *La Glicazione*, cioè i potenziali danni causati dagli zuccheri;
- Le caratteristiche delle molecole del colesterolo LDL, per valutare la potenziale pericolosità di queste lipoproteine (*LDL-ossidate, Lipoprint, small-dense LDL*);
- *La salute del microbiota intestinale* (Disbiosi Test);
- *Altri parametri plasmatici* da esaminare in base alle condizioni specifiche del paziente (eventuali carenze di Vitamina D, insulino-resistenza etc...)

In ultima istanza vi è il ruolo del microbiota nell'eziogenesi dell'infiammazione endoteliale. Uno studio tutto italiano, pubblicato su Nature Reviews Cardiology, mette in luce nuove cause di malattie cardiovascolari: una endotossina dei batteri intestinali è stata trovata nelle arterie dei pazienti che hanno avuto un infarto miocardico (1).

Lo studio ha messo in evidenza che a causa di alterazioni del microbiota, disbiosi e permeabilità intestinale, molecole pro-infiammatorie come i lipopolisaccaridi (LPS) possono attraversare la parete intestinale e raggiungere le arterie favorendone l'infiammazione fino alla trombosi. I risultati hanno dimostrato che il LPS è presente nelle arterie carotidee affette da grave danno aterosclerotico in soggetti ad alto rischio di ictus, e nei trombi prelevati dalle coronarie di pazienti che erano andati incontro a un infarto del miocardio(1).

Da qui l'esigenza di avere dei marcatori clinici affidabili che riescano a dare una diagnosi certa di disbiosi e permeabilità intestinale.

Il seguente lavoro di tesi, nello specifico, si articolerà in un'iniziale disamina di tutti i markers più rilevanti nella valutazione di un rischio cardio-metabolico. Si prenderanno in considerazione sia i parametri attualmente indagati con le analisi di routine, sia nuovi biomarcatori proposti nella letteratura scientifica. Questi parametri saranno poi radunati e associati tra loro in un foglio operativo Excel, in cui verranno inseriti i valori risultanti dalle analisi di individui, oggetto di osservazione e studio principalmente da parte del dottor Antonio Fusco, cardiologo in collaborazione nel progetto, ai fini di costruire un pannello per la valutazione del rischio cardiovascolare. Infine, verrà testato il Kit ELISA LPS per valutare l'inserimento del lipopolisaccaride come ulteriore biomarcatore nel pannello.

## **INTRODUZIONE**

### **1. PROFILO DI RISCHIO CARDIOMETABOLICO**

Le malattie cardiovascolari (CVD) rappresentano uno dei principali problemi mondiali di sanità pubblica. In questo gruppo di malattie rientrano le più frequenti patologie di origine arteriosclerotica, in particolare le malattie ischemiche del cuore (infarto acuto del miocardio, sindrome coronarica acuta e angina pectoris), le malattie cerebrovascolari e le arteriopatie periferiche.

La base morfologica delle malattie cardiovascolari è l'aterosclerosi (2).

La lesione aterosclerotica si forma nella parete dell'arteria e consiste in un nucleo lipidico e un cappuccio fibroso che separa il nucleo lipidico dal lume. La deposizione di lipidi nello strato intimale arterioso più interno è una delle prime manifestazioni di aterosclerosi, che è anche facilmente visibile (3, 4).

Nell'intima, i lipidi si accumulano sia all'interno delle cellule della parete vascolare sia nello spazio extracellulare, dove si associano ai componenti della matrice extracellulare (5). La formazione di cellule "schiumose" con citoplasma pieno di goccioline lipidiche (da cui il nome) è riconosciuta come fattore scatenante dell'eterogenesi (6-8). Secondo le conoscenze attuali, le lipoproteine a bassa densità (LDL) circolanti nel sangue umano sono le principali proteine di trasporto per il colesterolo nel plasma umano e rappresentano la fonte principale di lipidi accumulati nelle cellule della parete arteriosa. Date le loro dimensioni ridotte, le LDL sono un substrato facilmente suscettibile all'ossidazione e, una volta ossidate, sono più reattive con i tessuti circostanti e possono depositarsi all'interno del rivestimento delle arterie, dando avvio all'eterogenesi e alle patologie cardiovascolari conseguenti.

D'altro canto, le lipoproteine ad alta densità (HDL) sembrano avere un effetto protettivo, poiché facilitano il deflusso dei lipidi dalle cellule, prevenendo così la formazione di cellule schiumose (9).

Gli eventi iniziali dell'eterogenesi vanno identificati nel danno dell'endotelio e nell'accumulo e modificazione (aggregazione, ossidazione e/o glicazione) delle lipoproteine a bassa densità (LDL) nell'intima delle arterie, due eventi che si verificano precocemente e che si potenziano a vicenda. Penetrati nell'intima, i macrofagi fagocitano le lipoproteine modificate e, a causa dell'impossibilità di metabolizzare il colesterolo in esse contenuto, si trasformano nelle cellule schiumose (o spumose), caratteristiche delle strie lipidiche (*fatty streaks*).

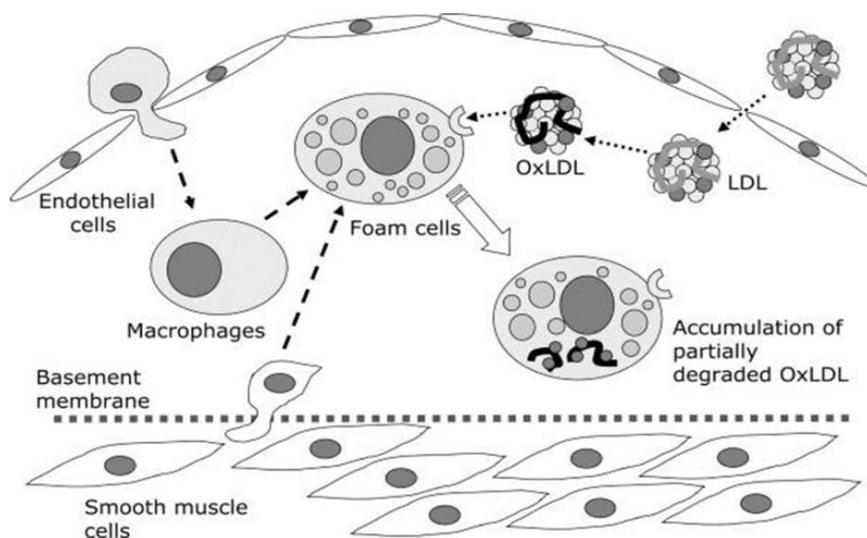
Il modello della "modificazione ossidativa" (10) propone che la formazione della placca aterogena sia il risultato di tre eventi principali:

1. *Ossidazione e/o glicazione delle LDL* a causa dello Stress Ossidativo: Le lipoproteine a bassa densità (LDL) sono soggette a processi di ossidazione e/o glicazione a causa dello stress ossidativo nell'ambiente vascolare. Questa modificazione rende le LDL più suscettibili alla reazione con i tessuti circostanti e alla loro accumulazione nelle pareti delle arterie.

2. *Infiammazione*: L'infiammazione è un processo chiave nell'aterosclerosi. Essa promuove l'espressione di sostanze chimiche che attirano leucociti nelle aree colpite e stimolano la trasformazione dei monociti in macrofagi. I leucociti infiltrati e i macrofagi attivati contribuiscono all'infiammazione locale e alla formazione della placca.

3. *Accumulo di materiale lipidico facilmente ossidabile*: Il materiale lipidico, specialmente le LDL ossidate, si accumula all'interno delle pareti arteriose danneggiate.

Questo materiale lipidico può fornire un substrato per l'infiammazione e può favorire ulteriori processi di ossidazione, contribuendo alla progressione della placca aterosclerotica. In sintesi, questi tre eventi interconnessi - ossidazione delle LDL, infiammazione e accumulo di materiale lipidico - sono centrali nella formazione e nello sviluppo delle placche aterosclerotiche, che rappresentano un importante meccanismo patogenetico nell'aterosclerosi e nelle malattie cardiovascolari associate.



**Figura 1(10) Ipotesi della “Oxidative Modification” nella patogenesi dell’aterosclerosi**

Schema della formazione delle cellule schiumose nelle lesioni aterosclerotiche. Le LDL native penetrano all’interno della tonaca intima arteriosa dove vengono ossidate [LDL-ox] per poi essere fagocitate dai macrofagi reclutati, che diventano Cellule Schiumose (Foam Cells) ad alto contenuto lipidico. Le LDL-ox hanno un’affinità inferiore per i recettori delle LDL, e sviluppano invece un’affinità elevata per i recettori di cattura dei macrofagi.

La sfida della Medicina preventiva nei prossimi 10 anni è quella di proporre in routine una serie di parametri clinici robusti ed affidabili che misurino questi tre punti focali che danno l’avvio all’aterogenesi.

## 1.1 Markers pro aterogeni

In passato, il focus principale era sul Colesterolo LDL (LDL-C) come indicatore primario di rischio aterosclerotico e sul controllo dei suoi livelli attraverso interventi farmacologici. Tuttavia, studi recenti hanno messo in discussione la relazione tra LDL-C e mortalità per CVD.

Nella revisione del 2016 di Ravnskov U et al. (11) sono stati selezionati e presi in esame 19 studi di coorte correlanti i livelli di LDL-C e la mortalità (generale e/o causata da malattie cardiovascolari) ed è emerso che la relazione tra LDL-C e mortalità non è così semplice, come inizialmente ipotizzato, e in molti casi si è osservata una correlazione inversa, con una maggior frequenza di mortalità nelle coorti con livelli più bassi di LDL-C.

Le evidenze, dunque, non erano coerenti con una visione del colesterolo associato a lipoproteine a bassa densità (LDL-C) come principale markers di rischio aterogeno, costringendo a prendere in esame altre variabili e spiegazioni, *in primis considerando l'ipotesi della modificazione ossidativa lipidica nell'eziogenesi dell'aterosclerosi.*

Inoltre, è stato evidenziato che il solo valore di LDL-C potrebbe non essere un indicatore affidabile del rischio di CVD, sia nella popolazione generale che nei casi di ipercolesterolemia familiare.

Altri markers di rischio, come i livelli di trigliceridi, potrebbero giocare un ruolo significativo e dovrebbero essere presi in considerazione nella valutazione complessiva del rischio cardiovascolare.

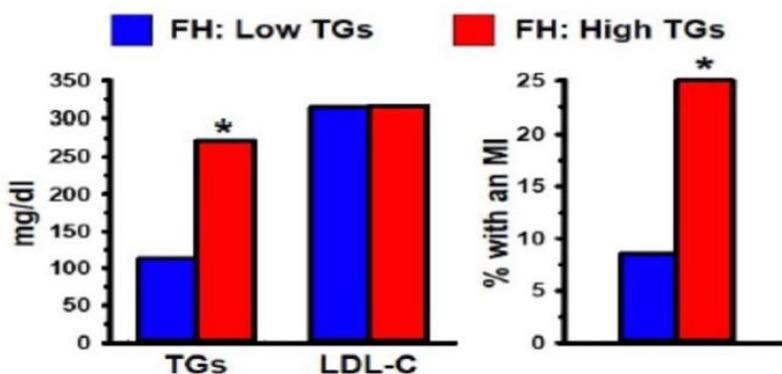
Queste scoperte sottolineano l'importanza di rivalutare e comprendere meglio tutti i markers di rischio cardiovascolare per una gestione più accurata e personalizzata della prevenzione e del trattamento delle malattie cardiovascolari.

### Profilo lipidico aterogeno

Diamond DM et al. con la recentissima review del 2020 sostengono la tesi per cui il marker LDL-C, considerato da solo, è uno scarso indicatore di rischio di CVD, sia nella popolazione generale che nei casi di ipercolesterolemia familiare (12), sottolineando la necessità di rivalutare tutti i markers di rischio cardiovascolare.

Altri studi (13) hanno evidenziato che pazienti con elevati trigliceridi (TG > 200 mg/dl) erano più esposti all'infarto del miocardio rispetto a pazienti con ipercolesterolemia familiare (FH) che avevano livelli di trigliceridi inferiori (TG < 200 mg/dl), indipendentemente dal valore di LDL-C, che era medesimo in entrambi i gruppi di studio.

Inoltre, è stato individuato come l'**ADRT** (*Atherogenic dyslipidaemia risk triad*) sia costituita da elevati livelli plasmatici di trigliceridi (TG) e small-dense-LDL, associati a bassi livelli di HDL. Molti autori hanno evidenziato che l'ipercoagulazione è un fattore di rischio più importante di CHD rispetto ai livelli di LDL-C nei pazienti FH (13)



**Figura 2 (14) Profilo lipidico e ipercolesterolemia familiare**

*A destra:* trigliceridi plasmatici a digiuno (TGs) di uomini con FH in eterozigosi basso (<200mg/dL; blu) o alto (> 200mg/dL; rosso).

*A sinistra:* Il gruppo con alti TG presenta un'incidenza significativamente maggiore di IM rispetto al gruppo con bassi TG. FH, ipercolesterolemia familiare; LDL-C, colesterolo lipoproteico a bassa densità; IM, infarto del miocardio.

Un'importantissima meta-analisi del 2014, che ha coinvolto il Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA) e il Framingham Heart Study (FHS), condotto su una popolazione di 7142 individui di entrambi i sessi che non avevano avuto segnali di Fibrillazione Atriale (AF), ha individuato come in dieci anni di follow-up sia il colesterolo-HDL che i trigliceridi, ma non il colesterolo-LDL né quello totale, sono associati a fattori di rischio di AF (14). Secondo lo studio, alti livelli di HDL e bassi livelli di TG diminuiscono l'incidenza di AF, al contrario, nessuna incidenza di rischio si è avuta con i livelli di colesterolo-LDL.

Un interessante studio indiano (15) ha proposto l'utilizzo di avanzati indici aterogeni (*advanced atherogenic index*, **AAI**) in alternativa a quelli attualmente calcolati, basandosi su una selezione di parametri lipidici. Proprio l'elevata frequenza di CAD anche in soggetti normolipidemicici ha fornito lo spunto per il calcolo di ulteriori indici, statisticamente meglio predittivi della patogenesi dell'aterosclerosi, malattia degenerativa alla base degli episodi di CAD.

I nuovi indici proposti tengono conto specificamente:

- delle LDLs piccole e dense (sd-LDLs),
- dell'apolipoproteina A1 (Apo-A1),
- della lipoproteina A (Lpa),
- dell'apolipoproteina B (Apo-B).

### **Small-Dense LDL (sd-LDL)**

Le lipoproteine a bassa densità (LDL) sono particelle proteiche circolanti, addette al trasporto dei lipidi in tutto l'organismo. Ci sono due diversi fenotipi riguardanti le lipoproteine LDL: un fenotipo A associato a LDLs più grandi e a densità inferiore, ed un fenotipo B con una predominanza di particelle piccole e dense (small dense LDLs, sd-LDL). La lipoproteina a bassa densità più piccola e più densa (sd-LDL) è un biomarcatore emergente per la previsione della malattia cardiovascolare (16).

È stato ampiamente documentato che la sd-LDL risulta più aterogenica rispetto alle altre sottofrazioni LDL. In special modo le sue dimensioni ridotte che ne facilitano una maggiore capacità di penetrazione nella parete arteriosa, e la sua prolungata emivita plasmatica, rappresentano i principali fattori responsabili di aterogenesi.

Secondo il National Cholesterol Education Program (NCEP), solo la metà della percentuale del rischio di malattia coronarica può essere attribuita ai fattori di rischio “convenzionali” (cioè LDL, HDL e trigliceridi), ma fattori di rischio più specifici aumentano il potere predittivo di malattie cardiovascolari e individuano soggetti a rischio che altrimenti potrebbero non essere inclusi.

Le LDLs piccole e dense costituiscono uno di questi indicatori più specifici di rischio, e possono essere indipendenti dagli altri fattori di rischio convenzionalmente considerati ad oggi e da cinquant’anni (16).

La Sindrome Metabolica (detta anche sindrome da insulino-resistenza) è una combinazione pericolosa di alcuni fattori di rischio cardiovascolare che, correlati tra loro, possono dare forma ad un quadro clinico più facilmente esposto al rischio di infarto o ictus. Diversi studi clinici, hanno evidenziato la forte correlazione tra l’elevato numero di sd-LDLs e markers che caratterizzano il “fenotipo lipoproteico pro-aterogeno” (Trigliceridi e Apo-B elevati, bassi livelli di colesterolo-HDL), che spesso coesistono senza comportare evidenti aumenti del colesterolo-LDL (17). L’ipotesi della modificazione ossidativa come uno dei fattori predominanti nell’aterosclerosi, sempre più accreditata dalle ultime review internazionali (18), dà una nuova e importante rilevanza alla determinazione delle sd-LDLs, per la loro suscettibilità molto più alta alla modificazione ossidativa da parte dei ROS. Vi è infatti una marcata correlazione tra l’aumento delle sd-LDLs e l’aumento delle LDL-ossidate.

Nel 2013, l’Associazione Americana di Chimica Clinica (AACC), ha redatto un documento dove si pongono a confronto - come indicatori di aterogenesi – i classici marcatori lipidici con l’Apolipoproteina B (Apo-B) e le particelle sd-LDL; dallo studio è emerso come questi ultimi indicatori siano specificamente più predittivi del rischio cardiovascolare, rispetto al colesterolo-LDL comunemente usato (19).

Recenti review scientifiche (16-19) hanno evidenziato che il colesterolo sd-LDL risulta un marcatore migliore per la valutazione di CVD rispetto al colesterolo-LDL (LDL-C) ed è capace di predire il rischio di CVD anche in individui considerati essere a basso rischio in base ai loro livelli di LDL-C e che i livelli simili di LDL-C possono essere associati a gradi molto diversi di rischio cardiovascolare e l'utilizzo di LDL-C per valutare il rischio di CVD colesterolo-associato, ne

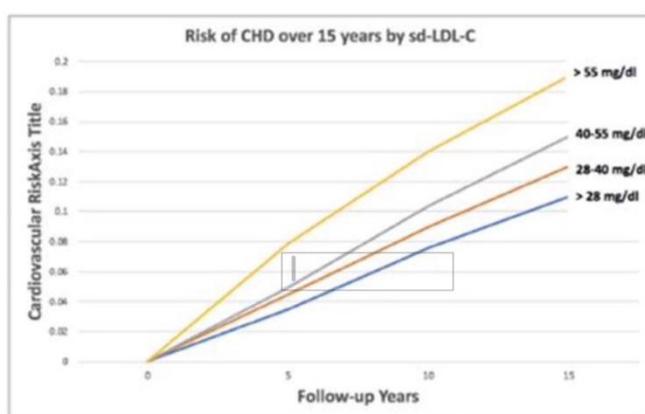
sottostimerà il rischio effettivo in individui che possiedono livelli ottimali di LDL-C ma alti livelli di sd-LDL o viceversa.

Secondo le attuali linee guida AACE (2017), sd-LDL è stato incluso come un “fattore di rischio addizionale” per ASCVD, insieme all’ obesità, alla storia familiare, all’ apolipoproteina B elevata, all’ ipertrigliceridemia, alla PCOS e alla triade dislipidemica (costituita da ipertrigliceridemia, bassi livelli di HDL-C ed un eccesso di sd-LDL). L’ultima Review uscita nel 2022 rafforza ancora di più la determinazione della sottoclasse LDL che migliora sia la previsione del rischio di malattia coronarica sia la guida al trattamento appropriato (19).

Nello studio ARIC (Atherosclerosis Risk in Communities) è stato individuato un cut-off di sd- LDL > 50 mg/dl (1,29 mmol/L) sopra il quale il rischio CAD è aumentato (20).

Inoltre, nello studio ARIC un aumento di sd-LDL ha predetto eventi CVD anche nel gruppo con LDL- C < 100 mg/dL, che inizialmente era ritenuto a basso rischio di malattia coronarica.

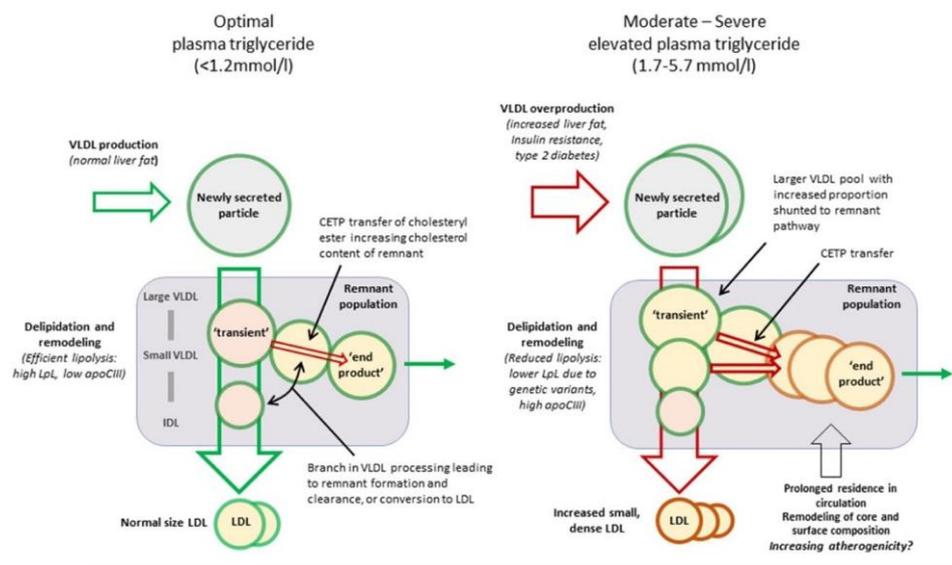
L’importante studio MESA (21) ha dato risultati analoghi, con un aumento significativo di eventi CVD con valori di sd-LDL superiori a 46 mg/dL



**Figura 3** (20) Incidenze cumulative di eventi cardiovascolari nei sottogruppi con LDL-C < 100 mg/dL (< 25° percentile) e/o sdLDL-C < 27,8 mg/dL (< 25° percentile), da modelli di rischio proporzionale aggiustati per età, sesso, e razza.

## Lipoproteine Remnants

Un altro marker aterogeno emergente di rischio cardiovascolare è quello delle Lipoproteine Remnants: durante la lipolisi, la rimozione dei trigliceridi dalla superficie periferica di chilomicroni e VLDL porta ad un aumento di particelle di piccole dimensioni (chilomicroni remnants o TLR remnants) con un ruolo pro-aterogeno e ricche di colesterolo. In una recente review del 2021 (22) gli autori hanno proposto un nuovo modello di rischio cardiovascolare.



**Figura 4** *Metabolismo delle lipoproteine remnant* (22): I residui sono una popolazione di particelle in circolo che sono state parzialmente lipolizzate dalla lipoprotein lipasi. Una lipolisi efficiente (freccia verde larga) porta ad una rapida conversione in lipoproteine a bassa densità, con poca formazione di residui. Le cause dell'accumulo di residui sono la sovrapproduzione di lipoproteine ricche di trigliceridi o l'azione della lipasi compromessa (ma non completamente assente) (freccie rosse). I residui "transitori" nell'intervallo delle lipoproteine a densità molto bassa/lipoproteine a densità intermedia vengono convertiti in lipoproteine a bassa densità; i residui dei chilomicroni non vengono convertiti in lipoproteine a bassa densità. La lipolisi inefficiente aumenta il tempo di residenza dei residui che subiscono un rimodellamento, acquisendo colesterolo (in particolare estere del

colesterolo mediante trasferimento mediato dalla proteina di trasferimento dell'estere del colesterolo) e apolipoproteina (apo) E.

Questo rimodellamento può portare a una particella che non è più suscettibile alla lipolisi —un residuo del '*prodotto finale*'—con un tempo di permanenza prolungato nella circolazione.

CETP, proteina di trasferimento degli esteri del colesterolo; IDL, lipoproteine a densità intermedia; LDL, lipoproteine a bassa densità; LpL, lipoproteina lipasi; VLDL, lipoproteine a densità molto bassa.

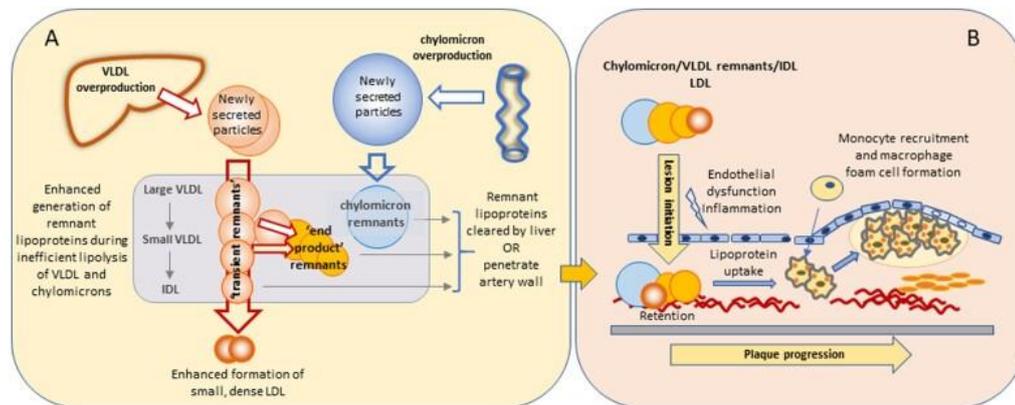
In una efficiente lipolisi (Fig.4), quindi in condizioni di:

- i) livelli di Tg ottimali
- ii) assenza di insulino resistenza
- iii) normale produzione di VLDL

si avrà una rapida conversione a normal size LDL con una bassa produzione di TRL remnant, che in parte vengono lavate attraverso la clearance epatica e in parte convertite ad IDL e successivamente a LDL normal size. In condizioni, invece, di insulino-resistenza o pre-diabete II, con elevati livelli di Tg (moderato-severo-elevato) avremo una cattiva lipolisi ed over produzione di VLDL dalla sintesi epatica. Questa inefficiente lipolisi incrementa l'emivita in circolo delle TRL-remnant, che subiscono un rimodellamento del loro core idrofobico, così da avere una particella che non è più suscettibile a lipolisi e clearance epatica: avremo un "end-product remnant" ed aumentata aterogenicità. A causa delle loro dimensioni ridotte (size < 70 nm), chilomicroni remnants, VLDL-remnants e IDL possono entrare nella parete arteriosa con conseguente accumulo di particelle nello spazio sub- endoteliale. Questi "*TRL-remnants end products*" possono aderire alla matrice extracellulare (specificamente ai proteoglicani): un'interazione potenziata dalla presenza di due apolipoproteine, apo-CIII e apo-E sulla superficie delle particelle dovute in primis al rimodellamento del core idrofobico. La degradazione in situ di TRL-remnants end products rilascia lipidi bioattivi che causano disfunzioni endoteliali ed inflammaging: si avvia il reclutamento di macrofagi-monociti per eliminare le componenti lipidiche depositate con formazione di placche schiumose aterogene e comparsa di lesioni endoteliali. Con ripetuti cicli di ingresso di TRL-remnants e migrazione di macrofagi si genera quindi una placca lipidica (fatty

streaks) instabile. L'erosione o la rottura meccanica della placca possono portare alla formazione di trombi e potenzialmente all'occlusione del lume con un conseguente evento clinico.

I costituenti proteici delle lipoproteine, le apolipoproteine, si trovano legati alla superficie delle lipoproteine e sono in gran parte responsabili delle proprietà, del trasporto e del metabolismo delle lipoproteine. Tra le numerose apolipoproteine, l'apoB è un componente essenziale delle VLDL e dei suoi metaboliti IDL e LDL, nonché dei chilomicroni e dei loro residui. La particella apoB funge da cornice ed è cruciale nel mantenimento della stabilità strutturale della lipoproteina.



**Figura 5 (22)** *Formazione di residui lipoproteici ricchi di trigliceridi e loro ruolo nell'aterogenesi.*

Schema metabolico per la generazione e l'eliminazione di particelle residue di lipoproteine ricche di trigliceridi (A). Nell'ipertrigliceridemia, la sovrapproduzione e la lipolisi inefficiente sia delle lipoproteine a densità molto bassa che dei chilomicroni portano ad un aumento della formazione di residui. I residui lipoproteici ricchi di trigliceridi contribuiscono all'inizio e alla progressione delle lesioni aterosclerotiche (B). La ritenzione delle particelle nello spazio subendoteliale è seguita da infiammazione, deposizione di colesterolo e formazione di cellule schiumose di macrofagi.

Questo *modello aterogeno integrato* proposto recentemente può essere predetto attraverso la **misura diretta delle sd-LDL**: abbiamo visto come la variazione nel metabolismo delle VLDL impatti nella struttura, composizione, e funzione delle LDL. L'ipertrigliceridemia favorisce la formazione di sd-LDL dando origine ad un

lipidoma e proteoma altamente perturbato con un aumento netto del rischio cardiovascolare.

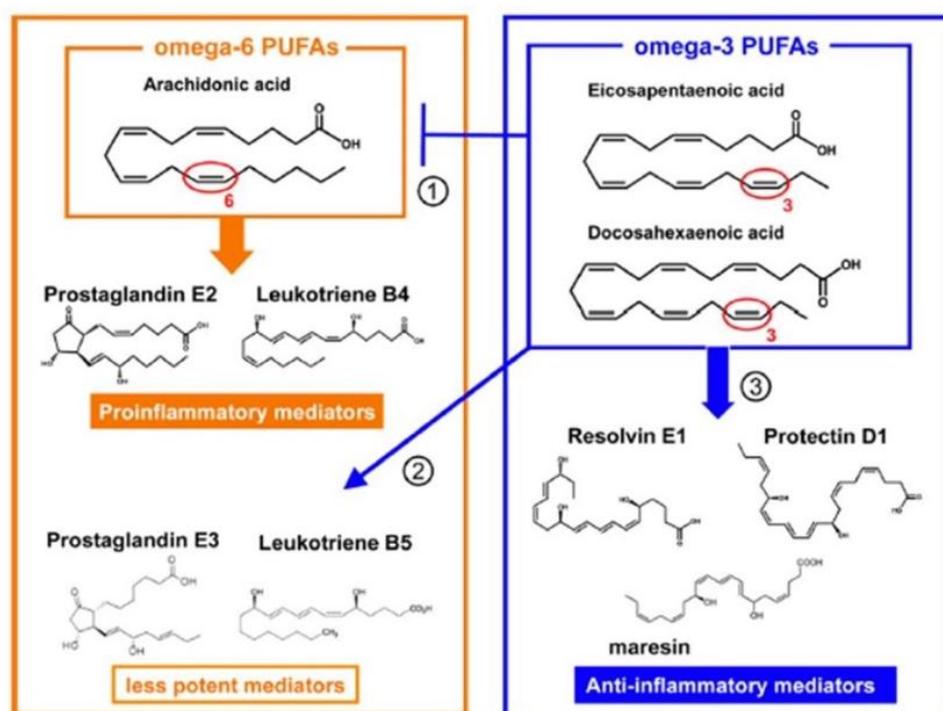
### **Profilo di infiammazione cellulare**

Si definisce “inflammaging” uno stato di infiammazione cronica (persistente) a bassa intensità sviluppato a seguito della perdita dei meccanismi protettivi dell’organismo nei confronti di agenti nocivi ambientali, chimici, fisici e biologici. Tale stato genera una rottura dell’equilibrio omeostatico fisiologico sviluppando, così, malattie croniche su base infiammatoria come cancro, morbo di Alzheimer, patologie cardio-vascolari, accelerando il processo d’invecchiamento. Il nodo centrale del sistema immunitario innato è il fattore di trascrizione NF-kB (fattore nucleare-kB). È questo l’interruttore principale in grado di attivare l’espressione di vari prodotti genici infiammatori, come la cicloossigenasi 2 (COX-2), il fattore di necrosi tumorale –alfa (TNF-alfa), l’interleuchina IL-6 che amplificano la risposta infiammatoria iniziale, segnalando alle cellule circostanti di aumentare la loro attività. Alcuni fattori di matrice alimentare sono in grado di aumentare il fattore di trascrizione NF-kB. Tra questi figurano lo stress ossidativo da eccessivo apporto calorico e l’iper-produzione di ormoni proinfiammatori causata dall’eccesso di Acido Arachidonico (AA).

L’infiammazione è costituita da due fasi distinte: la prima è l’innescò della risposta infiammatoria, la seconda la risoluzione della stessa. La fase risolutiva è controllata da un gruppo di ormoni (resolvine, maresine, protectine) che derivano dagli Acidi grassi Omega\_3 (23). Finchè le fasi di avvio e di risoluzione sono in equilibrio, si ha una omeostasi infiammatoria, se, invece, la prima è troppo forte, o quella risolutiva troppo debole, il risultato è una infiammazione cellulare a bassa intensità. Questo stato cronico a livello cellulare è la forza propulsiva dell’insorgere di obesità, sindrome metabolica, diabete, con le comorbidità associate.

L’effetto anti-infiammatorio degli Omega\_3 può essere focalizzato in tre vie distinte che lavorano in modo sinergico sull’inflammaging cellulare:

1. *Controllare la via della produzione di Acido Arachidonico (AA) attraverso la delta-6 desaturasi, enzima chiave della via Omega\_6, e la delta-5 desaturasi che catalizza la sintesi da DGLA ad AA (ultimo step della cascata Omega\_6). Un aumento del precursore Omega\_3 (Ac. Linolenico, ALA) è in grado di spostare l'equilibrio verso la via Omega\_3 e rallentare la via Omega\_6. Inoltre, alte concentrazioni di  $\omega$ -3 DHA è in grado di rallentare l'azione della delta-6 desaturasi, mentre elevate concentrazioni di  $\omega$ 3 EPA rallentare la via della delta 5 desaturasi.*
2. *Controllare la produzione di mediatori pro-infiammatori in quanto l'EPA è in grado di competere con l'Arachidonico per lo stesso enzima Lipossigenasi per la produzione di Eicosanoidi pro-infiammatori. Un aumento di EPA sposterà l'equilibrio verso la produzione di ormoni risolutivi dell'inflammaging.*
3. *Produrre a partire dagli  $\omega$ -3 EPA e DHA una serie di mediatori ad azione anti-infiammatoria (Resolvine, Maresine, Protectine) che hanno la capacità di risolvere l'inflammazione acuta.*



**Figura 6 (24) Gli step di regolazione dell'inflammaging cellulare**

In una recente Review 2016 vengono descritti tutti i meccanismi biochimici dell'azione cardio-protettiva in chiave anti-infiammatoria degli Omega\_3 (24).

Il giusto equilibrio fra le due famiglie di acidi grassi è dunque fondamentale per il mantenimento o il ripristino delle condizioni di buona salute. L'alimentazione gioca un ruolo fondamentale in quanto la quantità e la qualità degli acidi grassi essenziali introdotti attraverso la dieta influenza la quantità di Omega\_3 ed Omega\_6 nel nostro organismo e, di conseguenza, la produzione di eicosanoidi. Non sarà il singolo valore % di EPA e Arachidonico, nella membrana eritrocitaria, a darci un quadro clinico dell'inflammaging cellulare, bensì il rapporto AA/EPA e il rapporto Omega\_6/Omega\_3.

Sono questi ad oggi i markers più robusti per individuare uno stato di infiammazione cronica, che può derivare da:

- a) deficit nutrizionali (carenza di Omega\_3 da pesce o precursori Omega\_3 da frutta secca)
- b) eccessivo utilizzo di oli vegetali e carne rossa (precursori della via Omega\_6)
- c) stati di insulinemia in Sindrome Metabolica (l'insulina attiva la delta-5 desaturasi, enzima chiave nella produzione di Arachidonico).

Per valutare le unità fondamentali delle classi di acidi grassi che compongono le membrane cellulari dell'organismo su diverse matrici biologiche, ci si avvale della lipidomica eritrocitaria. Essa come tutte le "scienze (-) omiche" ha lo scopo di studiare non solo la struttura, ma anche la funzione e le variazioni (rapporti tra acidi grassi) che vengono a determinarsi in diverse condizioni fisio-patologiche, mettendo in stretta relazione le componenti di membrana con lo stato nutrizionale del paziente e con le sue disfunzioni metaboliche (cambiamenti ormonali, insulino resistenza, obesità etc.) (25 -26). A seguito di quanto detto, le membrane cellulari quindi risultano avere un ruolo di notevole importanza nella regolazione e taratura dell'intero funzionamento cellulare. Da ciò la definizione della membrana come pacemaker metabolico.

### **Utilizzo della lipidomica eritrocitaria nei recenti trials clinici**

Si riportano di seguito alcuni rilevanti studi con focus sulla lipidomica eritrocitaria come analisi diagnostica nell'ambito della prevenzione di patologie cardio metaboliche. Un primo eminente esempio è il Framingham Heart Study (2018) (27), vasto studio osservazionale nato con lo scopo di determinare l'associazione tra il livello di acidi grassi (FA)  $\omega$ -3 e il rischio di morte per qualsiasi causa o per incidenza di patologie cardiovascolari (CVD).

Il marker Omega-3 Index (che dà informazioni sui livelli eritrocitari degli  $\omega$ -3 EPA e DHA, rappresentando la percentuale di EPA e DHA rispetto agli FA totali) è stato utilizzato nello studio di coorte. I risultati presi in considerazione comprendevano sia la mortalità generale sia il totale degli eventi CVD in partecipanti che non li avessero all'inizio dello studio o in precedenza. Tra i 2500 partecipanti si sono registrati 350 morti e 245 eventi CVD nei successivi 7 anni di follow up e un alto Omega-3 Index è risultato, in diversi modelli aggiustati per altre variabili, correlato a un minor rischio di mortalità per tutte le cause ( $p=0.02$ ) e per eventi CVD ( $p=0.008$ ). Nello specifico, i pazienti nel più alto quintile dell'Omega-3 Index (OI > 6.8%) hanno avuto un rischio di mortalità per tutte le cause più basso del 34% e un rischio di eventi CVD inferiore del 39% rispetto ai pazienti presenti nel quintile più basso (OI<4.2%).

In un recente (2021) studio correlato (28), il Framingham Offspring Cohort, viene valutata la lipidomica eritrocitaria come indice predittivo di tutte le cause di mortalità in una popolazione selezionata di sessantenni ( $n=2240$ ), senza noti eventi CVD, negli 11 anni successivi di follow-up. Presupposto dello studio era che una buona o ottima biodisponibilità di FA  $\omega$ -3 risulti associata a un rischio ridotto per tutte le cause di mortalità; ulteriore focus dello studio è stato quello di paragonare i livelli di acidi grassi eritrocitari con fattori di rischio standard per patologie cardiovascolari (CVD), e valutarne l'efficacia predittiva di mortalità.

Specificamente, si è valutata la correlazione di mortalità per tutte le cause rispettivamente con 28 parametri estrapolati dalla lipidomica e con 8 fattori standard di rischio (età, sesso, colesterolo totale, colesterolo HDL, ipertensione, pressione sanguigna sistolica, tabagismo e diabete).

I risultati hanno evidenziato come 4 dei 28 marker eritrocitari sono risultati, in più di 5 modelli, come significativi indici predittivi per tutte le cause di mortalità.

L'importanza del Framingham Heart Study è quindi da individuare sia per quanto riguarda gli emergenti fattori di rischio da considerare per le CVD, sia per lo sviluppo di un "Framingham Risk Score" dato da una baseline di 8 fattori di rischio standard (sopracitati) integrati con biomarkers estrapolati dalla lipidomica eritrocitaria. Gli Fas, più chiaramente associati con una riduzione di rischio CVD, sono stati individuati negli  $\omega$ -3 EPA e DHA, quest'ultimo in maniera più significativa del primo.

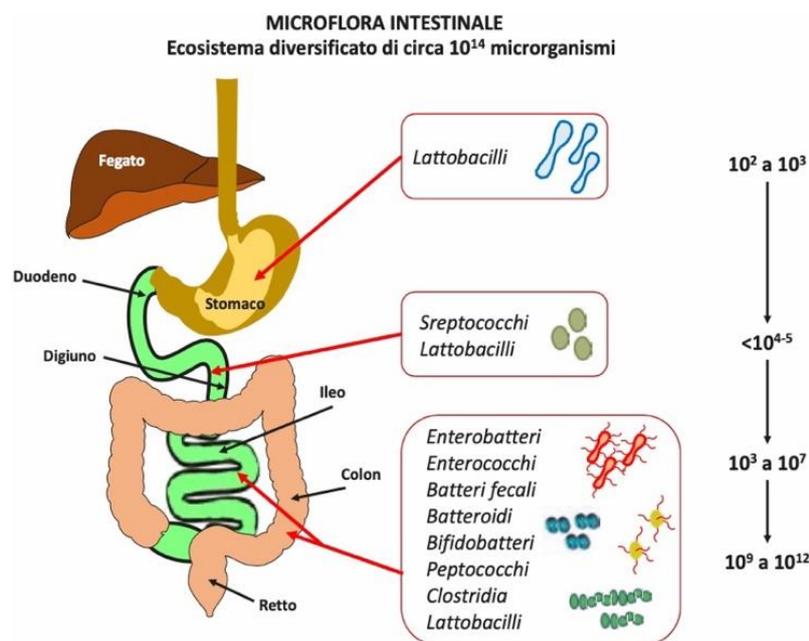
Un altro importantissimo studio su popolazione incentrato sulla lipidomica eritrocitaria arriva dal Canada (30-31). Fin dagli anni 60 in America si è tentato di ottenere un campione rappresentativo di popolazione per asserirne lo stato nutrizionale (con il NHANES, National Health And Nutrition Examination Survey); anche il più recente Canadian Health Measures Survey raccoglie sistematicamente i dati sullo status nutrimetabolico e sulla salute di adulti canadesi. In particolare, il Canada è il primo Paese a raccogliere – formalmente e a livello nazionale - tra i dati di popolazione anche l'Omega-3 Index, unitamente al rapporto di inflamming EPA/AA.

L'assunzione fatta è che un Omega\_3 Index inferiore al 4% sia un indicatore di rischio elevato di eventi CVD fatali, mentre percentuali tra il 4% e l'8% e oltre l'8% individuano, rispettivamente, un rischio intermedio e uno basso. In precedenza, anche nello stesso NHANES si erano costruiti database sulle concentrazioni plasmatiche di  $\omega$ -3 nella popolazione americana, ma si è stabilito come i livelli eritrocitari diano una stima più affidabile e completa nel lungo corso.

Sia dall'indagine canadese che da quella americana, è risultato che la popolazione media ha un Omega\_3 Index che configura un rischio intermedio (4,5%), mentre in Canada il 95° percentile dell'Omega\_3 Index raggiunge il 7,26% ma non supera il 7,80%, confermando che molto meno del 5% della popolazione ha livelli che rientrino nel range desiderabile (>8%). Questi dati sono congruenti con le stime mondiali affrontati in una importante Review del 2016 (32)

## 1.2 Il microbiota intestinale come nuovo marker

Recentemente è emerso il ruolo del microbiota nell'eziogenesi dell'inflammatione endoteliale. L'omeostasi intestinale dipende dall'epitelio intestinale, dal microbiota intestinale e dal sistema immunitario dell'ospite. Con il termine Microbiota si definisce la comunità microbica del tratto enterico - costituita da 100 trilioni di cellule, un numero di cellule 10 volte maggiore rispetto a quelle somatiche- costituita prevalentemente da batteri, oltre a lieviti, parassiti e virus. Quando la composizione della flora è diversificata e bilanciata vi è una condizione definita di eubiosi, importante perché permette alle varie componenti del microbiota intestinale di essere funzionalmente efficaci ed in equilibrio con gli altri componenti dell'ecosistema intestinale. I microrganismi intestinali svolgono un ruolo cruciale nel mantenimento della salute umana. Tra i principali phyla che compongono il microbiota ci sono i Bacteroidetes, i Firmicutes, gli Actinobacteria, i Proteobacteria e i Cerucomicrobia. I Bacteroidetes e i Firmicutes rappresentano la maggior parte del microbiota intestinale, costituendo più del 90% dell'abbondanza relativa (34).

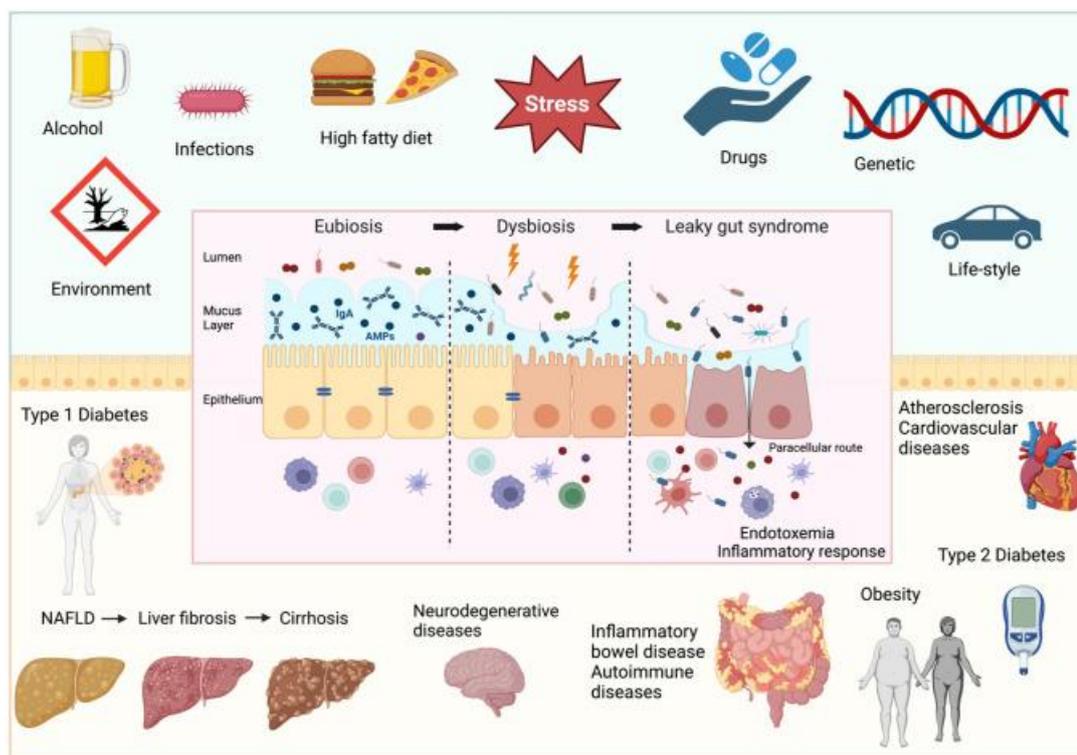


**Figura 7** (35) Biodiversità del microbiota intestinale, caratterizzato da una comunità microbica di circa  $10^{14}$  microrganismi, che colonizza il tratto gastrointestinale dell'ospite, specialmente nella porzione distale, cioè nel colon.

L'equilibrio del microbiota intestinale è fondamentale per diverse funzioni fisiologiche, tra cui la digestione, l'assorbimento dei nutrienti, il mantenimento dell'integrità della mucosa intestinale e la modulazione del sistema immunitario. La disbiosi, ovvero uno squilibrio nel microbiota intestinale, può contribuire allo sviluppo di varie patologie, tra cui malattie cardiovascolari, malattie legate al fegato come la NAFLD (Non-Alcoholic Fatty Liver Disease) e alcuni tipi di cancro. (35) Recenti studi hanno evidenziato un possibile legame tra disbiosi intestinale e lo sviluppo dell'aterosclerosi. Analizzando il genoma intestinale di pazienti con e senza aterosclerosi sintomatica, gli scienziati hanno riscontrato differenze, sia nel tipo che nella quantità di batteri intestinali, tra i pazienti affetti da aterosclerosi e i controlli sani. Questi risultati suggeriscono un potenziale ruolo del microbiota intestinale nello sviluppo e nella progressione delle malattie cardiovascolari, incluso l'infarto del miocardio. (36). La disbiosi intestinale si verifica quando c'è un cambiamento nella composizione e nella diversità del microbiota intestinale e può favorire la traslocazione di batteri vitali o dei loro prodotti, ad esempio LPS, dalla parete intestinale alla circolazione sistemica.

Di fondamentale importanza risulta essere la barriera intestinale. La barriera intestinale è progettata per svolgere una duplice funzione: permettere il passaggio selettivo di sostanze nutrienti dall'intestino al sistema circolatorio, mentre al contempo impedisce la penetrazione di agenti patogeni e altre sostanze dannose. Questo equilibrio delicato è fondamentale per la salute generale. Da un lato, l'assorbimento selettivo dei nutrienti è essenziale per garantire un apporto adeguato di sostanze nutritive necessarie per il corretto funzionamento dell'organismo. Dall'altro lato, la protezione dall'ingresso di agenti patogeni e tossine è cruciale per prevenire infezioni e infiammazioni che potrebbero compromettere la salute.

La violazione dell'integrità della barriera intestinale e il suo alterato funzionamento possono provocare il passaggio incontrollato di componenti batterici, prodotti del metabolismo batterico e sostanze nocive, portando così all'infiammazione sistemica. (36) (fig.8)



**Figura 8** (36) *Fattori che determinano il deterioramento della barriera intestinale e conseguenti malattie sistemiche*

La barriera intestinale è un'entità dinamica che si interfaccia e risponde a diversi stimoli. È composto da più elementi. Il lume intestinale è protetto dai batteri patogeni della bile, dagli acidi gastrici, dal succo pancreatico e dai batteri commensali con i loro metaboliti e sostanze antimicrobiche.

Andando dall'interno verso l'esterno, troviamo un microclima costituito dallo strato di acqua non agitata, dal glicocalice e dallo strato di muco che impediscono l'adesione batterica attraverso la barriera fisica fornita dal glicocalice e dal muco e dalla secrezione di proteine antimicrobiche (AMP) e immunoglobulina A. (IgA). Lo strato intermedio è composto da cellule epiteliali intestinali (IEC), mentre lo strato interno è abitato da cellule immunitarie dell'immunità innata e adattativa. (37) Il muco è una sostanza composta per oltre il 98% da acqua e da glicoproteine, come la mucina 2 (MUC2), MUC6 e MUC5A nello stomaco e MUC2 nell'intestino tenue e crasso, secrete dalle cellule caliciformi. Il muco ha due componenti: uno strato interno saldamente aderente con batteri sparsi e peptidi secreti protettivi con

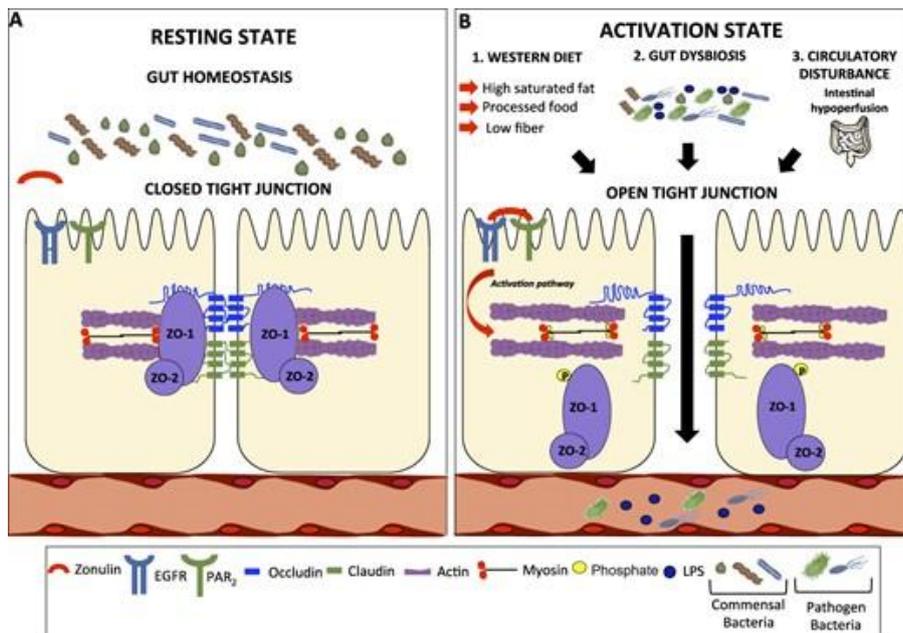
funzioni antibatteriche (es. lisozima e defensine) e uno strato esterno più spesso e lasco, ricco di batteri e prodotti batterici. Lo strato di muco nel colon è più spesso, rispetto all'intestino tenue, dove la dimensione dei pori varia da 4 a 5 Å sulla punta dei villi fino a oltre 20 Å alla base della cripta. Per questo motivo, nell'intestino tenue, gli enterociti, le cellule di Paneth e le cellule immunitarie secernono prodotti antimicrobici per la difesa dell'ospite. Lo strato di muco ha una relazione mutualistica con il microbiota intestinale, influenzandosi a vicenda. (38)

Lo strato di muco funge da fonte di energia e carbonio per i batteri che risiedono nel muco. I cosiddetti "microrganismi associati al muco" (MAM) possono vivere, grazie alla presenza di mucine glicani sia secreti che transmembrana, che fungono da siti di attacco ai componenti che legano i glicani dei microrganismi, influenzando così la composizione dei MAM (39).

Questi batteri, che risiedono in un ambiente ricco di glicani, sono in grado di digerire il muco attraverso enzimi che lo degradano, come solfatasi, glicosidasi, neuraminidasi, galattosidasi, cisteina proteasi e sialidasi che scindono il muco, producendo acidi grassi a catena corta (SCFA). Vengono poi assorbiti e utilizzati dai colonociti per recuperare parte dell'energia utilizzata per la costosa sintesi e secrezione della mucina. All'interno del muco è presente un'ampia gamma di batteri che lo degradano: *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Akkermansia muciniphila*, *Bacteroides fragilis*, *Bifidobacterium bifidum* e *Ruminococcus gnavus*.

Queste specie possono scindere gli O-glicani del muco per produrre monosaccaridi, che, a loro volta, vengono utilizzati da altri batteri residenti per produrre acidi grassi a catena corta (SCFA) attraverso il processo di fermentazione. (40)

L'epitelio intestinale è composto da cinque diversi tipi di cellule: enterociti, cellule caliciformi, cellule enteroendocrine, cellule di Paneth e cellule microfold. Tutte queste cellule vengono rinnovate dallo stesso pool di cellule staminali che risiedono nelle cripte intestinali (41) La sua integrità è supportata dalle proteine giunzionali, come le giunzioni strette (TJ), desmosomi e giunzioni aderenti, che collegano le cellule epiteliali adiacenti, insieme alla lamina propria formando una barriera fisica. (fig.9)

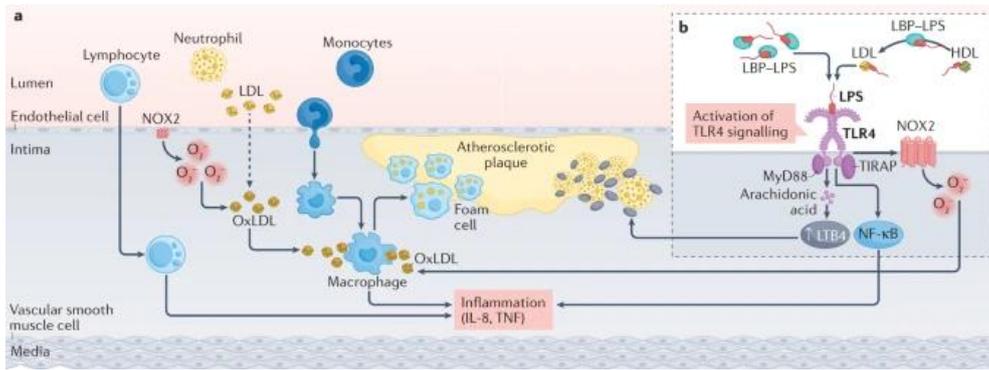


**Figura 9 (35) (A)** Stato di riposo: il microbiota svolge un ruolo nel mantenimento della barriera intestinale, essenziale per l'omeostasi e la funzionalità dell'intestino. In questa condizione, le proteine a giunzione stretta (TJ) sono coinvolte in interazioni proteina-proteina che mantengono TJ chiuso in uno stato competente.

**(B)** Stato di attivazione: diversi fattori come, dieta occidentale, microbiota disbiotico caratterizzato da composizione alterata, ridotta diversità e stabilità, maggiore quantità di batteri contenenti LPS, disturbi circolatori (ipoperfusione): favoriscono l'attivazione della zonulina che transattiva il recettore del fattore di crescita epidermico (EGFR) attraverso il recettore 2 attivato dalla proteinasi (PAR2).

La fosforilazione di zonula occludens 1 (ZO-1) e miosina e la polimerizzazione dell'actina causano lo spostamento di ZO-1 e zonula occludens 2 (ZO-2) dal complesso giunzionale aprendo così la TJ intestinale.

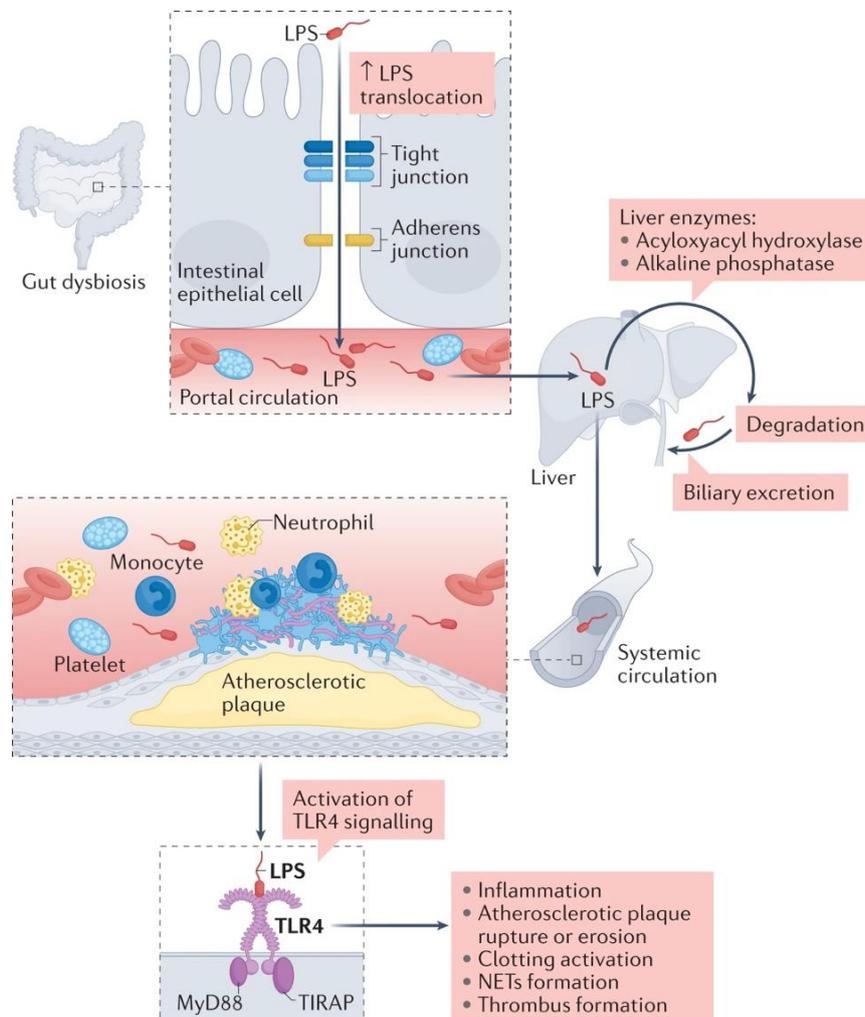
Alcuni studi dimostrano che *Akkermansia muciniphila*, che rappresenta il 3-5% del microbiota negli individui sani, migliora l'integrità della barriera intestinale stimolando la produzione di mucina e la complessa interazione con i batteri intestinali ed è associata a infiammazione sistemica di basso grado in modelli umani e animali, insulina sensibilità e magrezza. Infatti, le vescicole extracellulari derivate da *A. muciniphila* aumentano l'espressione delle proteine delle giunzioni strette (TJ), come quelle occlusive (OCLN), riducendo così la permeabilità intestinale.(42) Recenti studi sperimentali e clinici hanno scoperto che il microbiota intestinale è implicato nel processo aterosclerotico. Ad esempio, la trimetilammina N-ossido, che deriva dalla conversione microbica dei nutrienti alimentari contenenti colina, fosfatidilcolina e L-carnitina, possiede attività pro-aterogena e pro-trombotica ed è associata al rischio cardiovascolare (43). Anche altri prodotti del microbiota intestinale, come l'LPS. Il lipopolisaccaride (LPS), noto anche come lipoglicano o endotossina, è un componente della parete cellulare dei batteri Gram-negativi, è composto da carboidrati e da una porzione di lipide A. L'importanza dell'LPS e della permeabilità intestinale nell'aterosclerosi è ulteriormente confermata dalla presenza di circa 100 trilioni di batteri intestinali, che contribuiscono a un serbatoio enterico di oltre 1 grammo di LPS che viaggia nella circolazione di soggetti sani in un intervallo compreso tra  $\approx 10$  e 200 pg/mL. (44) Grazie ai chilomicroni, LPS può traslocare nella circolazione dove viene trasportato dalla proteina legante l'LPS. Nella circolazione sanguigna le lipoproteine possono legarsi a LPS, trasportarlo a livello epatico per favorirne, grazie alla degradazione enzimatica, l'eliminazione e l'escrezione attraverso la bile. Le lipoproteine principalmente implicate nel processo di eliminazione sono le Lipoproteine ad alta densità (HDL), al contrario, le lipoproteine a bassa densità (LDL) risultano essere poco efficienti in questo processo. Livelli circolanti di LPS superiori a 20 ng/ml determinano una condizione di infiammazione di basso grado, nota come endotossiemia di basso grado.



**Figura 10** (44) *Meccanismi dell'aterosclerosi mediata da LPS*

**a)** Le LDL possono attraversare la parete arteriosa e subire ossidazione nello spazio subendoteliale, portando alla formazione di LDL ossidate (oxLDL). L'OxLDL viene assorbito dai macrofagi, inducendo la formazione di cellule schiumose e la produzione di citochine infiammatorie. **b)** I lipopolisaccaridi (LPS) possono penetrare nella parete arteriosa, sia insieme alla proteina legante l'LPS (LBP) sia mediante il trasferimento di LPS mediato da LBP dalle particelle HDL a LDL. L'LPS si lega al recettore Toll-like 4 (TLR4) in diversi tipi cellulari, portando alla fosforilazione della proteina adattatrice contenente il dominio del recettore Toll-interleuchina-1 (TIRAP) e al reclutamento della proteina di risposta primaria di differenziazione mieloide 88 (MyD88) nel citoplasma dominio di TLR4. La segnalazione a valle induce l'attivazione del fattore di trascrizione nucleare fattore  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), che aumenta la produzione di citochine proinfiammatorie, come IL-8 e il fattore di necrosi tumorale (TNF); stress ossidativo attraverso la sovraregolazione delle specie reattive dell'ossigeno derivate dalla NADPH ossidasi 2 (NOX2), che promuove ulteriormente l'ossidazione delle LDL; e destabilizzazione della placca aterosclerotica attraverso l'attivazione della via dell'acido arachidonico e la biosintesi del leucotriene B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>), che attraggono i leucociti verso la lesione aterosclerotica. O<sub>2</sub><sup>-</sup>, superossido.

Un'alterazione nella degradazione di LPS a livello epatico o un'alterazione della permeabilità intestinale, spesso causata da una compromissione delle giunzioni strette nell'intestino, potrebbero determinare l'instaurarsi di endotossitemia di basso grado. Una volta che gli LPS entrano nella circolazione, possono attivare il sistema immunitario innato attraverso i recettori del tipo Toll-like (TLR), come TLR2, TLR4 e TLR9. L'interazione tra le LPS e i recettori TLR può promuovere l'infiammazione arteriosa, la formazione di trombi e all'aterosclerosi. Questo processo può essere influenzato da un aumento della traslocazione di LPS dall'intestino alla circolazione portale e da una ridotta capacità del fegato di degradare gli LPS. (44)



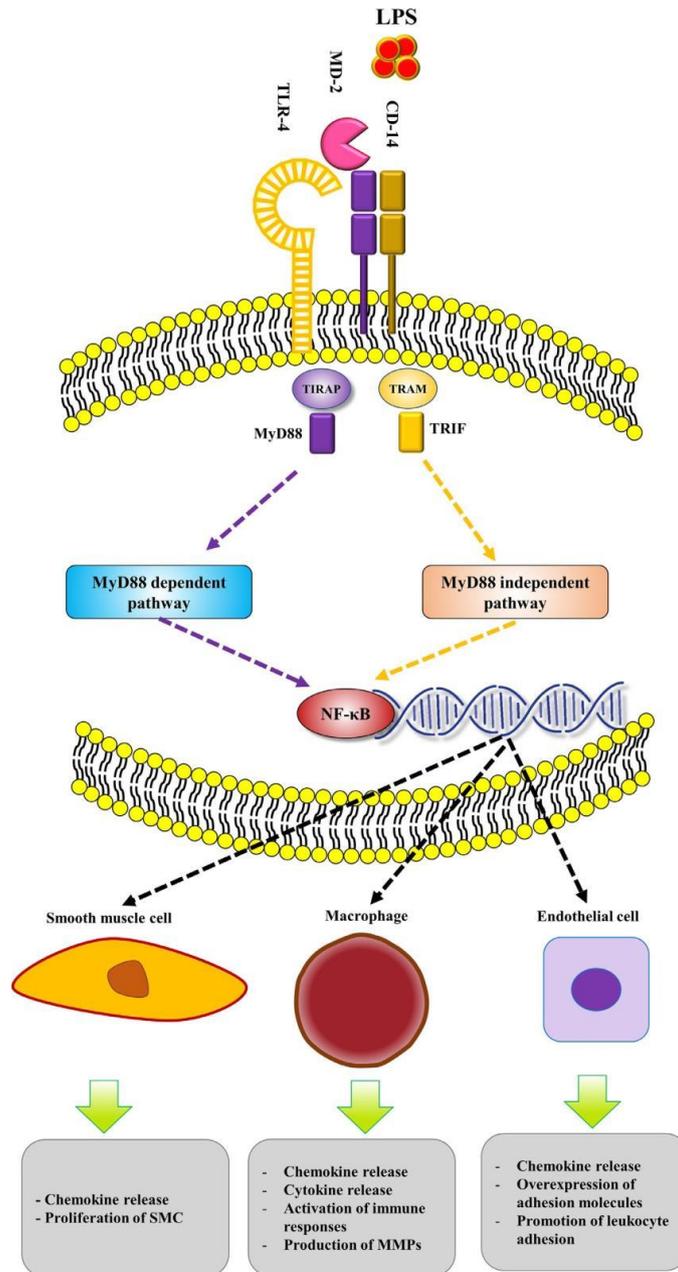
**Figura 11** (44) *Interazione tra endotossitemia di basso grado e malattia vascolare*

Il lipopolisaccaride (LPS) può penetrare nel flusso sanguigno sistemico a seguito di una riduzione delle proteine di adesione intestinali causata dalla disbiosi intestinale. Normalmente, l'LPS è metabolizzato nel fegato ed escreto attraverso la bile, ma se questo processo è compromesso, può persistere nel flusso sanguigno.

Una volta nelle arterie, l'LPS può legarsi al recettore Toll-like 4 (TLR4) espresso su diversi tipi di cellule, come i leucociti, le cellule endoteliali e le piastrine, innescando una risposta infiammatoria incontrollata che può portare a instabilità delle placche, attivazione dei leucociti e coagulazione del sangue, aumentando così il rischio di trombosi e complicazioni cardiovascolari. (Fig.11) (45)

Il microbioma intestinale dei pazienti aterosclerotici può favorire l'infiammazione producendo più molecole pro-infiammatorie; la scoperta che le placche aterosclerotiche contengono DNA batterico e che i taxa batterici osservati nelle placche erano presenti anche nell'intestino degli stessi individui evidenzia ulteriormente il ruolo del microbiota intestinale nelle malattie aterosclerotiche. (46) Inoltre, gli studi hanno dimostrato che livelli subclinici di LPS sono associati al rischio di sviluppare aterosclerosi, specialmente dopo infezioni croniche batteriche. Le infezioni virali croniche, al contrario, sembrano avere un impatto minore. Questi risultati suggeriscono che l'LPS svolga un ruolo significativo nelle complicazioni cardiovascolari, inclusa l'aterosclerosi. Il sistema immunitario innato, che rappresenta la prima linea di difesa del corpo, risponde rapidamente agli antigeni, anche se in modo non specifico e senza sviluppare memoria. I recettori di riconoscimento dei modelli (PRR), come i recettori Toll-like (TLR), giocano un ruolo fondamentale nel rilevare e rispondere agli agenti patogeni. Il legame dei PRR agli antigeni bersaglio provoca una segnalazione a valle che genera una serie di risposte infiammatorie. Ogni TLR ha una particolare localizzazione cellulare e ligandi specifici: TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 e TLR6 sono recettori di superficie delle cellule e sono deputati principalmente all'identificazione di componenti batterici. D'altra parte, i TLR intracellulari, tra cui TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9 riconoscono gli antigeni dell'acido nucleico che di solito sono presentati da virus e batteri intracellulari. Il TLR4 riconosce l'LPS e l'attivazione di questo recettore induce risposte infiammatorie che possono contribuire allo sviluppo

dell'aterosclerosi. Durante la segnalazione dell'LPS, diverse molecole di superficie, come la proteina legante LPS (LBP), la proteina di differenziazione mieloide 2 (MD-2), il recettore Toll-like 4 (TLR4) e CD14, svolgono un ruolo importante nell'attivare la risposta infiammatoria. Queste molecole sono principalmente presenti sui macrofagi e sui monociti nella parete del vaso e, interagendo tra loro, danno il via a una cascata di segnali coinvolgendo proteine chinasi come IRAK-1 e MyD88, che alla fine attivano il fattore nucleare NF- $\kappa$ B e inducono la produzione di mediatori infiammatori. In vari modelli animali e nell'uomo, le placche aterosclerotiche esaminate hanno confermato l'espressione di TLR-4 in particolar modo sui macrofagi infiammatori e sulle cellule endoteliali. TLR-4 può riconoscere anche molecole diverse dall'LPS, come l'ialuronano, le proteine da shock termico e il dominio EDA della fibronectina. Anche il recettore CD14 risponde a LPS. Nei macrofagi delle placche aterosclerotiche, CD14 può essere rilasciato in forma solubile e livelli elevati di CD14 solubile sono stati associati allo sviluppo di placche carotidi e alla rigidità delle arterie aortiche. (Fig.12) (46).



*Figura 12 (46) Panoramica della segnalazione TLR-4 indotta da LPS che è coinvolta nell'aggravamento dell'aterosclerosi.*

### **1.3 Il ruolo dell'alimentazione, dello stile di vita e della nutraceutica**

Il consumo di acidi grassi saturi favorisce l'assorbimento intestinale di LPS e può anche indurre l'attivazione di TLR-4, stimolando e amplificando ulteriormente la risposta infiammatoria. Questo dimostra un collegamento diretto tra dieta, microbiota intestinale e rischio di malattie cardiovascolari: Il consumo di acidi grassi saturi può favorire l'assorbimento intestinale di LPS, contribuendo così all'infiammazione e alla progressione dell'aterosclerosi. Il legame tra dieta, recettori come CD14 e TLR-4 e risposta infiammatoria offre una prospettiva importante sul ruolo della dieta nell'insorgenza e nello sviluppo dell'aterosclerosi. (46)

Lo studio condotto dal Dott. Daniele Pastori e colleghi (47) ha evidenziato una correlazione tra livelli elevati di lipopolisaccaride (LPS) sierico, derivato dall'intestino, e un aumentato rischio di eventi cardiovascolari avversi maggiori nella fibrillazione atriale. Questo studio ha anche valutato l'effetto dell'aderenza alla dieta mediterranea su questa associazione. I ricercatori hanno riscontrato che livelli più alti di LPS sierico erano associati a un rischio maggiore di eventi cardiovascolari avversi nella popolazione con fibrillazione atriale. Tuttavia, hanno anche scoperto che una maggiore aderenza alla dieta mediterranea poteva ridurre questo rischio, suggerendo che le abitudini alimentari possono influenzare il rapporto tra LPS e rischio cardiovascolare. (fig.13)

	Foods	Intake	Median LPS	P Value
1.	Olive oil ( $\geq 1$ tablespoon/d)	Yes	50.0 (15.0-101.0)	0.273
		No	58.0 (22.0-112.0)	
2.	Fruit ( $\geq 1$ serving/d)	Yes	48.0 (15.0-100.0)	0.009
		No	73.0 (26.0-120.6)	
3.	Vegetables or salad ( $\geq 1$ serving/d)	Yes	49.0 (15.0-100.0)	0.195
		No	56.0 (18.0-112.0)	
4.	Fruit ( $\geq 1$ serving/d) and vegetables or salad ( $\geq 1$ serving/d)	Yes	48.0 (14.0-100.0)	0.164
		No	55.0 (20.0-110.0)	
5.	Legumes ( $\geq 2$ servings/w)	Yes	45.0 (11.0-96.0)	0.005
		No	56.0 (20.0-108.0)	
6.	Fish ( $\geq 3$ servings/w)	Yes	45.5 (12.0-105.0)	0.402
		No	52.5 (17.0-105.0)	
7.	Wine ( $\geq 1$ glass/d)	Yes	49.0 (12.0-104.0)	0.186
		No	51.0 (20.0-105.0)	
8.	Meat ( $< 1$ serving/d)	Yes	50.0 (14.5-100.0)	0.085
		No	56.0 (20.0-120.0)	
9.	Bread (both white bread [ $< 1$ /d] and rice [ $< 1$ /w]) or whole-grain bread ( $> 5$ /w)	Yes	48.5 (15.0-95.0)	0.382
		No	53.0 (18.0-105.0)	

**Figura 13(47)** Livelli di LPS circolanti in base ai singoli alimenti

La dieta mediterranea, nota per essere ricca di alimenti vegetali, grassi monoinsaturi e pesce, è stata associata a numerosi benefici per la salute cardiovascolare. In questo studio, sembra che la dieta mediterranea possa esercitare un effetto protettivo attraverso meccanismi che influenzano il livello di LPS sierico e il rischio cardiovascolare associato. Questi risultati suggeriscono l'importanza di considerare non solo i fattori di rischio tradizionali, ma anche i marcatori di infiammazione intestinale come gli LPS nella valutazione del rischio cardiovascolare nei pazienti con fibrillazione atriale.

Inoltre, promuovendo l'aderenza alla dieta mediterranea, si potrebbe ridurre il rischio di eventi cardiovascolari avversi in questa popolazione. I nutraceutici stanno emergendo come una possibile soluzione per migliorare la compliance dei pazienti e ottimizzare gli effetti positivi degli interventi sullo stile di vita nella riduzione del rischio cardiovascolare. Integrare nutraceutici nella dieta o sotto forma di integratori alimentari può essere particolarmente utile quando alcuni nutrienti essenziali non sono presenti in quantità sufficienti negli alimenti comuni o quando è difficile ottenere dosi terapeutiche attraverso la sola dieta. Tuttavia, è importante sottolineare che mentre i nutraceutici possono offrire vantaggi aggiuntivi, non dovrebbero mai sostituire una dieta sana ed equilibrata o uno stile di vita attivo.

## **2. MATERIALI E METODI**

### **2.1 Ipotesi di lavoro**

Nella costruzione di un modello di calcolo predittivo di rischio Cardio Metabolico, sono stati distinti quattro profili di rischio precedentemente analizzati, che in maniera sinergica possono avviare dei processi aterogeni e degenerativi. In ognuno dei profili di rischio sono stati considerati sia i markers canonici sia biomarcatori integrativi proposti per una predittività maggiore, che richiedono analisi cellulari più specifiche.

#### **1. Profilo Lipidico aterogeno (50-51)**

Markers proposti:

- Pannello lipidico classico (LDL, HDL, Trigliceridi, Colesterolo Totale)
- APO-B
- sd-LDL
- Lipoproteina a

#### **2. Infammaging cellulare (52-53-54)**

Markers proposti:

- Rapporto di infammaging AA/EPA o Omega\_6/Omega\_3 (da lipidomica eritrocitaria)
- Omega\_3 Index (da lipidomica eritrocitaria)
- Omocisteina

#### **3. Profilo ossidativo (55-56)**

Markers proposti:

- d-ROMs (perossidazione lipidica)

#### **4. Profilo di insulino-resistenza (57)**

Markers proposti:

- Rapporto Trigliceridi/HDL
- Homa Index

Questi parametri sono stati organizzati e associati tra loro in un foglio operativo Excel, in cui verranno inseriti – sempre preliminarmente – valori numerici plausibili per il disegno di profili clinici di rischio.

## 2.2 Questionario anamnestico del paziente

La parte che segue è uno studio osservazionale, svolto su pazienti del dottor Antonio Fusco, cardiologo specializzato in prevenzione delle malattie cardiovascolari, il quale si è occupato di raccogliere il consenso per il trattamento dei dati in anonimo dai pazienti sia in cura da lui stesso, sia ambulatoriali ospedalizzati in seguito a eventi cardiovascolari.

I pazienti selezionati (n=232) hanno compilato un consenso firmato per il trattamento dei dati e un Questionario anamnestico complessivo in cui sono stati estrapolati:

- Dati preliminari
  - Età
  - Sesso
  - Altezza, peso, circonferenza addominale
  - Fumo e alcool
  - Pressione arteriosa
  - Terapie ormonali: (anticoncezionale, EP ad uso terapeutico o sostitutiva) e farmacologica (pillole ipertensione, statina, anti-infiammatori FANS, corticosteroidi, gastro-protettori)
  - Alvo intestinale (normale, tendente alla stitichezza, tendente Diarroico) e persistenza di disturbi gastrointestinali cronici (gonfiore cronico, colon irritabile, reflusso gastrointestinale)
  - Elenco di patologie diagnosticate e/o ipertensione (indicando anche l'anno in cui è stata diagnosticata la patologia e se ancora persiste)
  
- La qualità del sonno
  
- Disturbi atopici e psicofisici (Psoriasi, allergie cutanee, dermatiti, cefalee, spossatezza, problemi intestinali, depressione etc).

- Familiarità a:
  - Malattia Tumorale
  - Malattia Cardiovascolare (ictus, infarto, angina pectoris, placca aterosclerotica etc.)
  - Patologie degenerative e auto immuni (Parkinson, Alzheimer, Demenza senile, artrite reumatoide etc.)
  - Diabete Mellito II
  - Obesità

La familiarità viene considerata in un'età inferiore ai 75 anni.

- Indice di stress-psicofisico del paziente
- Il livello di attività fisica settimanale
- Strategia alimentare utilizzata e da quanto tempo:
  - Paleozona
  - Life 120
  - Dieta a zona
  - Mediterranea con basso consumo di carboidrati
  - Chetogenica
  - Vegana
  - Non saprei identificare nessuna di quelle sopra citate
- Il quantitativo di olio di oliva consumato
- Elenco degli esami ematochimici effettuati in passato fuori range o patologici
- Elenco e posologia degli integratori assunti negli ultimi 4 mesi

### 2.3 Costruzione del database

Date le evidenze scientifiche finora disaminate, viene proposto un *modello di calcolo* predittivo del rischio cardio-metabolico che tenga conto di markers che possono dare un valore aggiunto al clinico nel fare prevenzione e diagnosi. In base all’intervallo di punteggi associato ad ogni marker, e all’effettivo punteggio assegnato (individuato in base al valore), la sommatoria di tutti i punti andrà a individuare una precisa *fascia di rischio*. Si propone l’associazione per “pannelli” – correlati ai sinergici profili di rischio – dei markers disaminati nei capitoli precedenti, in un foglio operativo Excel così costruito:

RISCHIO CARDIO METABOLICO									
Dati Anamnestici Raccolti									
Nome	Cognome	Età	fumo	Iper-tensione	Familiarità				
					Patologie CAD (infarto, ictus etc.)	Patologie Degenerative	Diabete	Obesità	
									0 - 10 PUNTEGGIO MASSIMO

#### Pannello di familiarità e abitudini

Nel primo pannello si inseriscono dei punteggi in base sia alle abitudini individuali, sia alla familiarità con varie patologie – sia CAD che degenerative e croniche. Questo con lo scopo di schematizzare la *predisposizione genetica ed epigenetica* del soggetto, al netto dei valori dei markers di rischio specifici indagati e risultanti dalle analisi. Più il punteggio è alto più il quadro finale è favorevole/ottimale, ossia associato a un rischio minore; quindi, si assegnano:

- -1 punti se il soggetto fuma o se soffre di ipertensione
- -1 punti a seconda che abbia uno o entrambi i genitori, fratelli, che

soffrono/hanno sofferto di patologie CAD/patologie degenerative/diabete/obesità

In caso il soggetto non fumi e non soffra d’ipertensione, 1 punto alle due voci; se non ha alcuna familiarità con le suddette patologie, 2 punti ad ogni parametro.

Il punteggio massimo associato a questo pannello è quindi di 10.

## Profilo Lipidico aterogeno

RISCHIO LIPIDICO ATEROGENO						
		punteggio		APO-B	sd-LDL	Lipoproteina a
APO-B (mg/dl)	0	Ottimale	< 120 (PUNTI 1)	< 1 (PUNTI 3)	< 50 (punti 2)	
sd-LDL (mmol/L)	0	Critico	120 - 140 (PUNTI 1)	1 - 1.25 (PUNTI 0.5)	50 - 75 punti 1	
Lpa (nmol/L)	0	Molto critico	> 140 (PUNTI 0)	25 (PUNTO NEGATIVO)	> 75 (punti 0)	
		0	0	12 PUNTEGGIO MASSIMO		

A individuare un profilo lipidico potenzialmente aterogeno concorrono i valori dell'apolipoproteina-B (*apo-B*), delle *sd-LDL* e della lipoproteina (*a*).

Sono stati inseriti i valori delle *sd-LDL* (small dense-LDL) poiché i valori di quest'ultime sono correlati statisticamente ai valori di apo-B, LDL-C e ox-LDL.

Si assegnano i punteggi in base ai range segnati in tabella, e si moltiplica poi la somma dei punti ottenuti per il valore assegnato in precedenza nel pannello della familiarità alla voce "patologie CAD". Si configura quindi un punteggio massimo di 14 (7 punti x 2, valore massimo assegnato nel primo pannello) per questo profilo. Valori di *sd-LDL* sopra il cut-off aterogeno sono considerati ad alto rischio cardiovascolare e verrà assegnato un punto negativo al conteggio finale. Per confrontare questo punteggio con dei valori predittivi del rischio CAD presenti in letteratura, sono stati calcolati i valori del Lipid Tetrad Index (LTI) e del Lipid Pentad Index (LPI) (58) e del rapporto apo-B/apo-A frequentemente utilizzato in routine. Questi due parametri legano fortemente i valori della Lpa con gli altri indici aterogeni lipemici (Colesterolo Totale, Colesterolo HDL, Trigliceridi per LTI e Apo-b, Apo-a, Colesterolo Totale, Trigliceridi per LPI).

## Profilo di infiammazione cellulare

INFLAMMAGING (indici di infiammazione cellulare)			
		punteggio	
Rapporto AA/EPA		AA/EPA	% Omega_3 Index
% Omega_3 Index		Ottimale	Omocisteina
Omocisteina (umol/L)		<6 (PUNTI 3)	> 8 (punti 3)
		Buono	< 13 (punti 2)
		Critico	tra 7 e 15 (PUNTI 2)
		Molto critico	6 - 8 (PUNTI 2)
			tra 15 e 30 (PUNTI 1)
			4 - 6 (PUNTI 0)
			13 - 16 (punti 1)
			> 30 (PUNTI 0)
			4 (PUNTO NEGATIV)
			> 16 (PUNTI 0)

Per osservare invece lo stato di infiammazione e ossidazione cellulare (inflammaging), si propone di monitorare con la lipidomica eritrocitaria il *rapporto AA/EPA* e l'*Omega-3 Index*. Un *Omega\_3 Index* sotto al valore del 4% è stato accertato essere un rischio cardiovascolare elevato, che verrà considerato con un valore negativo di un punto nel conteggio finale. L'altro marker analizzato e frequentemente utilizzato in routine è l'omocisteina (59).

L'iperomocisteinemia è uno dei fattori di rischio per l'insorgenza di malattie cardiovascolari, in quanto promuove l'aterosclerosi e l'instaurarsi di uno stato pro-infiammatorio, che favorisce lo sviluppo di trombosi, infarto e ictus ischemico. L'alimentazione gioca, anche in questo caso, un ruolo importante; infatti, è stato osservato che la carenza di alcune vitamine del gruppo B, coinvolte nel metabolismo dell'omocisteina, è correlata all'aumento della concentrazione plasmatica di questa sostanza. Un adeguato apporto di tali nutrienti, associato a un corretto stile di vita, è in grado di mantenere i livelli ematici di omocisteina sotto controllo.

L'aumento della concentrazione plasmatica di omocisteina è collegato a maggior rischio di malattie cardiovascolari, in quanto:

- Promuove l'aggregazione piastrinica e la riduzione della produzione di ossido nitrico, importante regolatore del tono vascolare;
- Favorisce lo stress ossidativo, in quanto determina l'aumento di specie reattive dell'ossigeno (ROS) le quali non solo danneggiano DNA, proteine, carboidrati e lipidi, ma contribuiscono anche all'ossidazione delle lipoproteine deputate al trasporto dei lipidi nel sangue, processo che si è visto essere alla base dello sviluppo dell'aterosclerosi;

- Blocca gli enzimi coinvolti in reazioni di transulfurazione, provocando la deplezione di H<sub>2</sub>S, anch'esso un mediatore importante nell'omeostasi endoteliale e nell'inibizione dell'aterogenesi;
- Provoca l'errata incorporazione dell'omocisteina nelle proteine, generando complessi tossici, come l'omocisteina-tiolattone, in grado di interferire con la coagulazione del sangue e con vie di segnalazione biochimiche, ad esempio nella risposta all'insulina;
- Determina l'accumulo di S-adenosilhomocisteina, un inibitore di metiltransferasi che causa ipometilazione e di conseguenza alterazione di reazioni importanti per l'omeostasi vascolare. Tutti questi fattori compromettono la funzione endoteliale, promuovendo lo sviluppo di uno stato pro-infiammatorio e pro-trombotico, con conseguente aumento del rischio di infarto, ictus ischemico, trombosi ed embolia polmonare. Nel foglio operativo, per questo pannello si associano i punteggi in base ai range indicati in tabella. Non dovendolo moltiplicare per alcun indicatore nel primo pannello, il punteggio massimo configurato è di 8.

## Profilo Ossidativo

AZIONE OSSIDANTE	
d-ROMs (U.C.)	punteggio
	ottimale < 320 (PUNTI 4)
	lieve 321 - 360 (PUNTI 3)
	medio 361 - 399 (PUNTI 2)
	forte stress 400 - 500 (PUNTI 0)
	PATOLOGICO > 500 (due punti negativi)
	8 PUNTEGGIO MASSIMO

Per inquadrare lo stato ossidativo (cioè l'aging cellulare) del soggetto, il valore di cui tenere conto è quello dei *d-ROMs*. Si tratta di un test quantitativo, rapido e utilizzato in numerosi trials clinici per determinare il danno ossidativo (produzione dei *lipoperossidi*) subito dalle membrane cellulari ad opera dei *ROMs* (Reactive-Oxygen-Metabolites). Il test è altamente riproducibile rispetto ad altri markers utilizzati in fase di ricerca (MDA, Isoprostani urinari in metodica ELISA) con limiti di riferimento definiti dall'Osservatorio Italiano sullo Stress Ossidativo ed espressi in Unità Carratelli (UC).

In una recente Review sono stati proposti tutti i trials clinici che hanno correlato eventi CAD con i valori di *d-ROMs* (60). Dalla letteratura e dai database presenti in Laboratorio assumiamo: i) valori critici sopra il cut-off di 400 U.C. con 0 punti assegnati nel conteggio finale ii) valori ad alto rischio cardiometabolico con cut-off sopra 500 U.C. con un valore negativo di due punti assegnato nel punteggio finale. La somma dei punti assegnati va moltiplicata stavolta per il valore indicato nel pannello della familiarità alla voce "patologie degenerative". Quindi il punteggio massimo per questo profilo è di 8 punti (4 x 2, punteggio massimo assegnato nel primo pannello).

## Profilo di insulino-resistenza

INSULINO RESISTENZA			
punteggio		Trigliceridi/HDL	Homa Index
Trigliceridi/HDL	0	Ottimale	<1 (punti 3)
Homa Index	0	Buono	1 - 2 (PUNTI 2)
		Critico	2-3 (PUNTI 1)
		Sindrome Metabolica	2.5 - 2.7 (1 punto negativo)
		Alto inflammaging	3 - 4 (PUNTI 0)
			>2.7 (tre punti negativi)
			4 (PUNTO NEGATIV)
	0		6 PUNTEGGIO MASSIMO

Nella valutazione dell'insulino-resistenza, si monitorano i valori del *rapporto tra trigliceridi e HDL (TG/HDL)* insieme all'*Homa Index*. L'insulino-resistenza sembra possedere un ruolo centrale nella genesi della sindrome metabolica e l'iperinsulinemia (che ne deriva) è risultata un fattore di rischio indipendente per cardiopatia ischemica; contribuisce all'esordio precoce del diabete, nonché alla sua progressione, e concorre alla comparsa delle numerose altre condizioni patologiche associate che si traducono in fattori di rischio cardiovascolare.

Per insulino-resistenza – come descritto in precedenza - si intende una condizione nella quale quantità fisiologiche di insulina producono una risposta biologica ridotta, con riduzione dell'azione precoce dell'insulina sul controllo glucidico dopo il pasto, associata a una inadeguata soppressione insulinica durante il digiuno notturno, in presenza di una sintesi conservata. Ne segue la contemporanea presenza di insulino-resistenza e iperinsulinemia, verificabile con il riscontro di elevate concentrazioni di insulina a digiuno e post-prandiali. Le principali dislipidemie che abbiamo analizzato in questa Tesi (sd-LDL, apo-B, ipertrigliceridemia, e Lipoproteine Remnants) sono correlabili a segnali di Sindrome Metabolica.

Uno strumento ampiamente utilizzato per stimare la sensibilità all'insulina è il modello di valutazione omeostatico (homeostasis model assessment, *HOMA*), calcolato utilizzando la glicemia a digiuno e i livelli d'insulina a digiuno (61)

Tatjana Rundek, insieme con i colleghi della Miller School of Medicine dell'Università di Miami, ha valutato, utilizzando l'indice HOMA, l'insulino-resistenza di 1509 soggetti non diabetici che hanno partecipato al Northern Manhattan Study. Una ricerca diretta all'osservazione dei diversi livelli di rischio, di incidenza e di prognosi dell'ictus in una comunità urbana multietnica (46)

Durante il periodo di follow-up, durato otto anni e mezzo, gli eventi cardiovascolari si sono verificati in 180 partecipanti, dei quali 46 hanno avuto ictus ischemici fatali

o non fatali, 45 hanno avuto infarti miocardici fatali o non fatali e 121 sono morti di cause cardiovascolari. I soggetti compresi nel primo quartile dell'indice HOMA avevano un rischio aumentato del 45 per cento rispetto al basale.

L'associazione tra insulino-resistenza e rischio cardiovascolare è rimasta statisticamente significativa anche una volta che sono stati normalizzati per gli altri fattori di rischio – glicemia, obesità e sindrome metabolica. Inoltre, la relazione è apparsa più forte negli uomini che nelle donne e non varia in modo significativo tra i diversi gruppi etnici. Pertanto, un valore riscontrato di Insulino Resistenza nel profilo di rischio cardiometabolico proposto ha un valore negativo di -3 punti nel punteggio finale. Nel foglio di lavoro, la somma dei punti assegnati per questo pannello è da moltiplicare per il fattore di rischio di diabete di tipo 2, quindi con il valore inserito nel pannello della familiarità alla voce “diabete”. Il punteggio massimo assegnato è perciò di 6 punti (3 x 2, punteggio massimo assegnato nel primo pannello).

### **Punteggio totale e fasce di rischio**

Il valore risultante dalla sommatoria di tutti i punti assegnati ai vari parametri, va a individuare una specifica fascia di rischio cardio-metabolico “totale”, risultante cioè dalla correlazione di tutti i pannelli.

<b>RISCHIO CARDIO-METABOLICO ELEVATISSIMO</b>	PUNTEGGIO 0 o NEGATIVO - 10
<b>RISCHIO CARDIO-METABOLICO ELEVATO</b>	PUNTEGGIO 10 - 19
<b>RISCHIO CARDIO-METABOLICO MEDIO</b>	PUNTEGGIO 20-29
<b>RISCHIO CARDIO-METABOLICO BASSO</b>	PUNTEGGIO 30 - 40
<b>RISCHIO CARDIO-METABOLICO MOLTO BASSO</b>	PUNTEGGIO 41 - 44

Quindi, in realtà, il modello di calcolo non solo fornisce un indice generale del rischio - indicato dalla specifica fascia risultante - ma permette anche di individuare le eventuali criticità dei singoli pannelli, consentendo un intervento mirato a migliorare i soli profili alterati, sia con misure più blande (agendo per esempio sulla nutrizione e lo stile di vita, o ricorrendo all'integrazione) sia più marcate (prescrivendo terapie e farmaci, e misure più impattanti).

I pannelli di rischio e le informazioni contenute nei questionari anamnestici dei singoli pazienti saranno poi raggruppati in un database costituito nel modo seguente:

LEGENDA	
	OTTIMALI
	BUONO
	CRITICO
	ALTERATO
	MOLTO ALTERATO

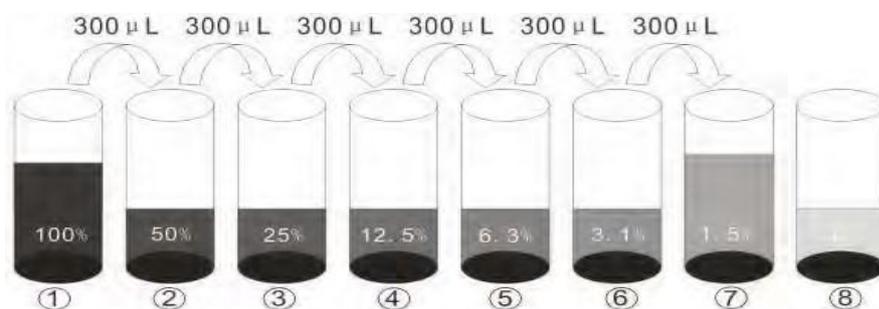
Età	SESSO	STATINE	BMI (kg/m <sup>2</sup> )	FUMO	IPERTENSIONE	sfLDL (mmol/L)	Colesisterolo (mg/100 ml)	LDL (mg/100ml)	APOB (mg/100ml)	lpa (mmol/L)	dROMs (U.C.)	omocisteina (umol/L)	HOMA-IR	Tg/HDL	AA/FPA	Omaga_3 Index (%)	Farmaci sperimentati	Tipo di dieta	Risultato rischio cardio metabolico	Disturbi intestinali frequenti	
			sotto peso <18,50 norma peso 18,50-24,99 sovrappeso 25-29,99 obeso classe I 30-34,99 obeso classe II 35-39,99 obeso classe III >40					<131 DESIDERABILE 131-160 CRITICO 161-190 ELEVATO 190-220 MOLTO ELEVATO	<120 120-140 140-160	<50 50-75 75-100	<320 321-360 361-400 400	<13 13-16 16-20 20-25	<2,5 2,5-3 3-4 4-5	<1 1-2 2-3 3-4 4-5	<15 15-30 30-40 40-50 50-60						

## 2.4 Kit ELISA LPS

Dopo la costruzione del Database, è stata determinata la concentrazione di LPS tramite ELISA. Sulla base di esperimenti preliminari con diverse diluizioni di siero, 38 campioni sono stati diluiti 1:5 utilizzando il kit Human Lipopolysaccharides (LPS) ELISA Kit (Mybiosource Cat No.MBS266722).

Questo kit utilizza la tecnica del "Double Antibody Sandwich". Il principio del Double Antibody Sandwich si basa sulle caratteristiche di un analita bersaglio con più di due possibili epitopi che possono essere identificati contemporaneamente sia dall'anticorpo di cattura, pre-adsorbito sul fondo del pozzetto, che dall'anticorpo di rilevazione, aggiunto in seguito. I campioni di siero sono stati conservati a  $-20^{\circ}\text{C}/-80^{\circ}\text{C}$  (1-3 mesi).

Lo standard liofilizzato è stato ricostituito in 1,0 ml di diluente fornito dal kit e lasciato a temperatura ambiente per 30 minuti. La soluzione standard di LPS è stata diluita serialmente 1:2 come segue in modo da ottenere i seguenti valori di concentrazione: 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,2, 15,6 ng/mL.



Sulla base di prove preliminari i campioni sono stati diluiti in rapporto 1:5 con diluente per siero fornito dal kit.

I campioni e gli standard, una volta aggiunti ai pozzetti corrispondenti, 100 µL per ciascun pozzetto, sono stati incubati a  $37^{\circ}\text{C}$  per 90min.

Terminata l'incubazione ed effettuati 2 lavaggi della piastra ELISA, l'anticorpo biotinitato, diluito 1:100, è stato aggiunto ai pozzetti corrispondenti (100 µL per ciascun pozzetto) e incubato a  $37^{\circ}\text{C}$  per 60min.

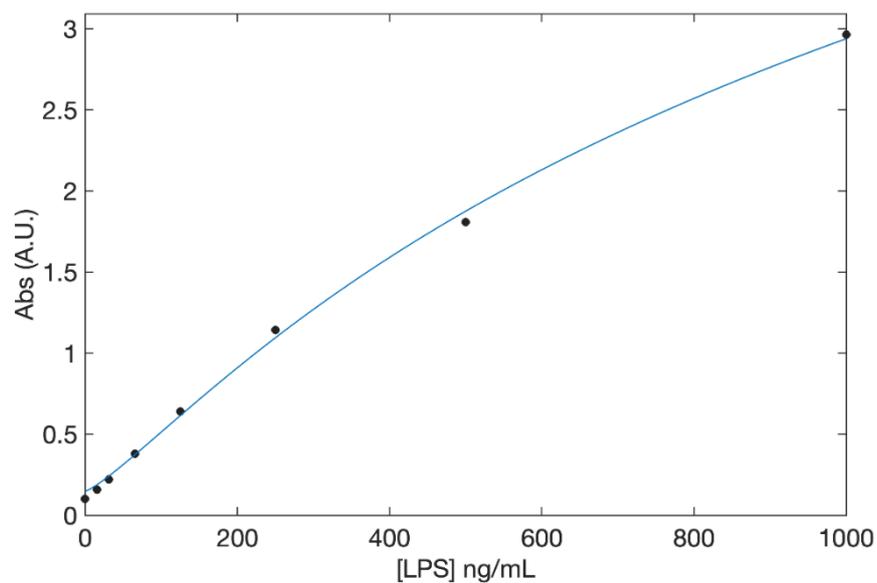
Terminata l'incubazione ed effettuati 3 lavaggi, è stato aggiunto il coniugato enzimatico diluito 1:100 (100  $\mu$ L per ciascun pozzetto) e incubato a 37°C per 30min.

Terminata l'incubazione ed effettuati 5 lavaggi, Sono stati aggiunti 100  $\mu$ L di substrato (costituito da reagente colorante A e reagente colorante B in rapporto 9:1) ed incubato al riparo dalla luce a 37°C. L'incubazione è stata interrotta al 5' minuto, quando la colorazione degli standard più alti è risultata essere più scura.

Per bloccare la reazione, sono stati aggiunti 100  $\mu$ L di reagente colorante C a ogni singolo pozzetto (anche nel pozzetto bianco).

Appena bloccata la reazione, è avvenuta la Lettura OD a 450 nm (deve essere effettuata entro i 10 min).

La determinazione quantitativa è stata effettuata costruendo una curva standard, ottenuta analizzando, contemporaneamente ai campioni, diluizioni seriali di uno standard di LPS a concentrazione nota. La curva standard, di seguito riportata, ha permesso di validare l'accuratezza delle concentrazioni calcolate ed espresse come ng/mL.



### 3. SCOPO

Le patologie cardiovascolari ed i disordini del metabolismo sono tra le maggiori cause di malattie croniche. I fattori di rischio maggiori per lo sviluppo di tali patologie sono lo scarso controllo dei valori pressori, gli elevati valori di colesterolo e di glicemia spesso associati alla coesistenza di sovrappeso od obesità con importante danno multiorgano. Nei paesi Occidentali, l'aderenza al trattamento, tra i pazienti affetti da malattie croniche cardiovascolari e dismetaboliche arriva solo al 50%, con risultati clinici sub ottimali. Pertanto, la prevenzione attraverso un corretto stile di vita ed un'alimentazione equilibrata e l'utilizzo di biomarcatori precoci e attendibili del rischio cardiovascolare rappresentano una strategia promettente, allo scopo di contrastare l'incremento dell'obesità e delle patologie cardiovascolari e dismetaboliche, in linea con le indicazioni dell'Assemblea Mondiale della Sanità (OMS).

L'obiettivo principale di questa tesi sperimentale è valutare l'efficacia di diversi biomarcatori nella costruzione di un pannello cardiometabolico completo. Questo pannello sarà utilizzato per monitorare e prevedere condizioni cardiovascolari e metaboliche nei pazienti. I dati dei pazienti verranno raccolti e organizzati in un database strutturato, consentendo una gestione e un'analisi efficienti delle informazioni cliniche.

Inoltre, questa ricerca si concentra sulla valutazione di un nuovo biomarcatore sierico, il lipopolisaccaride (LPS), testato utilizzando un kit ELISA. L'obiettivo è determinare l'affidabilità e la validità del LPS come indicatore di condizioni cardiovascolari per la sua eventuale inclusione nel pannello cardiometabolico e la correlazione con gli altri biomarcatori considerati.

L'inclusione del LPS nel pannello cardiovascolare potrebbe offrire una nuova dimensione nella diagnosi e nel monitoraggio delle malattie cardiometaboliche, migliorando la precisione e l'efficacia delle strategie terapeutiche. Se i risultati della sperimentazione saranno positivi, il LPS potrà essere integrato come biomarcatore standard nei pannelli cardiometabolici attualmente utilizzati nella pratica clinica.



## Cut-Off per l'Individuazione del Rischio

### ➤ **BMI (Indice di Massa Corporea)**

- **< 18.50:** Sottopeso
- **18.50-24.99:** Normopeso
- **25-29.99:** Sovrappeso
- **30-34.99:** Obesità classe I
- **35-39.99:** Obesità classe II
- **> 40:** Obesità classe III

### ➤ **Fumo**

- SI
- NO

### ➤ **Ipertensione**

- SI
- NO

### ➤ **Colesterolo LDL (mg/100ml)**

- **< 131:** Ottimale
- **131-160:** Buono
- **161-190:** Critico
- **> 190:** Alterato
- **> 500:** Molto Alterato

### ➤ **APO-B (mg/100ml)**

- **< 120:** Ottimale
- **120-140:** Critico
- **> 140:** Alterato

➤ **Lpa (nmol/L)**

- **< 50:** Ottimale
- **50-75:** Critico
- **> 75:** Alterato

➤ **d-ROMS (U.C)**

- **< 320:** Ottimale
- **321-360:** Buono
- **361- 400:** Critico
- **401-500:** Alterato
- **> 500:** Molto Alterato

➤ **Omocisteina (umol/L)**

- **< 13:** Ottimale
- **13-16:** Critico
- **> 16:** Alterato

➤ **HOMA-IR**

- **< 2.5:** Ottimale
- **> 2.5:** Alterato

➤ **AA/EPA**

- **< 15:** Ottimale
- **15-30:** Buono
- **30-40:** Critico
- **> 40:** Alterato

➤ **FARMACI ANTI-IPERTENSIVI**

➤ **TIPO DI DIETA**

- Paleozona
- Life 120
- Dieta a zona
- Mediterranea: con basso consumo di carboidrati
- Chetogenica
- Vegana
- N.I: Non saprei identificare nessuna di quelle sopra citate

➤ **DISTURBI INTESTINALI FREQUENTI**

➤ **RISCHIO CARDIO METABOLICO**

<b>RISCHIO CARDIO-METABOLICO ELEVATISSIMO</b>	PUNTEGGIO 0 o NEGATIVO - 10
<b>RISCHIO CARDIO-METABOLICO ELEVATO</b>	PUNTEGGIO 10 - 19
<b>RISCHIO CARDIO-METABOLICO MEDIO</b>	PUNTEGGIO 20-29
<b>RISCHIO CARDIO-METABOLICO BASSO</b>	PUNTEGGIO 30 - 40
<b>RISCHIO CARDIO-METABOLICO MOLTO BASSO</b>	PUNTEGGIO 41 - 44

Il range del punteggio finale assegnato: da -10 a 44

I cut-off rappresentano i limiti superiori e inferiori dei valori che determinano le diverse categorie di rischio. La presenza di valori in una certa categoria suggerisce l'intervento necessario per riportare i parametri entro limiti desiderabili. L'uso di questi cut-off permette di identificare rapidamente e gestire i pazienti con rischio cardiometabolico.

Il Database del Rischio Cardiometabolico potrebbe essere utilizzato per:

- Identificare pazienti ad alto rischio.
- Pianificare interventi personalizzati.
- Monitorare i cambiamenti nei parametri di rischio nel tempo.

Interpretazione dei dati:

- Parametri individuali: Osservare i colori per capire se un parametro specifico è in un range di rischio alto.
- Rischio complessivo: Controllare il colore della colonna del rischio complessivo per una visione rapida del rischio globale del paziente.
- Trend e pattern: Identificare pattern comuni tra i pazienti ad alto rischio per interventi mirati.

sotto peso < 18,50  
norma peso 18,50 - 24,99  
sovrappeso 25 - 29,99  
obeso classe I 30 - 34,99  
obeso classe II 35 - 39,99  
obeso classe III >= 40

<131 DESIDERABILE  
131 - 160 CRITICO  
161 - 190 ELEVATO  
>190 MOLTO ELEVATO

<120  
120-140  
50-75  
975

<320  
321-360  
361-400  
401-500

<13  
13-16  
17-20  
21-24

<2,5  
2,5-3  
3-4  
4-5

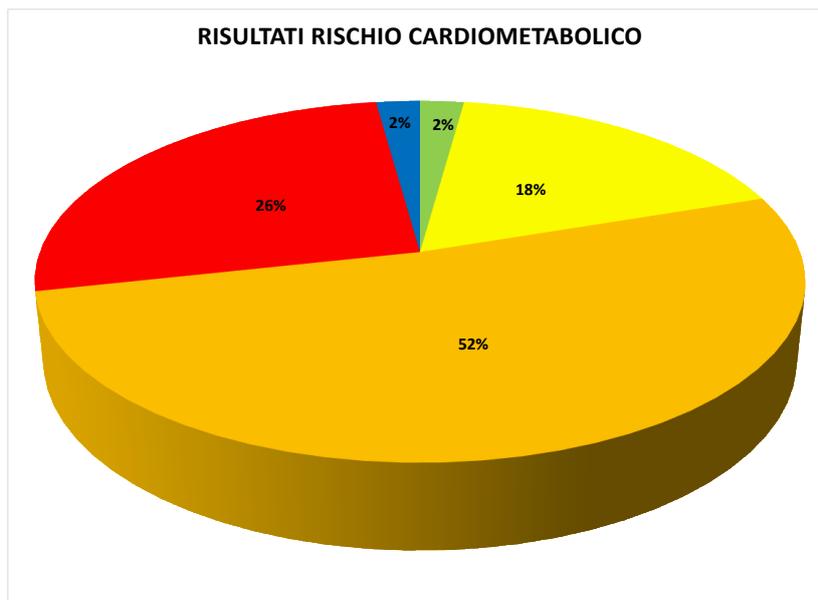
<1  
1-2  
3-4  
5-6

<15  
15-30  
30-40  
40-50

>8  
6-8  
4-6  
2-4

Età	SESSO	STATINE	BMI (kg/m2)	FUMO	IPERTENSION E	sd-LDL (mmol/L)	Colesterolo (mg/100 ml)	LDL (mg/100ml)	APO-B (mg/100ml)	Lpa (nmol/L)	d-ROMs (U.C)	omocisteina (umol/L)	HOMA-IR	Tg/HDL	AA/EPA	Omega_3 Index (%)	FarmacI ipertensivi	Tipo di dieta	Risultato rischio cardio metabolico	Disturbi intestinali frequenti
62	F	NO	31,21	NO	NO	1,117	247	162	127	7	385	9,4	2,51	2,6	4,9	11,1		N.I	22	NO
51	M	SI	26,23	NO	NO	0,58	134	79	73	15	433	10,8	2,5	1,8	47,6	5,5	SI	N.I	30	SI
51	M	NO	28,41	SI	NO	0,879	234	168	114	16	360	12	1,45	0,9	39,1	4		N.I	35	NO
60	F	NO	29,62	SI	NO	0,713	177	115	99	36	379	12,2	4,01	2,8	20,7	8,2	SI	MEDITERRANEA	28	NO
59	M	NO	29,94	NO	NO	1,393	197	133	107	7	365	9	5,58	5,4	24,6	6,6		N.I	19	SI
66	M	SI	26,3	SI	NO	0,255	114	28	39	8	303	16,7	1,05	0,9	35,5	5,3		MEDITERRANEA	32	NO
46	F	NO	25,84	SI	NO	0,864	188	120	91	13	292	15,1	1,8	2	68,4	3,9		MEDITERRANEA	26	SI
53	M	NO	32,19	SI	SI	0,568	174	112	90	7	344	9,9	3,42	2,6	24,5	6,8	SI	MEDITERRANEA	25	SI
50	F	SI	29,8	NO	NO	0,292	140	77	65	14	353	10,5	1,68	1,2	39,4	8,8		N.I	32	SI
58	M	SI	26,59	NO	SI	0,689	143	76	75	100	360	13,2	3,4	1,5	40,7	6,6	SI	MEDITERRANEA	25	NO
46	F	NO	19,13	NO	NO	0,652	219	130	95	17	383	7,8	1,02	0,9	12,3	7,7		N.I	39	NO
52	M	SI	26,37	NO	NO	0,407	142	74	69	7	395	15,5	6,4	2,2	24	5,8		N.I	23	SI
68	M	NO	27,76	NO	SI	0,934	187	131	102	7	380	14,3	3,19	4,4	14,6	5,5	SI	N.I	19	SI
65	F	NO	37,11	NO	SI	0,936	200	138	104	23	551	9,6	2,29	2,2	17,7	9,2	SI	MEDITERRANEA	28	NO
44	M	NO	24,1	NO	SI	1,128	258	185	118	7	301	96,1	1,92	1,2	17	6,4		MEDITERRANEA	30	NO
56	M	NO	27,43	SI	NO	0,502	181	111	89	7	435	11,5	1,49	1,5	26,1	5,4	SI	MEDITERRANEA	27	SI
38	F	NO	26,96	NO	NO	0,525	176	105	82	15	466	13,6	4,3	1,5	45,3	5,4		MEDITERRANEA	20	SI
57	F	NO	31,63	NO	SI	0,883	244	173	126	41	391	9,3	3,33	3,3	41,8	4,2		N.I	20	SI
53	F	NO	18,36	NO	NO	2,6	658	557	297	39	451	7,1	1,18	0,4	19,9	7,7		LIFE120	23	NO
64	F	NO	22,53	NO	NO	0,75	237	141	105	8	432	10,3	2	1,1	21,5	6,7		MEDITERRANEA	27	SI
47	M	NO	21,47	NO	NO	0,456	157	75	61	20	308	14,1	0,97	0,8	2,7	12		DIETA A ZONA	45	NO
56	M	NO	23,7	NO	NO	0,398	406	251	181	17	358	9,1	2,12	1,1	6,7	8,3		CHETOGENICA	26	SI
72	M	NO	24,58	NO	SI	0,756	195	136	104	23	358	14,2	2,46	1,7	9,5	10,2	SI	MEDITERRANEA	22	NO
76	M	NO	26,03	NO	NO	1,242	269	189	134	14	348	20,5	2,48	3,7	24,5	6,8		MEDITERRANEA	23	NO
63	M	SI	34,54	NO	SI	1,479	151	96	86	7	353	12,3	4,58	2,9	17,5	7,1	SI	MEDITERRANEA	18	NO
21	F	NO	24,62	NO	NO	0,742	183	110	85	7	612	9,3	2,13	1,3	15,1	7,6		MEDITERRANEA	31	NO
59	M	NO	26,42	NO	SI	0,796	198	120	102	110	333	19,4	0,89	1,6	16,6	5,8	SI	MEDITERRANEA	22	NO
54	M	NO	20,06	NO	SI	1,408	319	200	158	156	366	9,3	0,47	0,9	30	6,2	SI	ANCESTRALE	20	NO
48	M	NO	25,29	NO	NO	0,597	191	135	108	15	346	11,4	2,17	1,8	11,5	9,6		N.I	34	NO
63	M	NO	20,48	SI	NO	1,394	357	250	154	8	297	9,7	0,22	0,5	7	9,5		MEDITERRANEA	23	SI
69	F	NO	22,86	NO	NO	0,916	235	160	119	62	420	8,4	1,67	1,5	26,4	5,8	SI	MEDITERRANEA	29	NO
70	M	NO	27,68	NO	NO	0,944	241	168	117	23	457	12,2	1,17	1,3	21,4	4,4		LIFE120	31	NO
80	M	NO	24,38	NO	SI	0,961	237	153	111	10	350	12,4	2,17	1	29,3	5,2	SI	SLOW LOW CARB	35	NO
60	F	SI	19,38	NO	NO	0,667	208	139	105	449	298	9,4	0,97	1,7	12,4	7,1		N.I	38	SI
52	M	SI	25,22	NO	NO	0,918	242	168	127	26	382	13,2	1,19	1,7	7,4	8,3		MEDITERRANEA	33	NO
64	M	NO	24,91	NO	SI	1,607	281	201	142	7	355	15,5	2,56	2,2	9,1	7,1	SI	MEDITERRANEA	20	SI
62	M	NO	28,39	NO	SI	1,005	224	159	132	7	500	22,6	2,17	2,7	14	6,7	SI	N.I	16	SI
62	F	NO	23,36	NO	SI	0,829	201	138	106	19	431	8,2	1,18	1,2	19,6	7,8		MEDITERRANEA	28	NO
75	M	NO	25,46	NO	SI	0,831	188	114	91	8	408	14,3	2,47	2,7	9,5	8,9	SI	MEDITERRANEA	26	NO
56	F	NO	28,84	NO	SI	0,852	225	149	109	7	433	7,2	3,84	2,6	49,9	5,6	SI	N.I	22	SI
52	M	NO	22,22	SI	NO	1,468	325	218	132	17	379	12,8	1,14	1,5	8,3	11,8		GAPS-PALEO	28	SI
43	F	NO	19,13	NO	NO	0,306	140	69	57	0	396	11	1,37	0,5	27,3	6,5		MEDITERRANEA	36	SI
55	M	NO	28,68	NO	SI	1,081	211	142	105	164	345	14	1,52	2,4	40	4,1		N.I	16	SI
60	M	NO	31,1	NO	SI	0,516	166	100	73	7	482	14,3	1,15	1,7	8,5	9,3	SI	CHETOGENICA	22	NO
51	F	NO	17,93	NO	NO	2,353	425	281	188	85	391	5,7	0,66	0,4	13,3	9,5		CHETOGENICA	26	SI
59	M	NO	23,46	NO	SI	0,563	143	78	88	201	309	9,2	1,86	1,9	10,7	8,5	SI	MEDITERRANEA	34	NO
52	F	NO	21,63	NO	NO	0,896	249	157	97	8	356	8,9	1,24	1,1	20,7	5,2		MEDITERRANEA	32	NO
65	M	SI	27,54	NO	NO	0,399	94	42	53	122	311	11,2	3,77	2,6	8,2	9,1	SI	N.I	25	SI
60	M	SI	23,71	SI	NO	0,367	119	55	58	8	385	12,5	1,28	1,4	9,5	7,1	SI	MEDITERRANEA	27	NO
52	M	NO	27,74	NO	NO	1,136	178	124	105	7	380	11,2	0,65	0,9	39,4	5,9		MEDITERRANEA	20	NO
71	F	SI	23,15	NO	NO	0,419	164	57	57	35	402	7,7	0,61	0,6	31,7	6,1		DIETA A ZONA	25	SI
37	F	NO	22,86	NO	NO	0,411	179	115	84	124	381	8,7	2,13	1,7	48,1	5,6		N.I	30	SI
52	F	NO	22,86	NO	NO	0,52	453	298	200	7	433	8,4	1,33	0,9	6,1	9,8		CHETOGENICA	25	NO
33	M	NO	22,86	NO	NO	0,254	116	55	55	7	298	14	1,34	1,6	35,4	5,9		MEDITERRANEA	35	NO
43	F	NO	17,19	NO	NO	1,418	313	244	177	85	395	7,8	0,77	1,4	3	8,5		MEDITERRANEA	25	SI
65	M	NO	22,2	NO	SI	0,632	195	113	96	23	388	14,9	3,23	1,9	34,8	14,9	SI	VEGETARIANA	14	NO
52	F	NO	22,2	NO	NO	0,297	186	92	65	7	407	12,7	2	0,8	26,2	6,2	SI	N.I	30	SI
55	M	SI	22,2	NO	NO	0,402	133	43	47	7	373	10,4	0,91	0,5	4,2	11,2		MEDITERRANEA	39	NO
62	M	NO	29,94	NO	NO	1,326	241	165	127	12	428	10,8	1,29	1,8	7,2	8,7		MEDITERRANEA	20	NO
70	F	NO	23,8	NO	NO	0,858	255	189	126	137	361	8,7	1,54	2,1	37,7	5,8	SI	MEDITERRANEA	25	SI
54	F	NO	21,43	NO	NO	0,73	255	123	90	38	484	7,2	1,09	0,4	30,9	6		PALEOZONA	29	NO
59	M	NO	27,02	NO	NO	0,447	184	108	80	11	297	10,6	3,13	1	22	7		N.I	32	NO
50	M	NO	24,58	NO	NO	0,228	110	62	56	7	630	10,6	1,48	1,4	39,4	4,6		N.I	26	NO
41	M	NO	23,72	NO	NO	0,373	167	97	74	123	308	11,9	1,48	0,9	23,3	6,2		N.I	37	SI
64	F	NO	24,68	NO	NO	1,04	277	197	132	7	467	10	1,53	1,6	8	7,6		MEDITERRANEA	28	SI
56	M	NO	30,16	NO	SI	0,463	178	96	83	158	400	10,9	1,44	1,4	40,3	5,2		N.I	18	SI
64	F	NO	22,95	SI	NO	0,851	211	136	105	70	428	7,4	2,28	2,2	8,4	9,3		N.I	26	SI
51	F	NO	21,3	NO	NO	0,435	206	109	71	7	369	13,3	1,21	0,8	34,9	4,9		N.I	35	NO
40	M	NO	25,59	NO	NO	0,815	252	168	115	7	353	12,2	1,8	0,7	40,7	6,1		N.I	36	NO
59	M	SI	28,28	NO	SI	0,282	111	46	47	44	440	14,2	4,49	0,8	24,8	5,9	SI	N.I	24	NO
70	M	NO	27,01	NO	NO	1,012	264	188	134	31	447	8,5	2,72	1,2	5	8,9		N.I	28	NO
60	F	NO	23,42	NO	NO	0,514	172	106	77	15	505	16,7	1,86	1	39,8	7,1		N.I	27	SI
59	F	NO	29,67	NO	SI	0,762	203	128	105	92	528	8,6	7,13	1,6	11,5	8,8				

45	M	NO	27,46	SI	NO	0,812	245	173	125	7	439	40,4	1,88	2,6	38,8	5,1		N.I	20	NO
57	F	NO	19,53	SI	NO	0,352	146	79	66	64	593	14,4	2,09	1,4	19,5	6,9		FODMAP	21	SI
74	M	NO	26,37	NO	SI	0,834	220	152	116	42	531	11,6	2,54	2,1	17,8	5,7	SI	N.I	17	NO
53	M	NO	21,8	NO	NO	0,884	232	150	113	28	237	13,4	0,72	1	9,5	10,7		N.I	27	SI
50	F	NO	23,88	NO	NO	0,302	151	72	57	15	482	9,7	1,45	0,5	33,3	5,6		N.I	32	SI
61	F	NO	18,31	NO	NO	0,819	235	155	109	29	510	8,8	0,75	0,7	19	6,9		MEDITERRANEA	22	NO
56	M	NO	24,39	NO	NO	0,557	211	128	89	60	324	6,6	0,54	1,1	17	7,5		DIETA A ZONA	35	NO
58	M	NO	25,87	NO	NO	0,456	192	107	83	130	450	15	1,8	1,9	24,8	5,3		MEDITERRANEA	18	NO
40	M	NO	23,57	NO	NO	1,25	231	169	126	308	482	11,7	2,44	2,3	23,5	6,6		N.I	21	NO
51	M	NO	32,18	NO	SI	1,714	271	197	152	28	399	21,7	3,84	2,9	40,6	6,2		LOW CARB	13	NO
45	F	NO	19,33	NO	NO	0,673	242	135	98	95	387	12,3	0,63	0,8	11,3	9,3		MEDITERRANEA	33	SI
51	M	NO	24,6	NO	NO	1,028	217	154	117	326	350	14,1	1,72	1,4	4,9	8,7		MEDITERRANEA	34	SI
55	M	NO	31,63	NO	NO	0,605	185	121	92	10	376	14,7	3,91	2	28	6,1		N.I	26	SI
70	M	NO	28,07	NO	SI	1,197	289	202	159	147	407	14,7	1,54	1,7	18,8	5,7	SI	N.I	18	NO
58	F	NO	23,18	NO	SI	0,415	187	99	90	169	410	8,1	1,55	0,8	8,6	8,7		N.I	18	SI
59	F	NO	19,61	NO	SI	0,637	198	112	103	17	408	10,7	1,3	0,9	28	6,3	SI	MEDITERRANEA	32	NO
76	M	NO	24,09	NO	NO	0,516	167	97	81	8	359	8,7	1,3	0,6	11	7,8		LIFE 120	38	NO
73	M	NO	30,04	NO	SI	0,887	219	151	119	213	539	13,9	1,95	2,3	30,2	7,9	SI	ANTIINFAMMATORIA	16	SI
62	F	NO	24,46	NO	SI	0,492	217	134	97	59	390	9,9	1,11	1,5	42,7	4,2	SI	N.I	25	NO
56	M	NO	23,33	NO	NO	0,948	280	211	142	12	452	12,8	1,02	1,9	8,6	12,8		LIFE 120	24	SI
70	M	NO	32	NO	NO	0,889	209	152	117	7	323	18,8	2,11	2,4	11,3	8,6	SI	MEDITERRANEA	29	SI
70	M	NO	20,4	NO	NO	1,688	234	176	132	22	383	12,7	2,28	2,4	9,9	7		N.I	15	NO
55	M	NO	24,42	NO	SI	0,415	203	114	84	7	454	8,8	1,43	0,9	21,5	5,5	SI	MEDITERRANEA	27	NO
72	M	SI	24,17	NO	NO	0,513	132	84	73	45	251	8,2	2,29	1,3	21,1	5,3		N.I	33	NO
68	M	NO	21,3	NO	NO	1,605	210	140	143	56	356	9,7	0,65	4,5	5,1	9,7		MEDITERRANEA	22	NO
68	M	NO	23,04	NO	SI	0,926	238	161	121	62	450	13,1	4,99	1,1	5,9	10,2		N.I	25	NO
51	M	NO	24,62	NO	NO	1,388	286	214	154	7	436	14,8	1,41	1,9	21,5	6,2		MEDITERRANEA	20	SI
39	M	NO	22,32	NO	NO	0,499	169	97	77	24	319	13,1	2,04	2	16	6,4		SENZA GLUTINE	35	NO
47	F	NO	24,01	NO	NO	1,133	225	149	107	38	426	12,2	0,92	1,4	25,4	6,2	SI	MEDITERRANEA	24	NO
69	M	NO	22,72	NO	NO	1,248	171	93	90	14	340	13	2,58	1,5	44,1	6,2		MEDITERRANEA	26	SI
62	F	SI	29,06	NO	SI	0,331	115	41	52	34	486	10,7	5,1	1,3	28,2	6,7	SI	N.I	14	NO
61	M	NO	30,96	NO	NO	0,649	205	128	97	21	455	14,5	3,09	2,8	23,2	5,7	SI	N.I	19	NO
43	M	NO	25,91	SI	NO	0,601	180	101	78	25	436	10,1	1,44	0,7	30,9	4,8		N.I	26	SI
60	M	NO	23,12	NO	NO	1,734	228	161	128	141	317	7,9	2,07	2,6	14	6,9		N.I	25	NO
69	M	NO	17,97	NO	NO	0,739	231	148	103	41	484	16,1	1,34	1,2	26,8	7,7		MEDITERRANEA	30	SI
53	F	NO	44,04	NO	NO	1,133	325	249	197	38	501	12,2	0,92	1,4	25,4	6,2	SI	LOW CARB	24	NO
63	M	NO	11,36	NO	NO	0,894	257	160	116	7	395	10,3	1,11	0,8	2,6	13,4		LOW CARB	40	NO
59	F	NO	21,55	NO	NO	0,55	214	116	89	9	439	8,8	2,31	0,6	7,8	7,8		N.I	27	SI
54	M	NO	25,38	NO	SI	1,482	236	168	124	7	358	11,4	2,77	2,2	20,6	7,2		N.I	21	NO
54	M	NO	30,14	NO	NO	0,487	146	93	80	92	318	12,1	1,84	2,3	17,2	8,6		MEDITERRANEA	29	NO
49	M	NO	29,63	NO	SI	0,359	172	92	70	8	441	14,8	2	0,8	50,8	4,4		PALEOZONA	19	NO
39	M	SI	27,77	NO	NO	0,512	183	109	79	98	364	8,5	1,24	0,9	39,9	5,6	SI	PALEOZONA	32	SI
47	F	NO	11,33	NO	NO	1,243	325	249	197	38	501	12,2	0,92	1,4	25,4	6,2	SI	PALEOZONA	21	SI
55	M	NO	22,54	NO	NO	0,52	176	125	91	97	342	14,9	1,42	0,9	15,1	14,9		MEDITERRANEA	34	SI
55	M	NO	26,35	NO	SI	0,911	229	163	125	16	360	8,8	4,59	2,7	12,2	6,1		MEDITERRANEA	18	NO
59	F	SI	21,48	NO	NO	0,745	243	168	116	31	490	9,3	1,39	1,1	6,4	7,3		N.I	30	NO
55	F	NO	22,06	NO	SI	1,78	235	164	125	16	512	13,2	1,26	3,1	45	4,6	SI	N.I	8	NO
71	M	NO	25,11	NO	NO	1,439	258	198	146	74	413	10	2,49	3	19,8	7,8		LIFE 120	16	SI
30	F	NO	21,08	NO	NO	0,453	166	87	67	10	447	9,3	1,19	0,6	80,8	5,4		MEDITERRANEA	32	NO
57	M	NO	24,03	NO	SI	0,816	176	116	107	38	426	12,2	0,92	1,4	25,4	6,2	SI	PALEOZONA	21	SI
50	M	NO	17,45	SI	SI	1,047	213	154	125	10	520	15,8	3,06	1,5	35,4	6,3		N.I	14	NO
66	F	SI	26,44	NO	NO	1,282	249	154	123	145	549	7,1	2,54	2,2	14,4	8,3		MEDITERRANEA	13	SI
72	F	NO	24,06	NO	NO	0,408	172	92	75	29	471	9,1	2,04	1	32,1	4,4		N.I	25	NO
62	F	NO	24,65	NO	SI	0,871	275	178	123	11	247	15,8	2,17	1,4	28,2	5,1		N.I	27	SI
74	M	NO	25,01	NO	SI	1,008	272	210	149	18	423	12,5	0,63	1,5	5,7	8,6	SI	MEDITERRANEA	23	SI
51	M	NO	26,57	NO	NO	0,537	179	133	108	44	389	15,8	8,08	1,4	6,3	8,8	SI	N.I	32	NO
56	F	NO	18,21	NO	NO	0,581	165	107	88	7	481	10,2	1,73	1,4	25,1	7		N.I	25	SI
79	M	NO	27,43	NO	NO	0,686	207	136	113	7	420	12,1	1,99	1,4	4,4	9,5		VEGETARIANA	32	NO
48	M	NO	27,1	SI	SI	0,413	147	94	76	19	430	13	4,96	1,9	24,1	5,8		MEDITERRANEA	21	NO
50	F	NO	22,1	NO	NO	0,696	215	130	95	7	434	7,4	1,24	0,8	7,4	8,3		MEDITERRANEA	37	NO
52	M	NO	21,61	NO	NO	1,87	257	185	120	7	474	14,8	0,81	1,2	21,6	5,5		N.I	21	NO
67	F	NO	22,22	NO	NO	1,077	372	252	149	7	441	10,4	0,42	0,7	9,2	8,2		N.I	29	SI
59	F	NO	20,9	NO	NO	0,543	209	110	77	10	485	15,3	1,5	1,5	26,4	7,3	SI	MEDITERRANEA	26	SI
60	M	NO	25,4	NO	NO	0,335	156	91	70	10	405	8,8	1,39	1,3	46,5	15,4		N.I	25	NO
59	M	NO	24,93	NO	NO	0,658	227	139	110	46	371	14,2	2,59	0,6	3,7	9,9		N.I	36	NO
51	F	NO	19,61	NO	NO	1,05	230	129	89	23	505	5,9	1,74	0,5	8,6	8,4		PALEOZONA	29	SI
58	F	NO	31,18	NO	SI	0,539	215	134	100	20	468	13	1,47	1,5	16,7	8,1		N.I	29	SI
46	F	NO	22,04	NO	NO	0,938	292	194	139	184	421	10,8	1,35	0,8	9	8,4		MEDITERRANEA	31	NO
53	M	SI	28,73	NO	SI	0,492	146	81	70	7	377	12,3	1,01	0,8	49	6,2	SI	N.I	35	SI
72	F	NO	20,24	NO	NO	0,537	235	159	124	10	413	11,3	2,04	1,3	17,7	7,9	SI	N.I	18	NO
60	F	NO	31,16	SI	NO	0,765	273	185	102	92	560	8,8	2,27	0,4	17,6	6		CHETOGENICA	27	NO
62	M	SI	28,09	NO	SI	0,478	112	65	60	14	416	16,6	5,85	2,7	28,2	5	SI	MEDITERRANEA	13	NO
56	M	NO	34,37	SI	NO	0,534	153	76	70	0	360	17	7,145	1,6	31,6	5,5		N.I	28	SI
50	F	SI	31,27	NO	SI	2,312	232	134	128	7	486	8,5	2,77	10,6	57,2	4,6	SI	N.I	9	SI
55	M	NO	26,51	NO	SI	0,883	224	152	112	22	398	14,1	2,67	1,7	10,8	7,4		N.I	29	NO
57	M	NO	27,43	NO	NO	1,893	278	198	146	8	391	12	2,88	3,5	13,3	8		N.I	29	NO
62	F	NO	31,63	NO	SI	0,543	269	179	124	10	413	11,3	2,04	1,3	17,7	7,9	SI	MEDITERRANEA	26	SI
49	M	NO																		



<b>RISCHIO CARDIO-METABOLICO ELEVATISSIMO</b>	PUNTEGGIO 0 o NEGATIVO - 10
<b>RISCHIO CARDIO-METABOLICO ELEVATO</b>	PUNTEGGIO 10 - 19
<b>RISCHIO CARDIO-METABOLICO MEDIO</b>	PUNTEGGIO 20-29
<b>RISCHIO CARDIO-METABOLICO BASSO</b>	PUNTEGGIO 30 - 40
<b>RISCHIO CARDIO-METABOLICO MOLTO BASSO</b>	PUNTEGGIO 41 - 44

### Grafico 1

Distribuzione del rischio cardiometabolico in una coorte di n 232 pazienti utilizzando il pannello proposto.

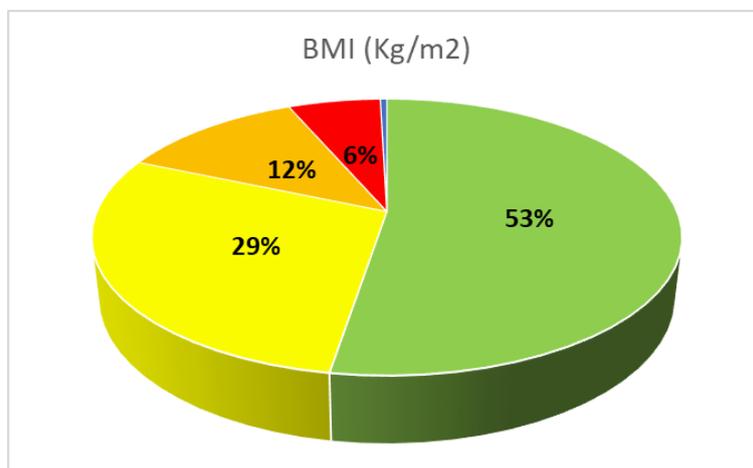
I punteggi di rischio cardiometabolico dei pazienti sono stati utilizzati per la costruzione del seguente grafico, in cui si evince che:

- Il 2% dei pazienti risulta avere un rischio cardio-metabolico elevatissimo (in blu);
- Il 26% dei pazienti risulta avere un rischio cardio-metabolico elevato (in rosso);
- Il 52% dei pazienti risulta avere un rischio cardio-metabolico medio (in arancione);
- Il 18% dei pazienti risulta avere un rischio cardio-metabolico basso (in giallo);
- Il 2% dei pazienti risulta avere un rischio cardio-metabolico molto basso (in verde);

I punteggi di rischio cardiovascolare dei pazienti presenti nel database sono stati raggruppati in diagrammi a torta per una rappresentazione visiva dell'incidenza del rischio cardiovascolare.

Questi grafici permettono di apprezzare in modo chiaro e immediato la distribuzione delle diverse categorie di rischio.

LEGENDA
OTTIMALI
BUONO
CRITICO
ALTERATO
MOLTO ALTERATO

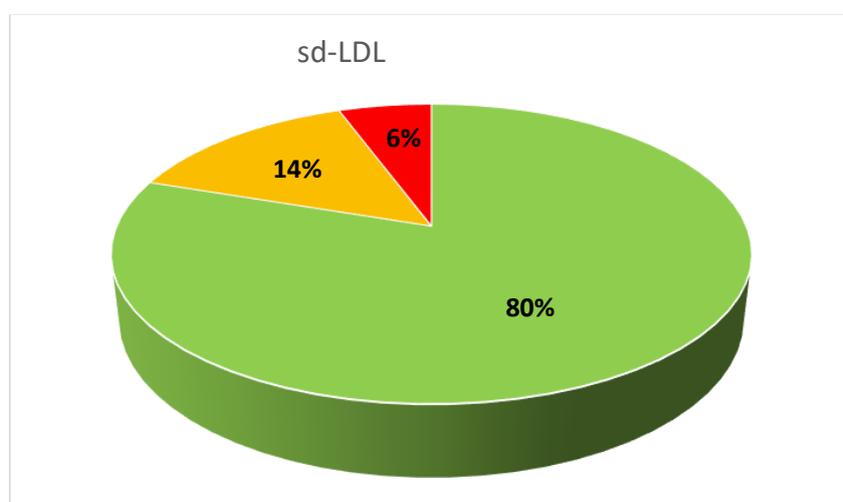


**Grafico 2**

Rappresentazione grafica dei valori **BMI** di n.232 pazienti in cui:

- Il 53% ha il BMI tra 18,50 e 24,99 (NORMOPESO)
- Il 29% ha il BMI tra 25 e 29,99 (SOVRAPPRESO)
- Il 12% ha il BMI tra 30 e 34,99 (OBESITA' DI CLASSE I)
- Il 6% ha il BMI o inferiore al 18,5 (SOTTOPESEO) o compreso tra 35 e 39,99 (OBESITA' DI CLASSE II)

LEGENDA
OTTIMALI
BUONO
CRITICO
ALTERATO
MOLTO ALTERATO



### Grafico 3

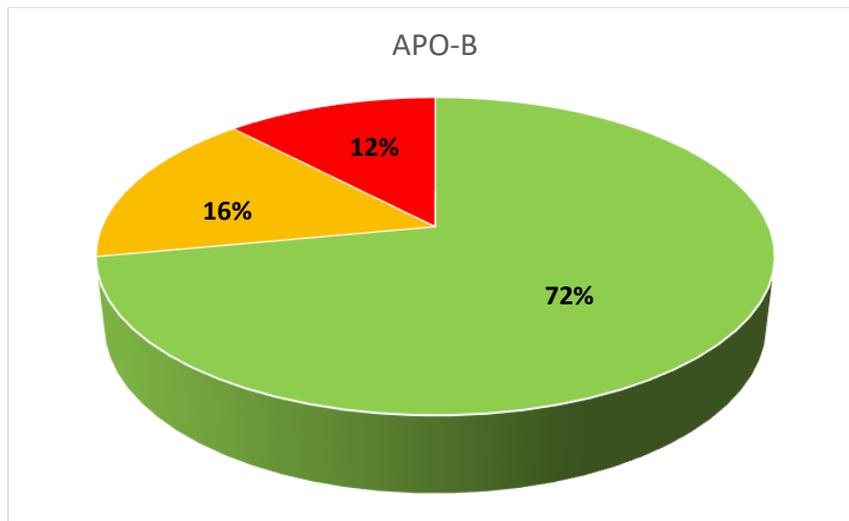
Rappresentazione grafica dei valori delle **Lipoproteine small dense – LDL** di n.232 pazienti in cui:

L'80% risulta avere valori ottimali (inferiori a 1 mmol/L)

Il 14% risulta avere valori critici (compresi tra 1-1,25 mmol/L)

IL 6% risulta avere valori alterati (> 1,25 mmol/L)

LEGENDA
OTTIMALI
BUONO
CRITICO
ALTERATO
MOLTO ALTERATO

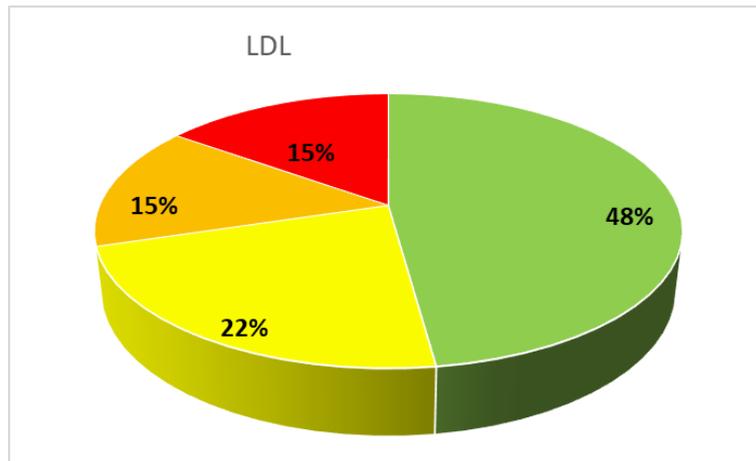


#### Grafico 4

Rappresentazione grafica dei valori di **APO-B** di n.232 pazienti in cui:

- Il 72%% risulta avere valori ottimali (inferiori a 120 mg/ml)
- Il 16% risulta avere valori critici (da 120 a 140 mg/ml)
- Il 12% risulta avere valori alterati (superiori a 140 mg/ml)

LEGENDA
OTTIMALI
BUONO
CRITICO
ALTERATO
MOLTO ALTERATO

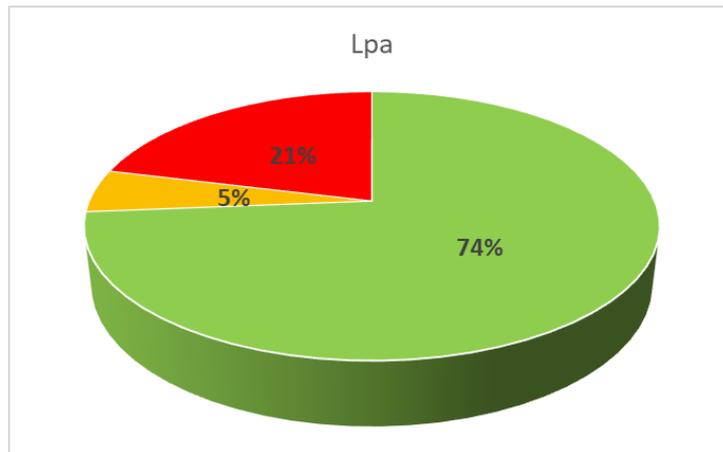


### Grafico 5

Rappresentazione grafica dei valori di **Colesterolo LDL** di n.232 pazienti in cui:

- Il 48% risulta avere valori ottimali (< 131 mg/ml)
- Il 22% risulta avere valori buoni (131 a 160 mg/ml)
- Il 15% risulta avere valori critici (da 161 a 190 mg/ml)
- Il 15% risulta avere valori alterati (superiori a 190 mg/ml)

LEGENDA
OTTIMALI
BUONO
CRITICO
ALTERATO
MOLTO ALTERATO

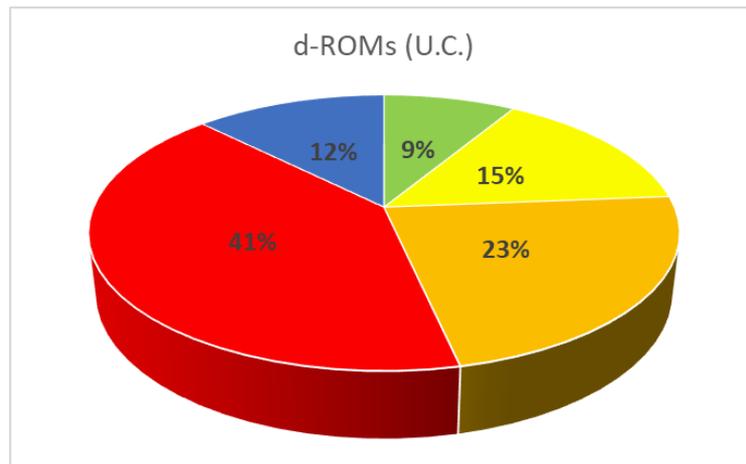


**Grafico 6**

Rappresentazione grafica dei valori della **Lipoproteina (a)- (Lpa)** di n.232 pazienti in cui:

- Il 74% risulta avere valori ottimali (inferiori a 50 nmol/L)
- Il 5% risulta avere valori critici (compresi tra 50 e 75 nmol/L)
- Il 21% risulta avere valori alterati (superiori a 75 nmol/L)

LEGENDA
OTTIMALI
BUONO
CRITICO
ALTERATO
MOLTO ALTERATO

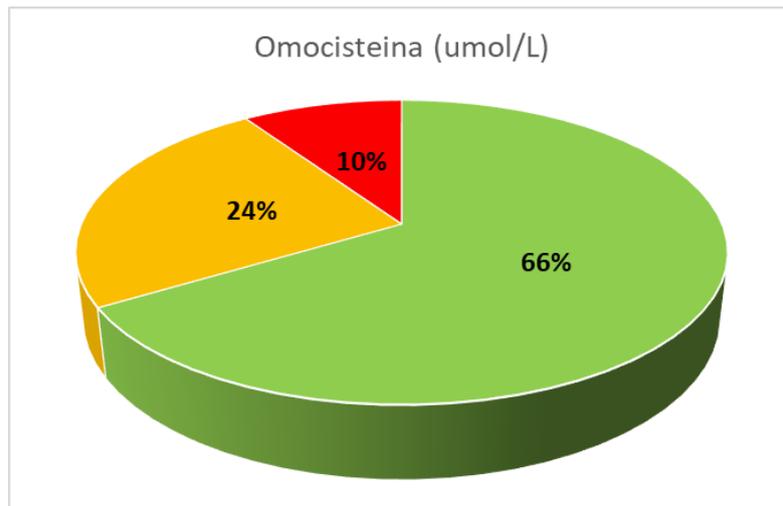


### Grafico 7

Rappresentazione grafica dei livelli **d-Roms** di n.232 pazienti in cui:

- Solo il 9% risulta avere un'azione ossidante ottimale (valori inferiori a 320 U.C)
- Il 15% risulta avere un'azione ossidante buona (valori compresi tra 321 e 360 U.C)
- Il 23 % risulta avere un'azione ossidante critica (valori compresi tra 361 e 399 U.C)
- Il 41% risulta avere un'azione ossidante alterata (valori compresi tra 400 e 500 U.C)
- Il 12% risulta avere un'azione ossidante molto alterata (superiori a 500 U.C)

LEGENDA
OTTIMALI
BUONO
CRITICO
ALTERATO
MOLTO ALTERATO

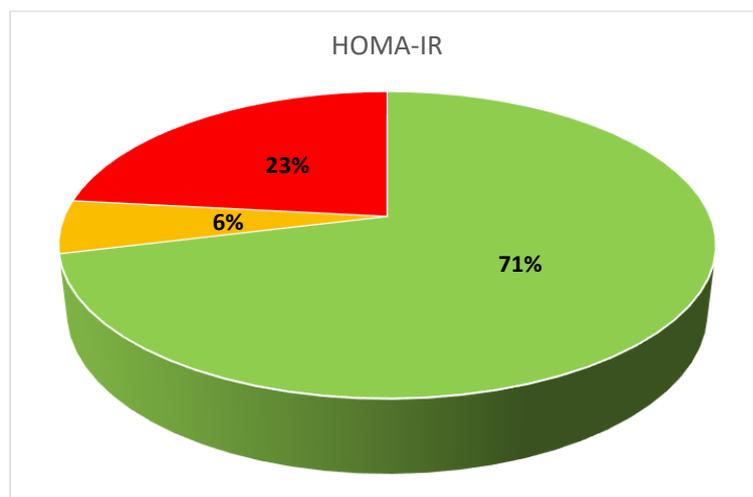


### Grafico 8

Rappresentazione grafica dei livelli di **Omocisteina** di n.232 pazienti in cui:

- Il 66% risulta avere valori ottimali (inferiori a 13 umol/L)
- Il 24% risulta avere valori critici (compresi tra 13 e 16 umol/L)
- Il 10% risulta avere valori alterati (superiori a 16 umol/L)

LEGENDA
OTTIMALI
BUONO
CRITICO
ALTERATO
MOLTO ALTERATO

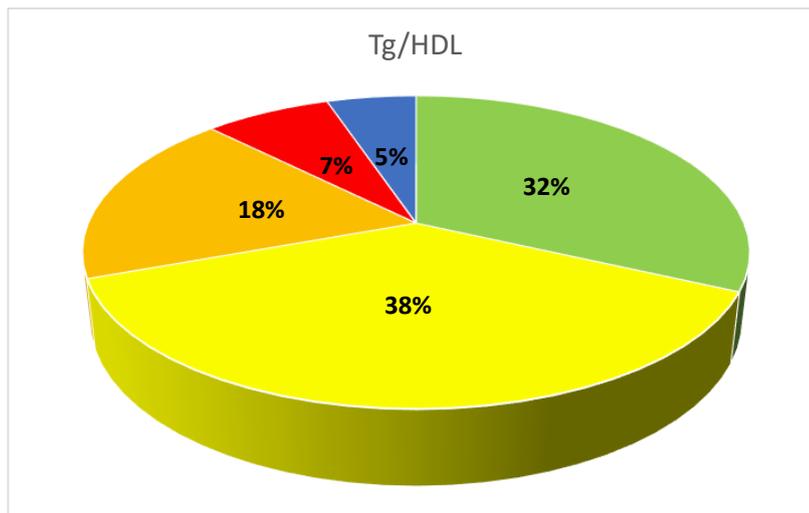


### Grafico 9

Rappresentazione grafica dei livelli di **HOMA-IR** di n.232 pazienti in cui:

- Il 71% risulta avere valori ottimali (compresi tra 0,23 e 2,5)
- Il 6% risulta avere valori critici (compresi tra 2,5 e 2,7)
- Il 23% risulta avere valori alterati (superiori a 2,7)

LEGENDA
OTTIMALI
BUONO
CRITICO
ALTERATO
MOLTO ALTERATO

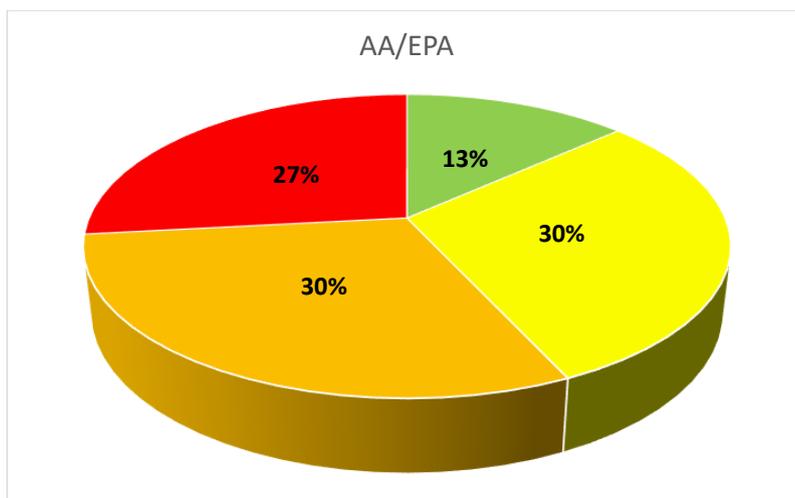


**Grafico 10**

Rappresentazione grafica del rapporto Tg/HDL di n.232 pazienti in cui:

- Il 32% risulta avere valori ottimali (inferiori a 1)
- Il 38% risulta avere valori buoni (da 1 a 2)
- Il 18% risulta avere valori critici (da 2 a 3)
- Il 7% risulta avere valori da alterati (da 3 a 4)
- Il 5% risulta avere valori molto alterati (da 4)

LEGENDA
OTTIMALI
BUONO
CRITICO
ALTERATO
MOLTO ALTERATO

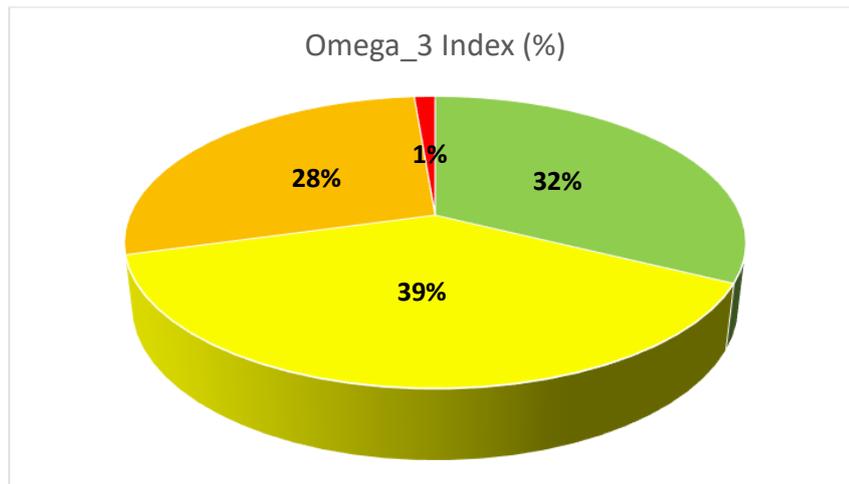


### Grafico 11

Rappresentazione grafica del rapporto AA/EPA di n.232 pazienti in cui:

- Il 13% risulta avere valori ottimali (inferiori a 6)
- Il 30% risulta avere valori buoni (tra 7 e 15)
- Il 30% risulta avere valori critici (tra 15 e 30)
- Il 27% risulta avere valori alterati (superiori a 30)

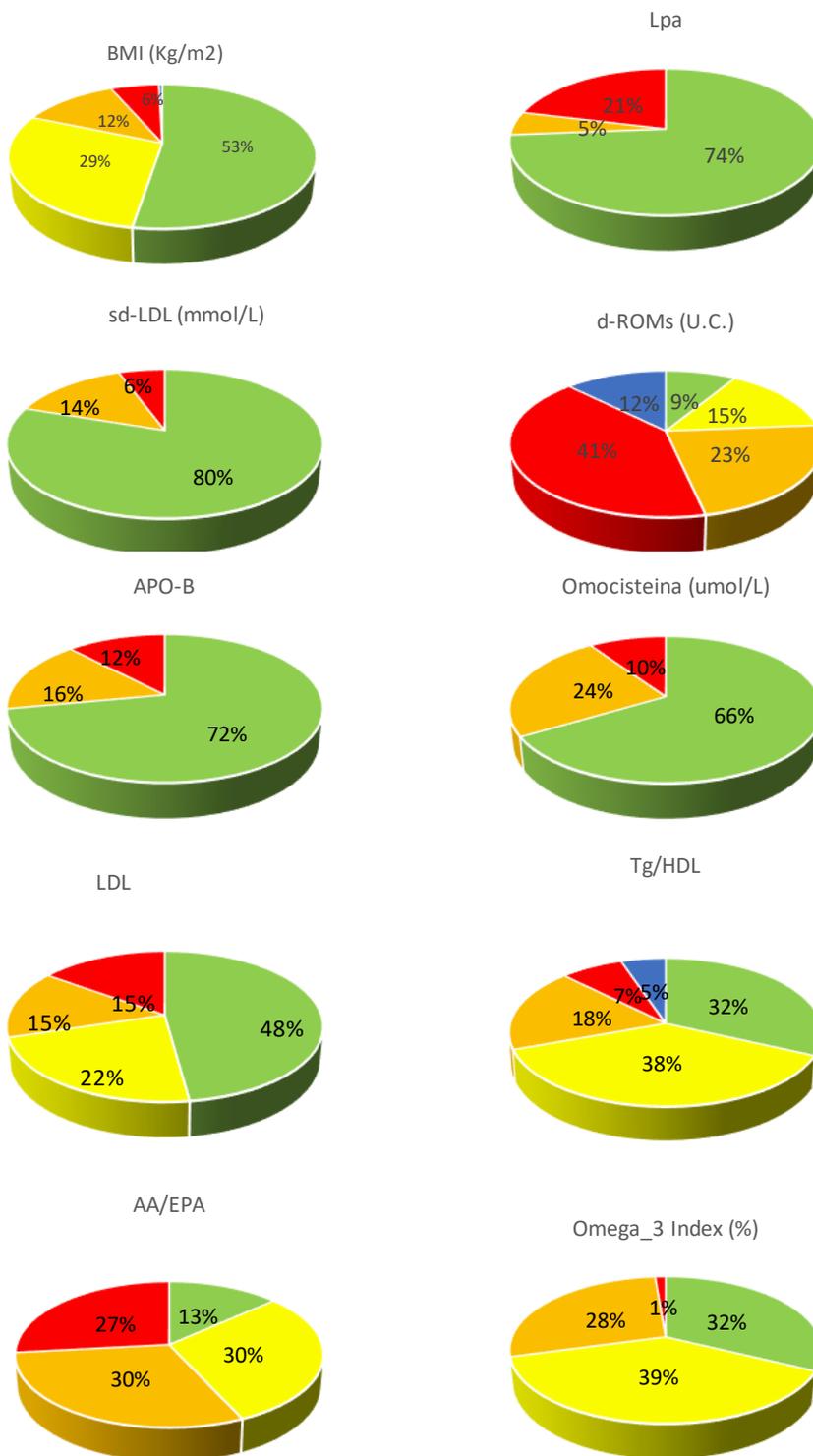
LEGENDA
OTTIMALI
BUONO
CRITICO
ALTERATO
MOLTO ALTERATO



**Grafico 12**

Rappresentazione grafica della % di **Omega 3 Index** di n.232 pazienti:

- Il 32% risulta avere valori ottimali (superiori a 8)
- Il 39% risulta avere valori buoni (tra 6 e 8)
- Il 28% risulta avere valori critici (tra 4 e 6)
- L'1% risulta avere valori alterati (inferiori a 4)

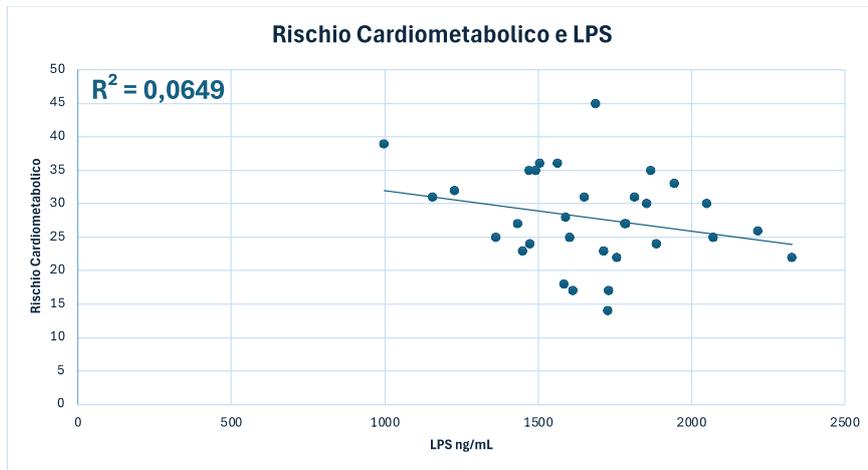


**Raggruppamento dei grafici precedentemente descritti**

Le concentrazioni ottenute dal Test ELISA LPS sono state correlate con i biomarcatori presenti nel database precedentemente costruito.

## 1. CORRELAZIONE INVERSA TRA LPS e RISCHIOCARDIOMETABOLICO

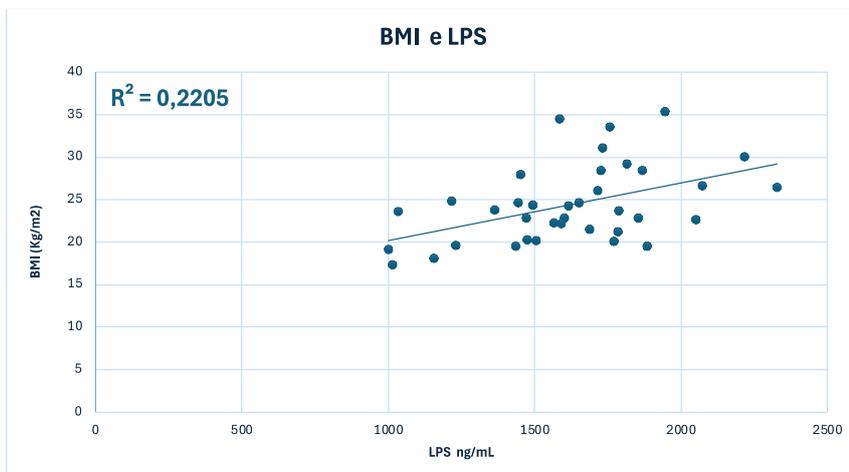
Nel grafico è possibile osservare che al diminuire del punteggio cardiometabolico aumentano le concentrazioni di LPS ng/mL



**Grafico 13**

## 2. CORRELAZIONE TRA LPS e BMI

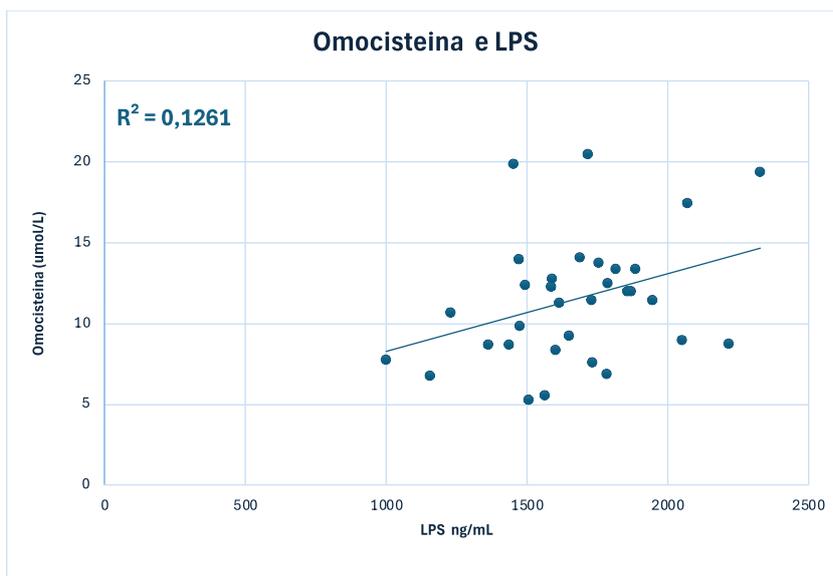
Nel grafico è possibile osservare che all'aumentare dell'Indice di Massa Corporea aumentano anche le concentrazioni di LPS ng/mL.



**Grafico 14**

### 3. CORRELAZIONE TRA LPS e OMOCISTEINA

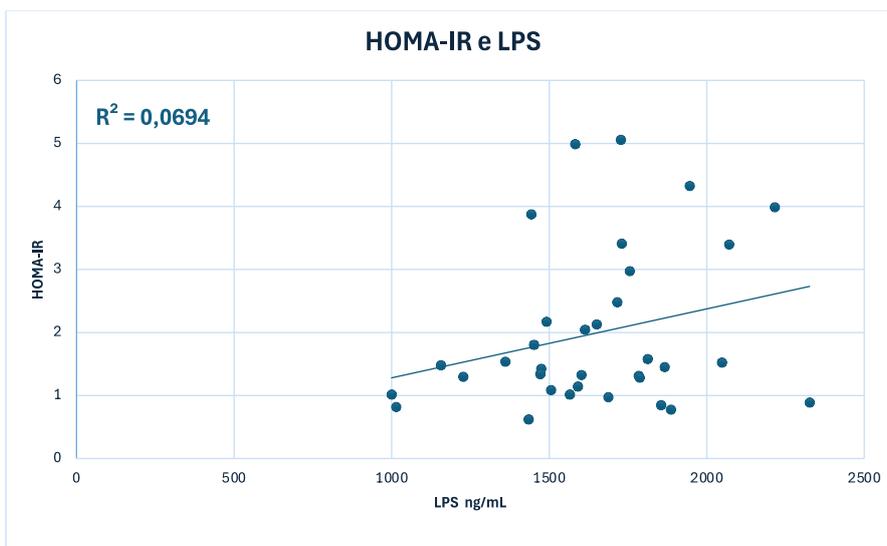
All'aumentare dei valori di Omocisteina ( $\mu\text{mol/L}$ ) le concentrazioni di LPS  $\text{ng/mL}$  risultano essere maggiori.



**Grafico 15**

### 4. CORRELAZIONE TRA LPS e HOMA – IR

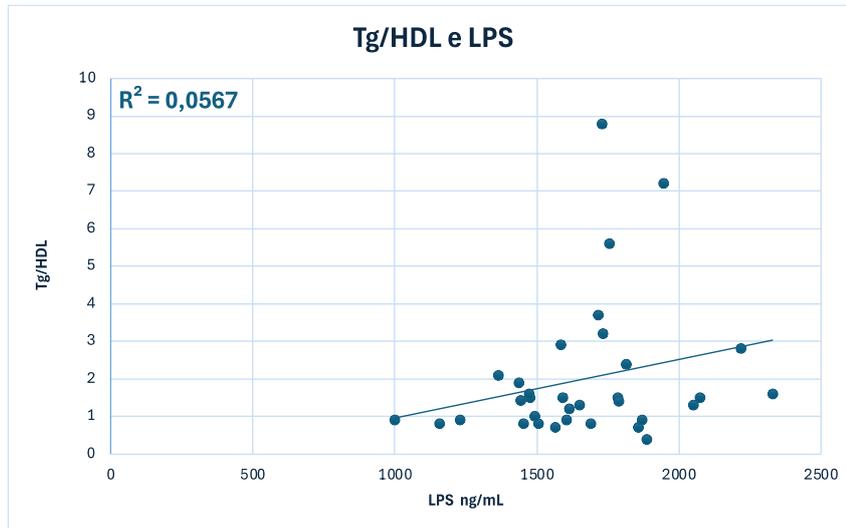
All'aumentare dell'indice di insulino-resistenza, aumentano le concentrazioni di LPS.



**Grafico 16**

## 5. CORRELAZIONE TRA LPS Tg/HDL

All'aumento del rapporto Tg/HDL, aumentano le concentrazioni di LPS.



**Grafico 17**

I biomarcatori come l'omocisteina, l'HOMA-IR e il rapporto T/HDL sono utilizzati in biochimica clinica per diagnosticare la Sindrome Metabolica (SM). Attraverso i valori di R quadro ottenuti, possiamo individuare delle correlazioni, seppur minime. Tra queste correlazioni, quella più significativa dal punto di vista statistico risulta essere tra il BMI, parametro determinante SM, e le concentrazioni di LPS, con un valore di R quadro pari a 0,2205. Il valore di R quadro ( $R^2$ ) pari a 0,2205 indica che circa il 22,05% della variabilità delle concentrazioni di LPS può essere spiegata dalla variabilità del BMI. Questo significa che c'è una relazione tra il BMI e le concentrazioni di LPS, ma ci sono molti altri fattori che influenzano i livelli di LPS che non sono catturati da questa correlazione. L'obesità è una patologia multifattoriale, la quale, oltre ad essere caratterizzata da alterazioni della motilità intestinale, è associata ad insulino resistenza, all'incremento dello stress ossidativo, all'aumento dell'espressione dei markers di infiammazione e a un'aumentata permeabilità dell'epitelio intestinale.

L'aumento della permeabilità intestinale comporta infatti un incremento del passaggio di batteri e altri antigeni presenti nel lume intestinale (es. lipopolisaccaride, LPS) attraverso la mucosa innescando così l'attivazione di processi immuno/infiammatori che determinano un notevole rimodellamento morfo-funzionale del compartimento neuromuscolare enterico, contribuendo alla genesi dei disturbi gastrointestinali.

L'articolo di Gonzalez-Quintela et al. (48) ha esaminato le concentrazioni sieriche della proteina legante i lipopolisaccaridi (LBP) nella popolazione adulta, concentrandosi sull'influenza dell'obesità e dei disturbi metabolici correlati. L'obiettivo dello studio era di esplorare l'associazione tra le concentrazioni sieriche di LBP e fattori come obesità, microbiota intestinale, permeabilità intestinale, e livelli di lipopolisaccaridi (LPS). Lo studio ha utilizzato un disegno trasversale su una popolazione adulta diversificata in termini di età (da 18 a 92 anni). Sono stati raccolti dati antropometrici, clinici e di laboratorio, inclusi BMI, biomarcatori infiammatori, enzimi epatici e altre variabili correlate.

È stata evidenziata una forte correlazione positiva tra l'indice di massa corporea (BMI) elevato e i livelli sierici di LBP, suggerendo che l'obesità potrebbe aumentare la produzione o la liberazione di LBP nel siero, attraverso alterazioni del microbiota intestinale e della permeabilità intestinale. L'articolo suggerisce che un aumento delle concentrazioni di LBP potrebbe essere associato a un'elevata esposizione a LPS, il che può contribuire all'infiammazione cronica di basso grado e ai disturbi metabolici.

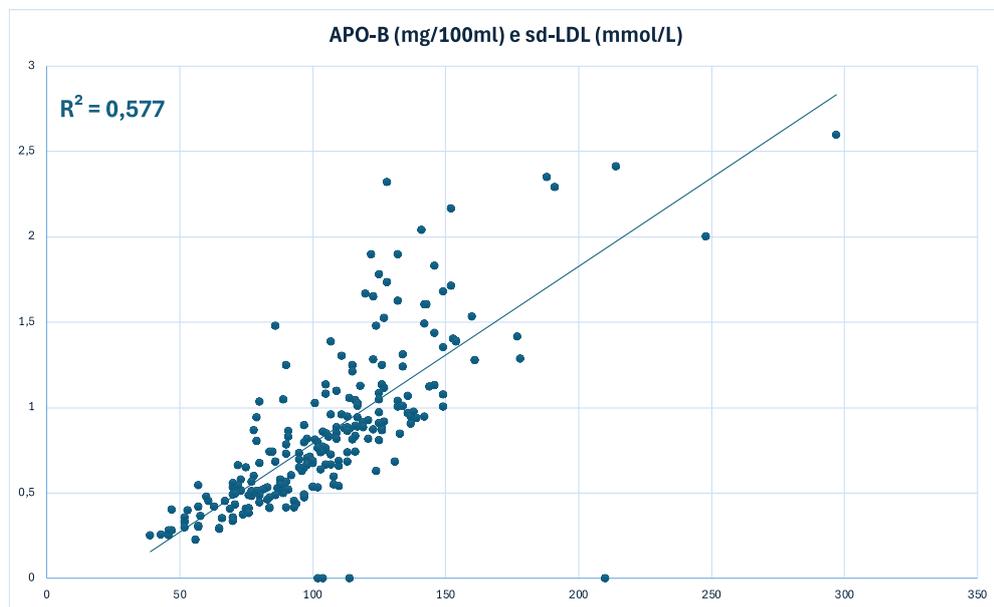
	No.	LBP ( $\mu\text{g/mL}$ )	sCD14 ( $\mu\text{g/mL}$ )
<b>Sex</b>			
Female (reference)	231	6.97 (5.71–8.55)	3.38 (2.89–3.80)
Male	189	7.39 (5.73–9.15)	3.30 (2.95–3.80)*
<b>Age</b>			
18–50 years (reference)	191	6.46 (5.24–8.24)	3.17 (2.77–3.62)
>50 years	229	7.58 (6.29–9.37)**	3.49 (3.08–3.94)**
<b>Alcohol consumption</b>			
Abstainers (reference)	195	7.07 (5.66–8.78)	3.23 (2.83–3.81)
Light-moderate drinkers	141	7.29 (5.54–8.82)	3.43 (2.94–3.80)
Heavy drinkers	84	7.06 (6.02–8.86)	3.33 (3.03–3.77)
<b>Smoking</b>			
Non-smokers (reference)	329	7.11 (5.85–8.74)	3.37 (2.90–3.80)
Smokers	91	7.18 (5.42–9.15)	3.23 (2.98–3.70)
<b>Body mass index</b>			
Normal weight (reference)	112	5.90 (5.09–7.67)	3.34 (2.89–3.80)
Overweight	180	7.29 (5.96–8.78)**	3.35 (2.91–3.84)
Obese	127	7.75 (6.35–9.47)**	3.34 (2.89–3.80)
<b>Metabolic syndrome</b>			
Absent (reference)	315	6.82 (5.48–8.40)	3.28 (2.89–3.76)
Present	105	8.02 (6.63–9.82)**	3.48 (3.09–3.89)

**Fig.14 (48)** *Concentrazioni sieriche della proteina legante i lipopolisaccaridi (LBP) e del CD14 solubile (sCD14) in relazione a variabili demografiche, fattori legati allo stile di vita e anomalie metaboliche*

In seguito, sono state correlate le concentrazioni delle Small dense LDL (sd- LDL) con altri biomarcatori presenti nel database precedentemente costruito con una coorte di n 232 pazienti.

1. CORRELAZIONE TRA APO-B (mg/100ml) e Sd-LDL (mmol/L)

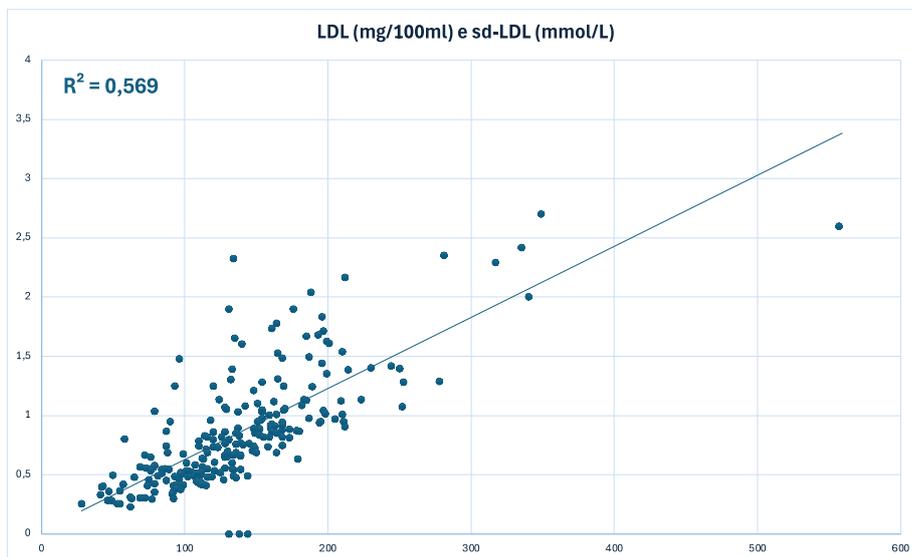
Nel seguente grafico a dispersione si può notare che l'aumento delle concentrazioni di APO-B è correlato all'aumento delle concentrazioni delle sd-LDL.



**Grafico 18**

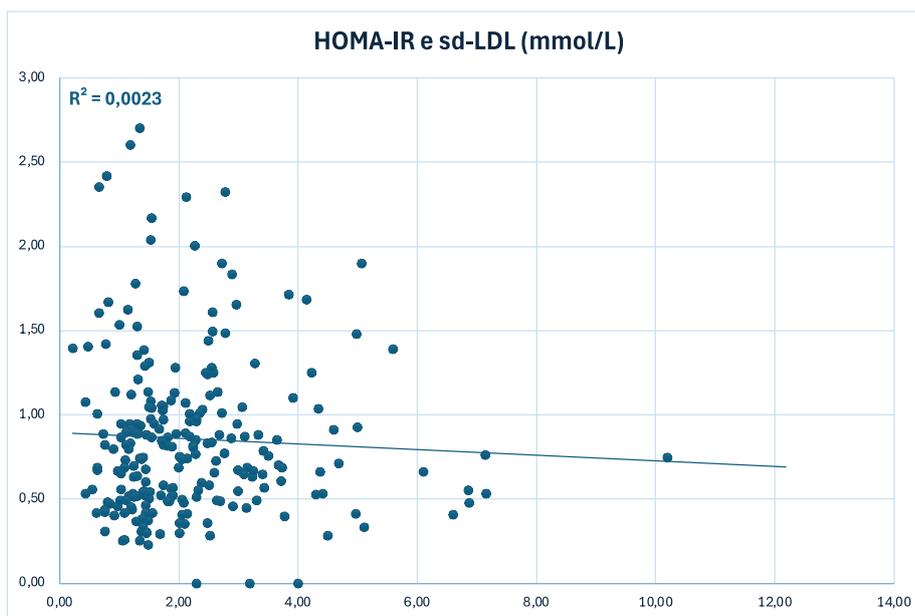
## 2. CORRELAZIONE TRA LDL e Sd-LDL

Nel seguente grafico a dispersione si può notare che l'aumento delle concentrazioni delle LDL è correlato all'aumento delle concentrazioni delle sd-LDL.



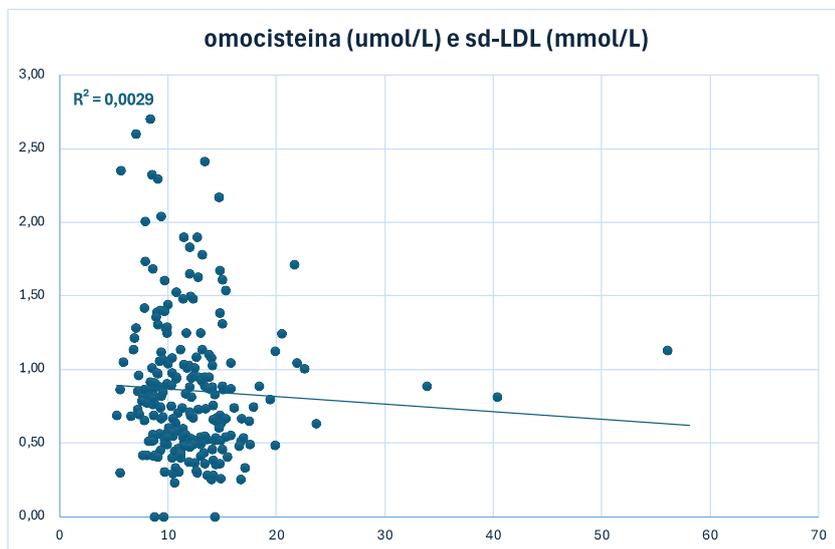
**Grafico 19**

## 3. CORRELAZIONE TRA HOMA-IR e Sd-LDL



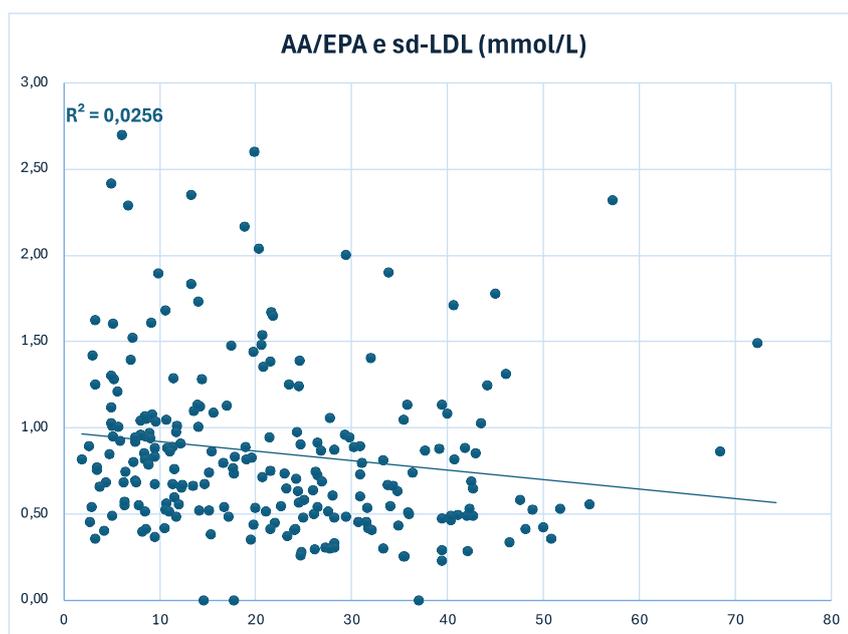
**Grafico 20**

#### 4. CORRELAZIONE TRA OMOCISTEINA e Sd-LDL



**Grafico 21**

#### 5. CORRELAZIONE TRA AA/EPA e sd-LDL



**Grafico 22**

## 5. DISCUSSIONE

Il database è uno strumento estremamente utile per una gestione efficace della salute cardiometabolica, facilitando un approccio data-driven alla cura del paziente. I vantaggi del Database nella gestione della Salute Cardiometabolica sono molteplici:

1. Identificazione dei Rischi:
  - Il database permette di identificare rapidamente i pazienti con parametri fuori norma (ad esempio, colesterolo alto, glicemia alta, pressione sanguigna elevata).
  - La codifica a colori facilita la visualizzazione immediata dei livelli di rischio.
2. Monitoraggio Continuo:
  - I dati possono essere aggiornati regolarmente, permettendo di monitorare l'andamento della salute dei pazienti nel tempo.
  - Si possono individuare miglioramenti o peggioramenti nei parametri dei pazienti.
3. Personalizzazione della Cura:
  - I medici possono usare i dati per creare piani di trattamento personalizzati basati sui rischi specifici di ciascun paziente.
  - È possibile adattare le terapie e le raccomandazioni dietetiche in base ai dati raccolti.
4. Analisi e Previsione:
  - L'analisi dei dati permette di identificare pattern e tendenze che possono aiutare a prevedere complicazioni future.
  - Gli algoritmi predittivi possono essere sviluppati per anticipare problemi di salute e intervenire preventivamente.
5. Efficienza Operativa:
  - La disponibilità di dati accurati facilita la comunicazione tra diversi specialisti e l'integrazione dei servizi sanitari.
  - Riduce la necessità di test ripetuti, ottimizzando così le risorse.

L'uso di un database per la gestione della salute cardiometabolica rappresenta un approccio data-driven che migliora significativamente la qualità delle cure. Permette decisioni più informate, interventi tempestivi e una cura personalizzata, contribuendo complessivamente a migliorare gli esiti di salute dei pazienti. Le concentrazioni di LPS (lipopolisaccaridi) misurate nel nostro studio sono risultate nettamente superiori rispetto ai cut-off proposti dalla letteratura scientifica, la quale afferma che LPS circola nei soggetti sani in un intervallo compreso tra circa 10 e 200 pg/mL. Finora, diversi test sperimentali sono stati utilizzati per scopi clinici per misurare l'attività o la concentrazione dell'LPS (44), ma non esiste consenso sulla metodologia che riflette meglio l'attività biologica dell'LPS negli esseri umani. Pertanto, una metodologia validata a livello internazionale per la misurazione dell'LPS nel sangue è obbligatoria per confermare e comprovare la relazione tra endotossinemia di basso grado ed eventi cardiovascolari (44). Le tecniche ELISA sono ben consolidate nell'analisi e nella diagnostica biochimica. Sono sensibili, robusti e affidabili. Tuttavia, sul mercato non è disponibile un metodo basato su ELISA per il rilevamento delle endotossine perché nessuno è riuscito a sviluppare anticorpi con un'ampia specificità per LPS e sufficiente affinità, dato che l'LPS è una classe di sostanze molto eterogenea. Per superare i problemi legati alla reattività crociata o ai risultati falsi positivi dovuti all'eterogeneità dell'LPS, nel 2011 è stato sviluppato l'EndoLISA (49), un nuovo test per il rilevamento sensibile dell'endotossina. Utilizzando questo principio simile all'ELISA, EndoLISA presenta chiari vantaggi rispetto ai metodi di rilevamento omogenei consolidati, tra cui: meno risultati falsi positivi indotti, ad esempio, da  $\beta$ -glucano, proteasi o fosfolipidi, meno risultati falsi negativi causati da costituenti inibitori del campione, meno risultati non validi che richiedono nuovi test, meno interferenze in campioni complessi e quindi maggiore sensibilità; e un'ampia gamma dinamica. In conclusione, la coesistenza di endotossinemia di basso grado e malattia cardiovascolare aterosclerotica nei pazienti fornisce ulteriori informazioni sui processi infiammatori alla base dell'aterosclerosi. L'endotossinemia di basso grado correlata alla permeabilità intestinale potrebbe rappresentare un nuovo strumento per esplorare ulteriormente il ruolo dell'infiammazione nella patogenesi dell'aterotrombosi.

## **BIBLIOGRAFIA**

- (1) Gut-derived low-grade endotoxaemia, atherothrombosis and cardiovascular disease – Francesco Violi, Vittoria Cammisotto, Simona Bartimoccia, Pasquale Pignatelli, Roberto Carnevale, Cristina Nocella – *Nature Reviews Cardiology* (2022)
- (2) J Frohlich, A Al-Sarraf: Cardiovascular risk and atherosclerosis prevention. *Cardiovasc Pathol* 22, 16-18 (2013)
- (3) M Viola, E Karousou, ML D'Angelo, P Moretto, I Caon, G Luca, A Passi, D Vigetti: Extracellular matrix in atherosclerosis: hyaluronan and proteoglycans insights. *Curr Med Chem* 23, 2958-2971 (2016)
- (4) J Plakkal Ayyappan, A Paul, YH Goo: Lipid droplet-associated proteins in atherosclerosis. *Mol Med Rep* 13, 45274534 (2016)
- (5) C Bancells, S Benítez, M Jauhiainen, J Or-B doñez-Llanos, PT Kovanen, S Villegas, JL Sánchez-Quesada, K Oörni: High binding affinity of electronegative LDL to human aortic proteoglycans depends on its aggregation level. *J Lipid Res* 50, 446-455 (2009)
- (6) JA Dubland, GA Francis: So Much Cholesterol: the unrecognized importance of smooth muscle cells in atherosclerotic foam cell formation. *Curr Opin Lipidol* 27, 155-161 (2016)
- (7) XH Yu, YC Fu, DW Zhang, K Yin, CK Tang: Foam cells in atherosclerosis. *Clin Chim Acta* 424, 245-252 (2013)
- (8) Y Yuan, P Li, J Ye: Lipid homeostasis and the formation of macrophage-derived foam cells in atherosclerosis. *Protein Cell* 3, 173181 (2012)
- (9) RM Krauss: Lipoprotein subfractions and cardiovascular disease risk. *Curr Opin Lipidol* 21, 305-311 (2010)
- (10) Itabe H. Oxidized low-density lipoprotein as a biomarker of in vivo oxidative stress: from atherosclerosis to periodontitis. *J Clin Biochem Nutr.* 2012 Jul;51(1):1-8.

- (11) Ravnskov U et al. Lack of an association or an inverse association between low-density-lipoprotein cholesterol and mortality in the elderly: a systematic review *BMJ Open* 2016
- (12) Diamond DM et al. Dietary Recommendations for Familial Hypercholesterolaemia: an Evidence-Free Zone *BMJ Evidence-Based Medicine* Published Online First: 05 July 2020.
- (13) Bittencourt MS et al. Very high LDL cholesterol: the power of zero passes another test. *Atherosclerosis* 2020;292:207-8.
- (14) Alvaro Alonso et al. Blood Lipids and the Incidence of Atrial Fibrillation: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis and the Framingham Heart Study. *J Am Heart Assoc.* 2014.
- (15) Bansal SK, Agarwal S, Daga MK.: Advanced atherogenic index for the assessment of consolidated lipid risk in premature coronary artery disease patients in India. *J Lab Physicians* 2016;8:77-84.
- (16) Lathan Liou et al. Association of small, dense LDL-cholesterol concentration and lipoprotein particle characteristics with coronary heart disease: A systematic review and meta-analysis. *PLOS ONE* | November 9, 2020.
- (17) Jiahua Fan et al. Small dense LDL cholesterol is associated with metabolic syndrome traits independently of obesity and inflammation. *Nutrition & Metabolism* (2019) 16:7
- (18) Alexander N. Orekhov, Igor A. Sobenin. Modified lipoproteins as biomarkers of atherosclerosis. *Frontiers In Bioscience, Landmark*, 23, 1422-1444, March 1,2018.
- (19) Cole, T. et. al. Association of Apolipoprotein B and Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy–Derived LDL Particle Number with Outcomes in 25 Clinical Studies: Assessment by the AACC Lipoprotein and Vascular

Diseases Division Working Group on Best Practices. *Clinical Chemistry* May 2013 vol. 59 no. 5 752-770

- (20) Hoogeveen, R.C et al. Small dense low-density lipoprotein-cholesterol concentrations predict risk for coronary heart disease: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2014, 34, 1069–1077.
- (21) Michael Y. Tsai et al. New Automated Assay of Small Dense Low-Density Lipoprotein Cholesterol Identifies Risk of Coronary Heart Disease: The Multi- Ethnic Study of Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014 January ; 34(1): 196–201
- (22) Henry N. Ginsberg et al. Triglyceride-rich lipoproteins and their remnants:metabolic insights, role in atherosclerotic cardiovascular disease, and emerging therapeutic strategies—a consensus statement from the European Atherosclerosis Society. *European Heart Journal* (2021) 42, 4791– 4806.
- (23) Maria C. Basil and Bruce D. Levy. Specialized pro-resolving mediators: endogenous regulators of infection and inflammation. *NATURE REVIEWS | IMMUNOLOGY VOLUME 16 | JANUARY 2016 | 51.*
- (24) Jin Endo, Makoto Arita. Cardioprotective mechanism of omega-3 polyunsaturated fatty acids. *Journal of Cardiology* 2016; 67(1):22-7.
- (25) Carla Ferreri and Chryssostomos Chatgililoglu. Role of fatty acid-based functional lipidomics in the development of molecular diagnostic tools. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2012; 12(7), 767–780
- (26) William S. Harris. Omega-3 Fatty Acids and Cardiovascular Disease: A Case for Omega-3 Index as a New Risk Factor. *Pharmacol Res.* 2007 March ; 55(3): 217– 223.
- (27) Clemens von Schacky and William S. Harris. Cardiovascular risk and the omega- 3 index. *Journal of Cardiovascular Medicine* 2007, 8 (suppl 1):S46– S49.
- (28) William S. Harris et al. Erythrocyte long-chain omega-3 fatty acid levels are inversely associated with mortality and with incident cardiovascular

- disease: The Framingham Heart Study. *Journal of Clinical Lipidology* (2018) 12, 718– 727.
- (29) Michael I McBurney, Nathan L Tintle, Ramachandran S Vasam, Aleix Sala-Vila, and William S Harris. Using an erythrocyte fatty acid fingerprint to predict risk of all-cause mortality: the Framingham Offspring Cohort *Am J Clin Nutr* 2021;00:1–8.
  - (30) Isabelle Demonty et al. Proportions of long-chain  $\omega$ -3 fatty acids in erythrocyte membranes of Canadian adults: Results from the Canadian Health Measures Survey 2012–2015 *Am J Clin Nutr* 2021;113:993–1008.
  - (31) Kristina H Jackson and William S Harris. Assessing the Omega-3 Index in a population: Canada did it right *Am J Clin Nutr* 2021;113:779–780.
  - (32) Ken D. Stark et al. Global survey of the omega-3 fatty acids, docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid in the blood stream of healthy adults. *Progress in Lipid Research* 63 (2016) 132–152
  - (33) Qin J, Li R, Raes J, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*. 2010; 464: 59-65.
  - (34) Karlsson FH, Fåk F, Nookaew I, et al. Symptomatic atherosclerosis is associated with an altered gut metagenome. *Nat Commun*. 2012; 3: 1245.
  - (35) Intestinal dysbiosis and myocardial infarction: new mechanisms of atherosclerosis Roberto Carnevale, Vittoria Camisotto, Cristina Nocella, Francesco Violi - *Giornale Italiano dell'Arteriosclerosi* 2020; 11 (3): 27-41
  - (36) Di Vincenzo F, Del Gaudio A, Petito V, Lopetuso LR, Scaldaferri F. Gut microbiota, intestinal permeability, and systemic inflammation: a narrative review. *Intern Emerg Med*. 2024 Mar;19(2):275-293. doi: 10.1007/s11739-023-03374-w. Epub 2023 Jul 28. PMID: 37505311; PMCID: PMC10954893.
  - (37) Vancamelbeke M, Vermeire S (2017) La barriera intestinale: un ruolo fondamentale nella salute e nella malattia. *Esperto Rev Gastroenterol Hepatol* 11(9):821–834
  - (38) Pelaseyed T, Bergström JH, Gustafsson JK, Ermund A, Birchenough GMH, Schütte A et al (2014) Il muco e le mucine delle cellule caliciformi e degli

- enterociti forniscono la prima linea di difesa del tratto gastrointestinale e interagiscono con il sistema immunitario. *Immunol Rev* 260(1):8–20
- (39) Paone P, Cani PD (2020) Barriera mucosa, mucine e microbiota intestinale: i partner viscosi attesi? *Gut* 69(12):2232–2243
- (40) Herath M, Hosie S, Bornstein JC, Franks AE, Hill-Yardin EL (2020) Il ruolo del sistema del muco gastrointestinale nell'omeostasi intestinale: implicazioni per i disturbi neurologici. La cellula anteriore infetta il microbiota 10:248
- (41) Yoshida N, Emoto T, Yamashita T, Watanabe H, Hayashi T, Tabata T et al (2018) *Bacteroides vulgatus* e *bacteroides dorei* riducono la produzione di lipopolisaccaridi microbici intestinali e inibiscono l'aterosclerosi. *Circolazione* 138(22):2486–2498
- (42) Saad, MJA & Santos, A. & Prada, PO Collegamento del microbiota intestinale e dell'infiammazione all'obesità e alla resistenza all'insulina. *Fisiologia* 31 , 283–293 (2016).
- (43) Saad MJ, Santos A, Prada PO. Linking gut microbiota and inflammation to obesity and insulin resistance. *Physiology*. 2016;31:283–293.
- (44) Violi, F., Cammisotto, V., Bartimoccia, S. et al. Endotossinemia di basso grado di origine intestinale, aterotrombosi e malattie cardiovascolari. *Nat Rev Cardiol* 20 , 24–37 (2023).
- (45) Intestinal dysbiosis and myocardial infarction: new mechanisms of atherosclerosis Roberto Carnevale, Vittoria Camisotto, Cristina Nocella, Francesco Violi - *Giornale Italiano dell'Arteriosclerosi* 2020; 11 (3): 27-41c
- (46) Gorabi AM, Kiaie N, Khosrojerdi A, Jamialahmadi T, Al-Rasadi K, Johnston TP, Sahebkar A. Implications for the role of lipopolysaccharide in the development of atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med*. 2022 Nov;32(8):525-533. doi: 10.1016/j.tcm.2021.08.015. Epub 2021 Sep 5. PMID: 34492295.
- (47) Il lipopolisaccaride sierico derivato dall'intestino è associato a un' aumentato rischio di eventi cardiovascolari avversi maggiori nella fibrillazione atriale: effetto dell'aderenza alla dieta mediterranea. Dott. Daniele Pastori;\* Roberto Carnevale, PhD;\* Cristina Nocella, PhD; Marta Novo, PhD;

Dott.ssa Maria Santulli; Vittoria Cammisotto, PhD; Dott. Danilo Menichelli; Dott. Pasquale Pignatelli; Dott. Francesco Violi

- (48) Gonzalez-Quintela A, Alonso M, Campos J, Vizcaino L, Loidi L, Gude F (2013) Determinanti delle concentrazioni sieriche della proteina legante i lipopolisaccaridi (LBP) nella popolazione adulta: il ruolo dell'obesità. PLoS UNO 8(1): e54600. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054600>
- (49) Grallert, H., Leopoldseeder, S., Schuett, M. *et al.* EndoLISA<sup>®</sup> : un metodo innovativo e affidabile per il rilevamento delle endotossine. *Metodi Nat* 8 , iii–v (2011). <https://doi.org/10.1038/nmeth.f.350>
- (50) Visseren FLJ, Mach F, Smulders YM, et al. 2021 ESC Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice. *Eur Heart J* 2021;42:3227-3337.
- (51) Harold Superko and Brenda Garrett. Small Dense LDL: Scientific Background, Clinical Relevance, and Recent Evidence Still a Risk Even with ‘Normal’ LDL-C Levels. *Biomedicines* 2022, 10, 829.
- (52) Ken D. Stark et al. Global survey of the omega-3 fatty acids, docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid in the blood stream of healthy adults. *Progress in Lipid Research* 63 (2016) 132–152
- (53) Angela M Rizzo et al. A Rapid Method for Determining Arachidonic: eicosapentaenoic Acid Ratios in Whole Blood Lipids: Correlation With Erythrocyte Membrane Ratios and Validation in a Large Italian Population of Various Ages and Pathologies. *Lipids Health Dis*; 2010 Jan 27;9:7.
- (54) Pusceddu I. et al. Subclinical inflammation, telomere shortening, homocysteine, vitamin B6, and mortality: the Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health Study. *Eur J Nutr* 2020 Jun;59(4):1399-1411.
- (55) Nobuyuki Masaki et al. Usefulness of the d-ROMs test for prediction of cardiovascular events. *International Journal of Cardiology* 222 (2016) 226–232.
- (56) Paul Holvoet et al. Association Between Circulating Oxidized Low-Density Lipoprotein and Incidence of the Metabolic Syndrome. *JAMA*, May 21, 2008— Vol 299, No. 19
- (57) Tingting Du et al. Clinical usefulness of lipid ratios, visceral adiposity

indicators, and the triglycerides and glucose index as risk markers of insulin resistance. *Cardiovascular Diabetology* 2014, 13:146

- (58) Sanjiv Kumar Bansal, Sarita Agarwal, Mridul Kumar Daga. Advanced Atherogenic Index for the Assessment of Consolidated Lipid Risk in Premature Coronary Artery Disease Patients in India. *Journal of Laboratory Physicians / Jul-Dec 2016 / Vol-8 / Issue-2*
- (59) Esse R, Barroso M, Tavares de Almeida I, Castro R. The Contribution of Homocysteine Metabolism Disruption to Endothelial Dysfunction: State-of-the-Art. *Int J Mol Sci.* 2019 Feb 17;20(4):867.
- (59) Filippo Pigazzani et al. The Prognostic Value of Derivatives-Reactive Oxygen Metabolites (d-ROMs) for Cardiovascular Disease Events and Mortality: A Review. *Antioxidants* 2022, 11, 1541.
- (60) Tingting Du et al. Clinical usefulness of lipid ratios, visceral adiposit indicators, and the triglycerides and glucose index as risk markers of insulin resistance. *Cardiovascular Diabetology* 2014, 13:146
- (61) Tatjana Rundek et al. Insulin Resistance and Risk of Ischemic Stroke Among Nondiabetic Individuals From the Northern Manhattan Study. *Arch Neurol.* 2010;67(10):1195-1200

