

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI GENOVA

Scuola di Scienze Mediche e Farmaceutiche



Dottorato di Ricerca XXXVIII CICLO

EMATO ONCOLOGIA E MEDICINA INTERNA CLINICO-TRASLAZIONALE

Orientamento:

GERONTOLOGIA, NUTRIZIONE E MEDICINA ANTI AGING

Coordinatore: Prof. Alessio Nencioni

**Analisi comparativa della funzionalità HDL e della capacità di carico del
colesterolo sierico in pazienti con colangite biliare primitiva e
ipercolesterolemia poligenica**

Tutor:

Prof.ssa Livia Pisciotta

Candidata:

Dott.ssa Elena Formisano

INDICE

GLOSSARIO	2
ABSTRACT	4
INTRODUZIONE	6
1. Colangite biliare primitiva	6
1.1 Patogenesi	7
1.2 Decorso clinico, stadi di malattia e principali complicanze	8
1.3 Terapie	10
2. Dislipidemia nella colangite biliare primitiva	14
2.1 Alterazioni qualitative delle lipoproteine nella PBC	16
3. Rischio cardiovascolare nella colangite biliare primitiva	19
4. Trasporto inverso del colesterolo: basi biologiche e cellulari	22
5. Capacità di efflusso del colesterolo (CEC): misura funzionale del trasporto inverso	25
6. Capacità di carico del colesterolo (CLC): misura funzionale dell'accumulo di colesterolo nei macrofagi	27
LAVORO SPERIMENTALE	30
7. Scopo dello studio	31
8. Materiali e metodi	31
8.1 Disegno dello studio e criteri di eleggibilità	31
8.2. Metodi	33
8.3. Selezione dei comparatori e propensity score matching	36
8.4 Analisi statistica	37
9. Risultati	39
10. Discussione	44
11. Conclusione	50
12. Bibliografia	52

GLOSSARIO

Abbreviazione	Significato
ABCA1	ATP-binding cassette transporter A1
ABCG1	ATP-binding cassette transporter G1
ABCG4	ATP-binding cassette transporter G4
ACAT	Acyl-CoA:cholesterol acyltransferase
ALP	Fosfatasi alcalina
ALT	Alanina aminotransferasi
AMA	Anticorpi anti-mitocondrio
anti-M2 / M2	Sottotipo M2 degli anticorpi anti-mitocondrio
apoA-I	Apolipoproteina A-I
apoA-II	Apolipoproteina A-II
apoB / apoB-100	Apolipoproteina B / Apolipoproteina B-100
apoE	Apolipoproteina E
AST	Aspartato aminotransferasi
BMI	Body mass index (indice di massa corporea)
BSA	Albumina sierica bovina
cAMP	Adenosina monofosfato ciclico
CEC	Capacità di efflusso del colesterolo
CHO-K1	Chinese hamster ovary cells K1
CHO-L3	Linea cellulare CHO esprimente ABCG1
CLC	Capacità di carico del colesterolo
CYP7A1	Colesterolo 7 α -idrossilasi
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
E2	Subunità E2 del complesso della piruvato-deidrogenasi
EASL	European Association for the Study of the Liver
EZR	Easy R
FBS	Fetal bovine serum
FCS	Fetal calf serum
FGF19	Fibroblast growth factor 19
FGF21	Fibroblast growth factor 21
FGFR4	Fibroblast growth factor receptor 4
FXR	Farnesoid X receptor

Abbreviazione	Significato
gGT	Gamma-glutamyl transferasi
HCC	Carcinoma epatocellulare
HDL	Lipoproteine ad alta densità
HDL-C	Colesterolo HDL
J774	Linea cellulare macrofagica murina
JNK	c-Jun N-terminal kinase
LCAT	Lecitina-colesterolo aciltransferasi
LDL	Lipoproteine a bassa densità
LDL-C	Colesterolo LDL
Lp-X	Lipoproteina X
Lp-Y	Lipoproteina Y
LXR	Liver X receptor
NK/NKT	Natural killer / Natural killer T
OCA	Acido obeticolico
PBC	Colangite biliare primitiva
PBS	Phosphate-buffered saline
PCSK9	Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9
PD	Diffusione passiva
PH	Ipercolesterolemia poligenica
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate
PPAR	Peroxisome proliferator-activated receptor
PPAR-α / PPAR-δ	Peroxisome proliferator-activated receptor alfa / delta
PXR	Pregnane X receptor
SCARB1	Scavenger receptor class B member 1
SR-BI	Scavenger receptor class B type I
TC	Colesterolo totale
TG	Trigliceridi
THP-1	Linea cellulare monocitica umana THP-1
UDCA	Acido ursodesossicolico
VLDL	Lipoproteine a densità molto bassa

ABSTRACT

Introduzione: la colangite biliare primitiva (PBC) è una malattia colestatica autoimmune frequentemente associata a ipercolesterolemia, ma non a un incremento proporzionale del rischio cardiovascolare aterosclerotico. Questo apparente paradosso suggerisce che, oltre ai parametri lipidici tradizionali, possano avere un ruolo determinante la qualità e la funzionalità delle lipoproteine. Obiettivo dello studio è stato confrontare la funzionalità HDL e il potenziale pro-aterogeno del siero in pazienti con PBC rispetto a soggetti con ipercolesterolemia poligenica (PH), mediante valutazione della capacità di efflusso del colesterolo (CEC) e della capacità di carico del colesterolo sierico (CLC).

Materiali e metodi: è stato condotto uno studio osservazionale prospettico monocentrico. Sono stati inclusi pazienti adulti con PBC seguiti presso la Clinica Gastroenterologica IRCCS Ospedale Policlinico San Martino tra gennaio e agosto 2024 e confrontati con un gruppo di soggetti con PH selezionati mediante propensity score matching sulla base di età, sesso, BMI, comorbidità, familiarità cardiovascolare, fumo e parametri lipidici basali. Tutti i pazienti con PBC erano in trattamento con UDCA, mentre i soggetti con PH seguivano sola terapia dietetica e non assumevano farmaci ipolipemizzanti. Sono state misurate la CLC sierica e la CEC totale, oltre alle sue componenti via-specifiche: ABCA1-mediata, diffusione passiva (PD), ABCG1-mediata e SR-BI-mediata.

Risultati: dopo il matching, l'analisi prospettica ha incluso 23 pazienti con PBC e 13 con PH, con caratteristiche demografiche comparabili e senza differenze significative nel profilo lipidico. La CEC totale è risultata sovrapponibile tra i gruppi [18.5 (18.1–20.9) vs 19.1 (18.8–19.7) %/4 h; $p=0.361$]. Tra le componenti della CEC, la quota mediata da PD è risultata significativamente più elevata nei pazienti con PBC [13.3 (12.9–13.9) vs 12.67 (12.1–13.1) %/4 h; $p=0.008$], mentre non sono emerse differenze significative per ABCA1, ABCG1 e SR-BI. La CLC è risultata significativamente inferiore nel gruppo PBC rispetto al

gruppo PH [35.2 (29.2–35.6) vs 43.8 (37.6–48.3) $\mu\text{g}/\text{mg}$; $p=0.001$]. Tale associazione è rimasta significativa anche nell'analisi multivariata, con una differenza aggiustata di 7.02 $\mu\text{g}/\text{mg}$ (IC95% 2.0–12.0; $p=0.008$).

Conclusione: i pazienti con PBC presentano un profilo funzionale del trasporto del colesterolo distinto rispetto ai soggetti con PH, caratterizzato da una minore capacità del siero di promuovere l'accumulo di colesterolo nei macrofagi e da una CEC complessivamente preservata, sostenuta in maggiore misura dalla diffusione passiva. Questi risultati forniscono un possibile razionale biologico al paradosso cardiovascolare della PBC e suggeriscono che misure funzionali come CLC e CEC potrebbero integrare il profilo lipidico standard nella valutazione del rischio cardiovascolare.

INTRODUZIONE

1. Colangite biliare primitiva

La colangite biliare primitiva (PBC) è una malattia epatica cronica colestatica a patogenesi autoimmune, caratterizzata dalla progressiva distruzione dei piccoli dotti biliari intraepatici. Se non adeguatamente trattata, può evolvere verso una colestasi persistente con danno epatocellulare e progressione della fibrosi fino alla cirrosi e alle relative complicanze, incluse l'insufficienza epatica e l'epatocarcinoma[1,2].

La diagnosi di PBC è generalmente posta quando sono presenti almeno 2 dei seguenti criteri: la persistenza di un incremento degli indici di colestasi (fosfatasi alcalina sierica $\geq 1,5$ volte il limite normale per almeno 6 mesi), la presenza nel siero di autoanticorpi anti-mitocondrio (AMA, tipicamente anti-M2) ad alto titolo, e un quadro istologico compatibile (colangite cronica non-suppurativa con distruzione granulomatosa dei dotti biliari). Nella pratica clinica odierna, la biopsia epatica non è sempre necessaria quando i criteri bio-umorali e sierologici sono soddisfatti, dato l'elevatissimo valore predittivo degli AMA (presenti nel ~90–95% dei pazienti) e la specificità quasi assoluta dell'anticorpo anti-M2 per la PBC[3,4].

La PBC è stata considerata a lungo una malattia rara, ma negli ultimi decenni la prevalenza è aumentata, verosimilmente per una maggiore consapevolezza diagnostica e per la migliore sopravvivenza dei pazienti in terapia[5]. L'incidenza della PBC varia da 1.76 a 14.60 casi per 100,000 persone, con tassi più elevati osservati in Nord America, in particolare colpisce prevalentemente il sesso femminile di mezza età[5]. Storicamente, si riportava un rapporto donne:uomini anche di 9:1, tipicamente diagnosticata tra i 40 e i 60 anni; tuttavia, studi epidemiologici più recenti hanno evidenziato una graduale riduzione di questo divario di genere, pur confermando una netta predominanza femminile (rapporto circa 4–6:1)[5,6]. Tale marcata predisposizione femminile, insieme all'associazione

frequente con altre malattie autoimmuni (es. Sjögren, artrite reumatoide), suggerisce il coinvolgimento di fattori ormonali e immunogenetici nell'eziologia della PBC. Diversi studi hanno infatti ipotizzato che anomalie del mosaico cromosomico X, differenze nell'immunoregolazione e fattori ambientali (come esposizioni a xenobiotici o infezioni) possano contribuire a scatenare la risposta autoimmune in individui geneticamente predisposti, prevalentemente di sesso femminile[7–9].

1.1 Patogenesi

La PBC è una patologia autoimmune organo-specifica diretta contro l'epitelio dei piccoli dotti biliari intraepatici e, nella maggior parte dei pazienti ($\approx 95\%$), si osservano AMA diretti contro il complesso enzimatico della piruvato-deidrogenasi, in particolare la subunità E2 (antigene M2), localizzata sui mitocondri delle cellule epiteliali biliari[10]. Nonostante l'AMA sia altamente specifico, il suo ruolo patogenetico non è completamente chiarito, poiché esistono individui AMA-positivi asintomatici e rari pazienti AMA-negativi con PBC conclamata[3,4]. Pertanto, si ritiene che fattori ambientali (es. infezioni batteriche con mimetismo molecolare, esposizione a sostanze chimiche) possano innescare una risposta immune anomala in soggetti geneticamente predisposti[11,12]. Dal punto di vista immunitario, la lesione caratteristica è la colangite destruente non suppurativa, ovvero un infiltrato infiammatorio portale ricco di linfociti, cellule NK/NKT, macrofagi e plasmacellule circonda i dotti biliari interlobulari, portando alla distruzione granulomatosa progressiva dei colangiociti. I linfociti T CD8⁺ attivati giocano un ruolo centrale, mediando il danno duttale sotto lo stimolo di linfociti T helper CD4⁺ autoreattivi che riconoscono antigeni dei colangiociti[13]. Nelle fasi iniziali della PBC predomina una risposta di tipo Th1 (interleuchina-12 mediata), mentre nelle fasi più avanzate emerge una componente Th17 (interleuchina-23 mediata) che contribuisce all'infiammazione cronica.

Contestualmente, si osserva una riduzione delle cellule T regolatorie funzionali, che normalmente controllerebbero l'autoimmunità: tale difetto potrebbe dipendere sia da fattori intrinseci sia dall'azione soppressiva aberrante di cellule B autoreattive[14]. Il risultato di questo processo è l'obliterazione progressiva dei duttuli biliari intraepatici, con conseguente colestasi cronica. La ritenzione di componenti biliari citotossici (in primis acidi biliari idrofobici) nel fegato causa danno diretto agli epatociti periportal, infiammazione e attivazione stellata con fibrogenesi. Si instaura così un circolo vizioso di colestasi e danno epatico che – in assenza di trattamento – porta nel tempo alla riduzione dei dotti biliari funzionanti (ductopenia) e alla progressione verso la cirrosi biliare[3]. Va notato che i meccanismi difensivi dei colangiociti contro la bile tossica risultano compromessi nella PBC, rendendo i duttuli più suscettibili all'azione detergente degli acidi biliari. In sintesi, la patogenesi essenziale della PBC coinvolge un'interazione complessa tra autoimmunità (perdita di tolleranza verso antigeni biliari), danno duttale colestatico mediato immunologicamente e conseguente ritenzione di bile che perpetua l'infiammazione e la fibrosi[15].

1.2 Decorso clinico, stadi di malattia e principali complicanze

Il decorso clinico della PBC è eterogeneo: al momento della diagnosi il 61–90% dei pazienti è asintomatico e fino al 50% può sviluppare sintomi entro i successivi cinque anni[16,17]. Quando presenti, i disturbi più frequenti sono affaticamento cronico e prurito generalizzato, legato alla colestasi e all'accumulo/azione di mediatori pruritogeni, tra questi i sali biliari. Nelle fasi più avanzate possono comparire ittero (da iperbilirubinemia colestatica), xantelasmi e xantomi (depositi di colesterolo) e manifestazioni correlate al malassorbimento dei grassi e delle vitamine liposolubili, con possibili conseguenze

scheletriche quali osteopenia/osteoporosi, soprattutto in relazione alla carenza di vitamina D[6].

La PBC presenta quattro stadi istologici classici, secondo la classificazione di Scheuer[18] e Ludwig et al.[19]: stadio I con predominanza di lesioni infiammatorie floride attorno ai dotti ma architettura conservata; stadio II con espansione dell'infiammazione a livello periportale e iniziale fibrosi; stadio III con fibrosi più estesa e setti fibrosi che collegano spazi portalì e portocentrali; stadio IV corrispondente a cirrosi conclamata. Clinicamente, la progressione varia, in quanto alcuni pazienti, soprattutto con malattia diagnosticata precocemente e ben trattata, rimangono in fase iniziale per molti anni con minima evoluzione, mentre altri invece possono progredire più rapidamente verso la fibrosi e la cirrosi. Con il progredire della colestasi cronica, oltre alle manifestazioni sistemiche già menzionate, compaiono le complicanze tipiche della cirrosi epatica quali ipertensione portale, il peggioramento della funzionalità epatica fino all'insufficienza d'organo e l'aumentato rischio di HCC[6]. In particolare, il rischio di HCC in pazienti PBC cirrotici sembra più elevato nei soggetti di sesso maschile e nei non-responders alla terapia, sebbene la PBC sia molto più rara nei maschi[20].

Senza trattamento, la PBC tendeva a progredire nel tempo con avanzamento della fibrosi fino alla cirrosi e sviluppo di complicanze correlate, ma l'introduzione di terapie specifiche ha modificato sostanzialmente la storia naturale della malattia, migliorando la sopravvivenza libera da trapianto e riducendo il rischio di complicanze. In ogni caso, quando la PBC è già in fase avanzata, prognosi e mortalità sono in larga parte condizionate dalle complicanze epatiche, mentre nelle fasi iniziali, una quota maggiore di eventi avversi può essere legata a condizioni concomitanti extraepatiche.[5]. L'indicazione al trapianto di fegato in PBC può essere posta secondo i criteri standard attribuibili ad altri pazienti epatopatici, ma anche in presenza di prurito refrattario severo; dopo il trapianto, la

sopravvivenza a 5 anni è alta (>80%) ma la malattia può recidivare sul graft in una percentuale di casi (fino al 20–30% a 10 anni)[6].

1.3 Terapie

L'obiettivo principale nel trattamento della PBC è rallentare o arrestare la distruzione dei dotti biliari, migliorare i sintomi colestatici e prevenire le complicanze a lungo termine della colestasi cronica. Attualmente, la terapia di prima linea universalmente raccomandata è l'acido ursodesossicolico (UDCA), un acido biliare idrofilo che riduce la quota di acidi biliari più idrofobici e potenzialmente citotossici. L'UDCA, somministrato alla dose ottimale di 13–15 mg/kg/die, ha dimostrato di migliorare gli indici biochimici di colestasi, ritardare la progressione istologica e aumentare la sopravvivenza libera da trapianto, soprattutto se iniziato nelle fasi precoci di malattia[3]. I meccanismi d'azione dell'UDCA sono molteplici: esso riduce la citotossicità della bile sostituendo parzialmente gli acidi biliari endogeni più idrofobici, protegge i colangiociti e gli epatociti periportalari dagli acidi biliari tossici, stimola la secrezione biliare a livello epatocellulare e dutturale e possiede effetti anti-infiammatori e immunomodulatori. Sul piano clinico, circa il 60% dei pazienti ottiene una risposta biochimica soddisfacente all'UDCA (normalizzazione o marcata riduzione di ALP e transaminasi); i restanti non-responder parziali (~30–40%) o intolleranti richiedono terapie aggiuntive di seconda linea, generalmente in associazione a UDCA (o come alternativa nei rari casi di intolleranza), con l'obiettivo di ottenere una risposta biochimica più profonda[21]. Nella pratica e nei principali trial registrativi, la risposta al trattamento viene definita come riscontro di ALP <1,67×ULN, riduzione dell'ALP ≥15% rispetto al basale e bilirubina totale entro il limite superiore della norma del laboratorio, poiché tale profilo si associa a una prognosi più favorevole ed è impiegato come surrogato di beneficio clinico[3,6,22–24].

L'acido obeticolico (OCA) è un analogo semisintetico degli acidi biliari e potente agonista del recettore FXR, espresso soprattutto in enterociti ed epatociti. L'attivazione di FXR induce il rilascio di FGF19 dall'ileo, il segnale a valle, attraverso FGFR4 epatico, sopprime CYP7A1 e riduce la sintesi di acidi biliari[25]. Sono descritti anche effetti su geni coinvolti nel trasporto biliare e un'azione anti-infiammatoria/antifibrotica mediata da circuiti regolatori[22–24]. Nello studio POISE, che ha incluso 216 pazienti con risposta inadeguata o intolleranza a UDCA, OCA ha incrementato in modo significativo il raggiungimento dell'endpoint composito: 46% nel braccio con titolazione 5–10 mg e 47% nel braccio 10 mg, rispetto al 10% con placebo. Il limite principale è la tollerabilità, dominata dal prurito e dalla fatigue[22]. Inoltre, l'esperienza post-registrativa ha imposto cautela nei pazienti con malattia avanzata: è stata segnalata associazione tra uso di OCA in cirrosi scompensata e peggioramento clinico, con restrizioni/controindicazione in tale contesto e un percorso regolatorio Europeo sfavorevole con conseguente ritiro della molecola dalla commercializzazione a partire dalla prima metà del 2025.

Parallelamente, l'asse dei recettori PPAR si è consolidato come target di seconda linea, integrando modulazione della colestasi ed effetti metabolico-infiammatori. Seladelpar è un agonista selettivo di PPAR- δ , isoforma ampiamente espressa in epatociti e colangiociti e in cellule coinvolte nella patogenesi della PBC. La sua attivazione induce FGF21 epatico, attiva la via JNK e inibisce CYP7A1, riducendo la sintesi di acidi biliari con un meccanismo descritto come indipendente dall'asse FXR[26]. Nel trial di fase 3 RESPONSE, il 61.7% dei pazienti trattati ha raggiunto la risposta biochimica composita rispetto al 20% con placebo; inoltre, il 25% ha ottenuto normalizzazione dell'ALP (0% nel placebo). Un aspetto clinicamente rilevante è l'effetto sul prurito, con riduzioni significative soprattutto nei soggetti con sintomi moderato-severo al basale; sul piano della sicurezza, gli eventi avversi seri sono risultati sovrapponibili al placebo, mentre dolore addominale, cefalea e nausea

sono stati riportati più frequentemente nel gruppo attivo (i pazienti con PBC avanzata/scompenso erano esclusi)[23].

Elafibranor è un agonista duale PPAR- α /PPAR- δ . Nel trial ELATIVE ha mostrato una riduzione rapida e sostenuta dell'ALP, con risposta biochimica nel 51% dei pazienti contro il 4% nel placebo e normalizzazione completa dell'ALP nel 15% (0% nel placebo). L'effetto sul prurito appare più sfumato: pur emergendo segnali in alcune misure, non sono emerse differenze significative rispetto al placebo. In termini di sintomi sistemici, nei pazienti con fatigue moderata-severa al basale è stato osservato un miglioramento clinicamente significativo più frequente rispetto al placebo; sul versante sicurezza, la molecola è stata globalmente ben tollerata, ma sono state riportate interruzioni per incremento della creatinfosfochinasi, rendendo opportuno un monitoraggio muscolare[24,27].

L'assenza di confronti testa a testa rende utili le sintesi comparative. In una network meta-analysis che include i tre RCT di fase 3 (POISE, RESPONSE, ELATIVE), è stato osservato che tutte le terapie attive aumentano la probabilità di risposta biochimica rispetto al placebo; nel confronto indiretto, elafibranor risultava lievemente più efficace di seladelpar nel raggiungimento dell'endpoint composito (RR 4,37; IC95% 1,01–18,87). Sul profilo rischio/beneficio, OCA è risultato associato a un incremento del rischio di nuovo prurito (RR 1,43–1,79, a seconda del dosaggio) e a un aumento degli eventi avversi seri (RR 2,67–3,82), mentre seladelpar si è dimostrata essere l'unica terapia associata a riduzione del rischio di nuovo prurito (RR 0,30); elafibranor ha invece presentato un andamento complessivamente neutro su questo specifico endpoint[28].

Insieme a queste opzioni terapeutiche, i fibrati rappresentano un approccio ampiamente utilizzato come add-on all'UDCA, pur rimanendo spesso off-label: agiscono come agonisti PPAR e influenzano metabolismo e trasporto degli acidi biliari, con potenziale

beneficio anche sul prurito. Bezafibrato (pan-PPAR con attività anche su PXR) riduce la concentrazione epatica di acidi biliari tramite down-regulation di componenti della sintesi/trasporto e up-regulation di trasportatori di efflusso basolaterale; inoltre, via PXR può favorire l'eliminazione canalicolare di composti potenzialmente tossici ed esercitare effetti anti-infiammatori[26]. In un trial randomizzato della durata di 24 mesi, il 31% dei pazienti in bezafibrato ha raggiunto una risposta biochimica completa rispetto allo 0% nel placebo, con riduzione della stiffness epatica e miglioramento dell'Enhanced Liver Fibrosis; l'impatto su istologia e complicanze di ipertensione portale è rimasto meno definito nei sottogruppi valutabili[29].

Il rovescio della medaglia è rappresentato da sicurezza e selezione dei pazienti: aumenti della creatinina, rischio muscolare (fino a rabdomiolisi, seppur raro) ed epatotossicità impongono monitoraggio, e l'impiego è sconsigliato/controindicato nella cirrosi scompensata[30].

Nel complesso, la scelta della seconda linea nella PBC dovrebbe essere guidata da intensità della colestasi residua, burden sintomatologico (in particolare prurito e fatigue), stadio di malattia e comorbidità (soprattutto funzione renale e rischio miopatico), bilanciando l'efficacia biochimica con la tollerabilità e le specifiche limitazioni d'uso.

2. Dislipidemia nella colangite biliare primitiva

La PBC è classicamente associata a una forma peculiare di iperlipidemia colestatica, caratterizzata da colesterolo totale (TC) elevato, LDL-colesterolo elevato, HDL-colesterolo alto o ai limiti alti, e trigliceridi (TG) normali o solo lievemente aumentati. In particolare, diversi studi riportano che l'ipercolesterolemia in PBC può raggiungere livelli notevoli (TC > 300 mg/dL in una parte dei pazienti) ma senza ipertrigliceridemia[3,31,32]. In uno studio di coorte si è osservato che all'esordio il 76% dei pazienti PBC presentava TC > 5.2 mmol/L (~200 mg/dL); inoltre, i pazienti con iperbilirubinemia (indicativa di malattia più avanzata) presentavano TC ancora più alto ma HDL-C più basso rispetto a quelli in stadi iniziali[33]. Questo indica che con l'aggravarsi della colestasi, il TC aumenta ulteriormente (fino a fasi pre-cirrotiche), mentre il HDL-C può diminuire in stadi molto avanzati (per compromissione epatica). Questo infatti, può essere considerato come un andamento biphasic, dove TC e LDL-C tendono a crescere al peggiorare della colestasi moderata-severa (stadi II-III), raggiungendo picchi elevati in presenza di ittero colestatico, per poi calare nelle fasi terminali (stadio IV cirrotico) quando la capacità di sintesi epatica crolla, mentre i livelli di TG di solito rimangono normali o poco elevati nella PBC non avanzata, poiché la colestasi non stimola la overproduzione di VLDL come fanno altre condizioni, anzi, in fase avanzata questi possono ridursi per il malassorbimento di grassi[32].

Un aspetto rilevante è che il livello di LDL-C misurato nei pazienti con PBC può risultare fuorviante: il valore include infatti anche una quota di lipoproteine anomale correlate alla colestasi, che nei saggi di laboratorio convenzionali vengono "misclassificate" e quindi riportate come LDL-C. In pratica, il calcolo del LDL-C tramite la formula di Friedewald o i saggi omogenei per LDL possono sovrastimare la vera concentrazione di LDL aterogeniche in PBC, perché misurano come LDL anche particelle atipiche come la lipoproteina X (Lp-X). Pertanto, questa atipicità del profilo lipidico suggerisce fin da subito

che la qualità e l'origine delle lipoproteine in gioco sia diversa dalle classiche dislipidemie familiari o metaboliche[34].

Come già accennato, l'elemento chiave che differenzia l'iperlipidemia colestatica della PBC dalle forme primarie e secondarie, è la presenza di lipoproteine anomale generate dal contesto colestatico. La principale di queste è la già citata Lp-X, che è una particella lipoproteica anomala, riscontrata tipicamente in condizioni di colestasi intra- o extraepatica e in alcuni deficit enzimatici come la carenza di lecitin-colesterolo acil-transferasi (LCAT)[35]. Chimicamente, Lp-X è una vescicola ricca di fosfolipidi (circa il 50% del contenuto) e colesterolo libero (circa 45%), con pochissimi esteri di colesterolo. È praticamente priva di apoB-100, e infatti deriva non dalla via metabolica normale delle VLDL/LDL, ma da lipidi biliari che refluiscono nel sangue. Infatti, in condizioni di colestasi severa, la bile epatica, non potendo defluire regolarmente, si accumula e alcune componenti (colesterolo, fosfolipidi) possono entrare in circolo formando Lp-X, inizialmente come aggregati micellari derivati dalla bile stagnante. Nel plasma, queste particelle vanno incontro a maturazione incorporando piccole quantità di trigliceridi, colesterolo esterificato e apolipoproteine della famiglia C ed E, acquisendo così le caratteristiche tipiche della Lp-X[36]. La presenza o meno di Lp-X e la sua concentrazione dipendono dal grado di colestasi, dalla funzione epatica residua e dall'attività dell'enzima LCAT nel plasma. Quest'ultimo è deputato all'esterificazione del colesterolo sulle HDL e in una colestasi marcata, LCAT può saturarsi o essere inibito, favorendo l'accumulo di colesterolo libero in Lp-X e lipoproteine. L'assenza di apoB-100 significa che Lp-X non viene riconosciuta dal recettore LDL epatico, dunque, non segue la clearance normale delle LDL e tende ad accumularsi fino a che persiste la colestasi. Questo spiega perché i livelli di colesterolo possano salire notevolmente nei pazienti con PBC, poiché Lp-X intrappola colesterolo nel plasma senza un efficace meccanismo di smaltimento[31]. Oltre alla Lp-X, la colestasi si associa ad ulteriori alterazioni qualitative delle lipoproteine. Ad esempio, le LDL convenzionali tendono ad

arricchirsi di colesterolo libero e fosfolipidi (in parte trasferiti dalla Lp-X), con una riduzione relativa degli esteri del colesterolo e una morfologia più discoidale. Anche le HDL nei pazienti con PBC mostrano una composizione atipica, caratterizzata da incremento di fosfolipidi monoinsaturi e colesterolo libero, accompagnato da una riduzione del colesterolo esterificato[37].

La formazione di Lp-X è considerata una risposta adattativa dell'organismo: incapsulare colesterolo e fosfolipidi in eccesso in particelle circolanti potrebbe essere un meccanismo per proteggere le cellule dall'effetto detergente degli acidi biliari accumulati. In effetti, la Lp-X lega acidi biliari sulla sua superficie e si ritiene che inattivi l'effetto citotossico detergente che tali acidi avrebbero sulle membrane cellulari. Contestualmente, l'ipercolesterolemia concomitante in PBC – che a prima vista pare anomala – potrebbe anch'essa rappresentare un tentativo compensatorio di neutralizzare gli acidi biliari nel sangue[31,35].

Un'altra lipoproteina atipica descritta in colestasi è la cosiddetta lipoproteina di tipo “Y” (Lp-Y), meno nota, che sarebbe una HDL anomala ricca di IgA talvolta riscontrata nelle cirrosi biliari secondarie, ma la sua rilevanza è minore rispetto a Lp-X[38,39].

2.1 Alterazioni qualitative delle lipoproteine nella PBC

Il marcato rimodellamento delle lipoproteine in corso di PBC comporta importanti implicazioni biologiche. In primo luogo, le HDL risultano modificate: di solito le HDL sane sono particelle sferiche piccole (8–10 nm) ricche di colesterolo esterificato; nelle PBC moderate le HDL possono diventare più ricche di colesterolo libero, assumendo una forma più discoidale (simile alle pre- β HDL nascenti) e potenzialmente aumentando di dimensione perché si arricchiscono di fosfolipidi in eccesso[40].

Inoltre, un aspetto cruciale da considerare è rappresentato dal diverso carico di colesterolo di queste particelle. La Lp-X trasporta infatti soprattutto colesterolo non

esterificato, caratteristica che la rende particolarmente incline a depositarlo nei tessuti quando vi entra in contatto. Dal punto di vista clinico, la Lp-X è implicata nella comparsa di xantomi cutanei e tendinei osservati in alcune PBC, perché la particella, ricca di colesterolo libero, può essere captata dai macrofagi tissutali (ad esempio nella cute o nei tendini), favorendo la formazione di cellule schiumose e la deposizione xantomatosa[31,41]. Studi sperimentali hanno confermato che, in vitro, la Lp-X promuove la formazione di cellule schiumose nei macrofagi umani, suggerendo un potenziale effetto aterogeno a livello locale, ad esempio nei tessuti cutanei o nella parete vascolare[41–43]. Al tempo stesso, la Lp-X potrebbe esercitare anche un'azione protettiva rispetto alle LDL convenzionali, come evidenziato da Chang et al., osservando che la sua presenza inibisce l'ossidazione delle LDL, verosimilmente attraverso un effetto scavenger sui radicali o tramite chelazione dei metalli, con conseguente possibile riduzione dell'aterogenicità delle LDL[44]. Questa apparente ambivalenza rimane oggetto di dibattito e alimenta la nota controversia sull'aterogenicità della Lp-X in letteratura.

In parallelo, le alterazioni composizionali delle HDL nella PBC potrebbero tradursi in una compromissione del trasporto inverso del colesterolo: HDL arricchite in colesterolo libero possono ridurre la capacità di accettarne ulteriormente dai tessuti, mentre una minore esterificazione, legata a una carenza relativa di LCAT, può ostacolare il flusso di colesterolo dalla periferia al fegato[31].

Sul versante delle apolipoproteine, la PBC non sembra determinare un incremento dell'apoB proporzionale all'aumento del colesterolo totale. Spesso, infatti, l'apoB risulta solo lievemente elevata, poiché una quota rilevante del colesterolo circolante è veicolata da particelle prive di apoB o si distribuisce sulle HDL. Al contrario, si osserva un aumento relativo dell'apolipoproteina E (apoE) circolante, verosimilmente perché l'apoE viene reclutata sulle particelle anomale, inclusa la Lp-X, e su HDL arricchite in colesterolo. Questo

assetto può favorire l'interazione di tali lipoproteine con i recettori per i remnants delle lipoproteine e con recettori scavenger espressi in diversi tessuti[45].

Anche le apolipoproteine A (apoA-I e apoA-II), principali componenti delle HDL, possono presentare un profilo funzionale alterato. Nelle forme avanzate di PBC, la ridotta attività di LCAT e la conseguente minor esterificazione del colesterolo possono determinare l'accumulo di pre- β HDL (particelle discoidali ricche di fosfolipidi e apoA-I) e la comparsa di aggregati di apoA-I dissociata, come riportato in alcuni studi sulla funzionalità delle HDL. Ne deriva che, nonostante valori elevati di HDL-C, la quota di apoA-I effettivamente funzionale potrebbe risultare meno efficiente nel promuovere l'efflusso di colesterolo dai tessuti[45].

Queste peculiarità legate al rimodellamento lipoproteico nella PBC, potrebbero spiegare le manifestazioni cliniche come gli xantomi e contribuire al cosiddetto paradosso della PBC; infatti, nonostante l'ipercolesterolemia, l'incidenza di aterosclerosi clinica non risulta proporzionalmente aumentata, probabilmente perché la natura delle lipoproteine coinvolte differisce dalle lipoproteine aterogene classiche. Ciò non toglie che le alterazioni qualitative possano avere effetti locali rilevanti.

3. Rischio cardiovascolare nella colangite biliare primitiva

La relazione tra la PBC, caratterizzata da una peculiare ipercolesterolemia, e il rischio cardiovascolare è stata ampiamente indagata, spesso con esiti inattesi. Il nodo interpretativo riguarda se l'eccesso di colesterolo osservato in questi pazienti si associ a un incremento di eventi aterosclerotici. Sebbene, in linea teorica, valori elevati di colesterolo suggeriscano un rischio maggiore, le evidenze epidemiologiche delineano un quadro più sfumato e complesso[32]. I primi studi degli anni '90 osservarono che i pazienti con PBC non mostravano un'aumentata prevalenza di malattia coronarica rispetto alla popolazione generale, nonostante la presenza di ipercolesterolemia[46,47]. In seguito, analisi su casistiche più ampie hanno sostanzialmente confermato che l'incidenza di eventi cardiovascolari in questa popolazione è sovrapponibile o solo lievemente superiore a quella dei soggetti sani. Un importante studio di coorte italiano, che ha incluso circa 400 pazienti con PBC seguiti per un follow-up medio di 6 anni, ha documentato un'incidenza di eventi cardiovascolari sostanzialmente sovrapponibile a quella dei controlli di popolazione. In particolare, il rapporto standardizzato di incidenza è risultato pari a 1.4 (IC 95% 0.5–3.7) per gli eventi cerebrovascolari e a 2.2 (IC 95% 0.9–4.3) per gli eventi coronarici, senza raggiungere la significatività statistica in entrambi i casi[33]. Un altro studio condotto nel Regno Unito ha riportato risultati coerenti, mostrando nei pazienti con PBC tassi di eventi cardiovascolari sostanzialmente sovrapponibili a quelli della popolazione generale[48]. In aggiunta, una revisione sistematica del 2007 ha concluso che nel complesso, non emerge un aumento significativo del rischio aterosclerotico nei pazienti con PBC[49]. In alcune casistiche è stata anche descritta una prevalenza di aterosclerosi inferiore alle attese riportando una minore presenza di placche carotidee in pazienti con PBC e ipercolesterolemia rispetto a soggetti ipercolesterolemici senza PBC, suggerendo un possibile ruolo modulante di fattori specifici della malattia. Tuttavia, non tutte le evidenze sono uniformi in quanto talora è emerso un leggero aumento di eventi in sottogruppi

specifici[50,51]. Inoltre, il miglioramento della sopravvivenza epatica associato a terapia con UDCA ha determinato un incremento dell'aspettativa di vita dei pazienti con PBC, con conseguente maggiore probabilità di sviluppare patologie cardiovascolari età-correlate[3]. Di conseguenza, alcuni studi più recenti hanno riportato incidenze di eventi cardiovascolari sostanzialmente sovrapponibili a quelle della popolazione generale appaiata per età e sesso[33].

Nel complesso, il consenso attuale indica che la PBC non si associa a un incremento cardiovascolare marcato e proporzionale ai livelli di colesterolo osservati. Persistono tuttavia alcune aree di incertezza, in quanto pur in assenza di un chiaro aumento degli eventi clinici, diversi studi hanno riportato indicatori di aterosclerosi subclinica sostanzialmente coerenti con l'età dei pazienti con PBC; pertanto, ciò suggerisce che la progressione aterosclerotica subclinica segua principalmente l'invecchiamento e i fattori di rischio tradizionali, senza un'accelerazione evidente imputabile all'ipercolesterolemia colestatica. Va sottolineato che, il rischio competitivo di morte legata allo sviluppo di cirrosi e alla progressione di malattia epatica era in grado di mascherare l'effettivo rischio cardiovascolare nelle corti più datate di pazienti con PBC. Alla luce di queste considerazioni, non si è assistito ad un incremento possibilmente atteso degli eventi cardiovascolari nei pazienti con PBC, sostenendo l'ipotesi che esistono fattori potenzialmente protettivi dal punto di vista cardiovascolare in questo gruppo di pazienti[48,50]. Infatti, il paradosso sopra descritto mette in evidenza i limiti dei consueti marcatori lipidici quando applicati a situazioni peculiari come la colestasi cronica. Ciò implica che l'utilizzo degli endpoint tradizionali potrebbe non essere appropriato né significativo in questi pazienti. In pratica, quindi, la stratificazione del rischio cardiovascolare nella PBC usando i parametri tradizionali rischia di condurre a errori di valutazione[32]. Pertanto, questa riflessione porta a concludere che in questo contesto potrebbero risultare utili misure alternative o aggiuntive per valutare l'effettivo rischio. In letteratura, emergono parametri come la capacità di efflusso del colesterolo (che misura la

funzione anti-aterogena dell'HDL) e la capacità di carico del siero (che misura la tendenza netta del siero a far accumulare colesterolo nei macrofagi) come potenziali surrogati meccanicistici del rischio, che verranno discussi in maniera approfondita nei capitoli successivi, che potrebbero quindi colmare il gap lasciato dai marker classici in PBC.

4. Trasporto inverso del colesterolo: basi biologiche e cellulari

La valutazione della funzionalità delle HDL consente di ottenere informazioni più pertinenti rispetto alla sola quantificazione del valore di HDL-C. Per molti anni livelli elevati di HDL-C sono stati interpretati come protettivi, tuttavia, in letteratura si è osservato come l'aumento farmacologico di HDL-C non abbia portato ad una riduzione coerente degli eventi cardiovascolari. Ne deriva che il rischio cardiovascolare non dipende soltanto dal dosaggio di HDL-C circolante, ma soprattutto dalla qualità delle particelle e dalle funzioni che esse svolgono. In particolare, la capacità di accettare colesterolo dai macrofagi risulta solo parzialmente spiegata dall'HDL-C e dipende da proprietà qualitative delle HDL[52]. Infatti, in coorti di popolazione generale, una maggiore capacità di efflusso si associa a minore aterosclerosi e a minore incidenza di eventi cardiovascolari in modo indipendente dal livello di HDL-C[53,54].

Il trasporto inverso del colesterolo è il percorso fisiologico che convoglia il colesterolo in eccesso dai tessuti periferici, in particolare dai macrofagi della parete arteriosa, al fegato per il suo metabolismo ed eliminazione. In termini funzionali, il trasporto inverso del colesterolo prevede tre passaggi: (1) efflusso del colesterolo libero dai macrofagi verso accettori plasmatici, principalmente tramite l'asse APOA-I–ABCA1 con formazione di HDL nascenti e, in parallelo, tramite ABCG1/ABCG4 (e/o trasferimento spontaneo) verso HDL già presenti; (2) traffico e rimodellamento plasmatico delle HDL con maturazione (HDL nascente → HDL3 → HDL2) e esterificazione del colesterolo mediata da LCAT, che favorisce l'accumulo di esteri del colesterolo nel core delle particelle; (3) captazione epatica soprattutto tramite lo scavenger receptor class B type I (SR-BI), codificato dal gene SCARB1, con trasferimento selettivo dei lipidi dalle HDL e successivo avvio

all'eliminazione lungo la via biliare/intestinale[55]. La **Figura 1** rappresenta schematicamente il percorso del trasporto inverso del colesterolo.

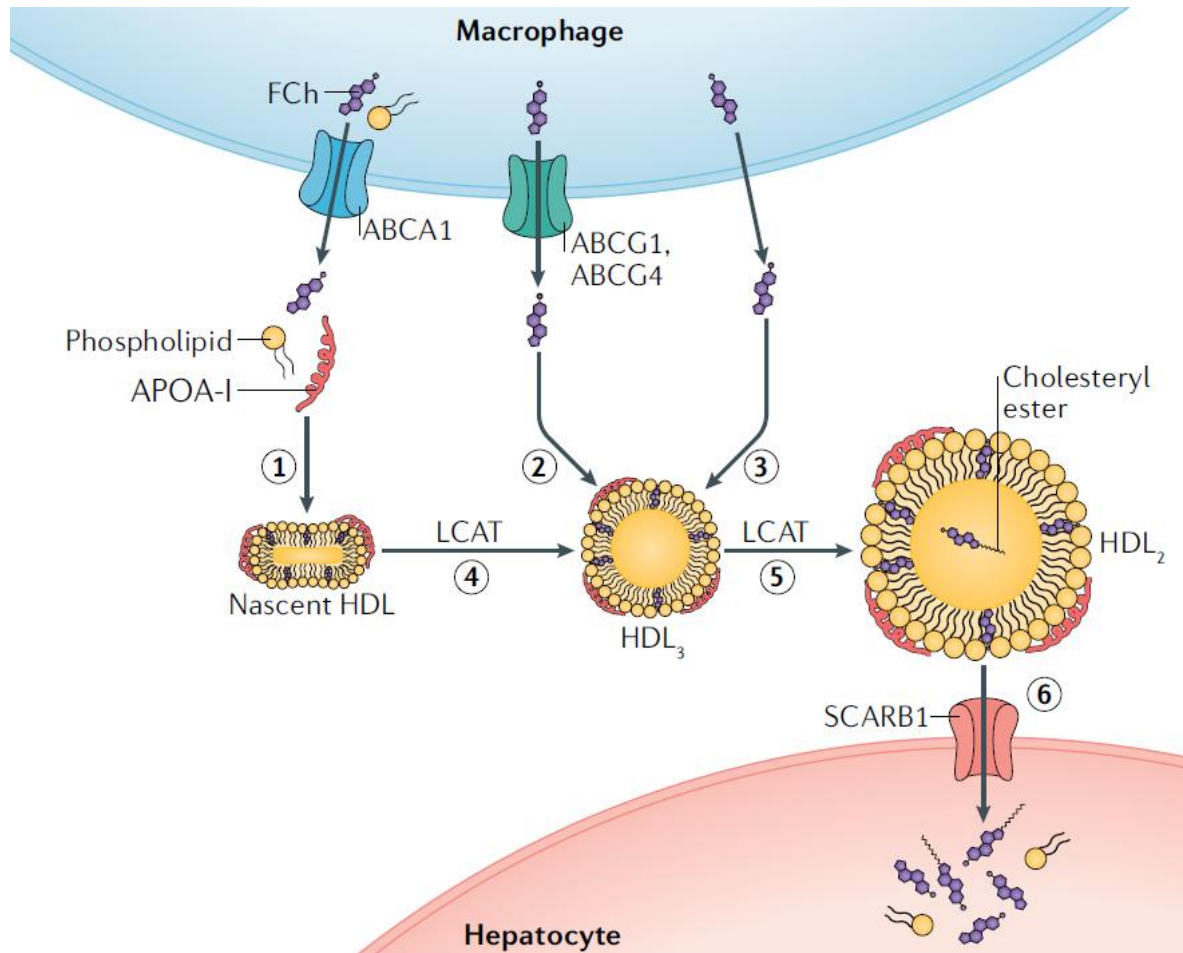


Figura 1. Trasporto inverso del colesterolo: efflusso dai macrofagi alle HDL e successiva captazione epatica (Fonte Pownall HJ. et al. Nat Rev Cardiol. 2021 Oct;18(10):712-723)

Entrando nel dettaglio, l'efflusso di colesterolo dai macrofagi è lo step iniziale e determinante del trasporto inverso di colesterolo e avviene attraverso vie in parte complementari:

1. **ABCA1**: trasportatore di membrana che trasferisce colesterolo e fosfolipidi ad apoA-I libero o a pre- β HDL lipid-poor, avviando la formazione di HDL nascenti. È indotto da LXR in risposta all'accumulo di colesterolo.

2. **ABCG1**: favorisce il trasferimento di colesterolo verso HDL mature e lipid-rich, contribuendo alla maturazione delle particelle già formate. Agisce in modo complementare ad ABCA1, che è invece responsabile dell'avvio del processo su apoA-I lipid-poor.
3. **SR-BI**: recettore bidirezionale espresso anche sui macrofagi, con contributo in genere minore all'efflusso macrofagico rispetto a ABCA1/ABCG1. La sua funzione è invece essenziale a livello epatico per permettere l'uptake selettivo del colesterolo dalle HDL.
4. **Diffusione passiva (PD)**: trasferimento non mediato lungo gradiente di concentrazione verso accettori extracellulari, quantitativamente secondario e fortemente dipendente dalla disponibilità di accettori e dalle proprietà fisico-chimiche della membrana.

Le stime quantitative delle singole vie variano in base a modello cellulare, stimoli e tipo di accettore, ma in generale, ABCA1 e ABCG1 rappresentano le componenti predominanti dell'efflusso macrofagico[55].

Nel contesto della PBC, l'efflusso macrofagico potrebbe essere modulato sia dalle caratteristiche qualitative delle HDL/apoA-I circolanti sia dalla regolazione trascrizionale mediata dagli acidi biliari. In particolare, in condizioni di colestasi le HDL possono risultare arricchite in fosfolipidi di superficie e in apoE, proprietà che potrebbero favorirne l'interazione con i macrofagi e potenziarne la capacità di accettazione e trasporto del colesterolo. Parallelamente, l'attivazione del recettore FXR in corso di colestasi è in grado di ridurre indirettamente l'espressione di ABCA1, penalizzando potenzialmente la componente di efflusso ABCA1-dipendente. Ne consegue che, nella PBC, la capacità complessiva di efflusso potrebbe riflettere un equilibrio complesso e non lineare tra fattori

pro-efflusso e fattori limitanti, che richiede una valutazione mediante misure funzionali dedicate[32].

5. Capacità di efflusso del colesterolo (CEC): misura funzionale del trasporto inverso

La capacità di efflusso del colesterolo (CEC) è una misura funzionale che quantifica in vitro l'abilità del siero/plasma di accettare colesterolo da cellule previamente caricate, in genere macrofagi. Viene espressa come percentuale di colesterolo rilasciato nel mezzo rispetto al contenuto cellulare iniziale e rappresenta un indicatore integrato del trasporto inverso del colesterolo. La CEC dipende da molteplici determinanti, tra cui la disponibilità di apoA-I e di particelle pre- β HDL, la composizione e il rimodellamento delle HDL mature, l'attività di LCAT (che favorisce il mantenimento del gradiente) e i fattori che regolano l'interazione HDL-cellula. Di conseguenza, la CEC fornisce un'informazione funzionale che non è pienamente catturata dal solo profilo lipidico standard[56,57].

Nei protocolli più utilizzati, macrofagi precedentemente caricati con colesterolo marcato vengono incubati con siero/plasma del soggetto, spesso dopo rimozione delle lipoproteine apoB per focalizzare l'efflusso mediato dalle HDL. Dopo una fase di equilibratura in terreno povero di lipoproteine, l'efflusso viene promosso per alcune ore e quantificato misurando la quota di colesterolo rilasciata nel mezzo in rapporto al contenuto cellulare iniziale o al totale (mezzo + cellule), sottraendo l'eventuale efflusso non specifico in assenza di accettore; per ridurre la variabilità tra esperimenti è comune normalizzare i risultati su un campione di riferimento analizzato in parallelo. In queste condizioni, la CEC totale riflette un contributo integrato di più vie (ABCA1, ABCG1, SR-BI e PD) mentre l'impiego di stimoli come cAMP — in grado di aumentare ABCA1 in alcuni modelli cellulari — rende il saggio più sensibile alla componente apoA-I/pre- β HDL e permette, confrontando condizioni stimulate e non stimulate, una stima indiretta della quota ABCA1-dipendente[58–60].

La letteratura conferma il ruolo della CEC come un indicatore particolarmente utile della funzionalità dell'HDL e, di conseguenza, un potenziale fattore protettivo. In diversi studi, infatti, una CEC più elevata si associa a minore aterosclerosi subclinica e a una riduzione del rischio di eventi cardiovascolari, anche indipendentemente dalla concentrazione di HDL-C. In uno studio di riferimento, la CEC misurata su siero depleto di apoB è risultata inversamente correlata sia con lo spessore intima-media carotideo sia con la presenza di coronaropatia, e queste associazioni rimanevano significative anche dopo correzione per il livello di HDL-C e ApoA-I[53]. In questo contesto, Rohatgi et al. nel Dallas Heart Study hanno osservato che un valore di CEC più elevato si associava a un rischio inferiore di eventi cardiovascolari aterosclerotici[54]. Risultati coerenti sono stati osservati nell'ambito della coorte prospettica EPIC-Norfolk, in cui la CEC risultava inversamente associata al rischio di eventi coronarici incidenti, e tale associazione si manteneva significativa anche dopo aggiustamento per HDL-C e ApoA-I, oltre che per i principali potenziali fattori confondenti[61]. In un'ottica complessiva, una revisione sistematica con meta-analisi di 20 studi e 25,132 partecipanti, ha confermato che un valore di CEC più elevato era associato ad una riduzione del 37% del rischio di eventi cardiovascolari avversi (RR 0.63; IC 95% 0.52–0.76). Considerando la CEC come variabile continua, inoltre, ogni incremento di una deviazione standard si associava a circa un 20% di rischio in meno (HR 0.80; IC 95% 0.66–0.97), con un'associazione che rimaneva significativa anche dopo aggiustamento per fattori di rischio, terapie e livelli di HDL-C[62].

Nel complesso, le evidenze disponibili indicano che la CEC si associa in modo consistente a minore aterosclerosi subclinica e a una riduzione degli eventi cardiovascolari, fornendo quindi informazioni più direttamente legate alla qualità funzionale delle HDL rispetto alla sola misura quantitativa del livello di HDL-C.

6. Capacità di carico del colesterolo (CLC): misura funzionale dell'accumulo di colesterolo nei macrofagi

Accanto alla capacità di efflusso mediata dall'HDL, un altro meccanismo coinvolto nel bilancio del colesterolo nel macrofago è la tendenza del siero a caricare i macrofagi di colesterolo, promuovendo la formazione di foam cells. Questo aspetto può essere studiato mediante la quantificazione del Cholesterol Loading Capacity (CLC) del siero, che descrive l'abilità delle lipoproteine e componenti sieriche di fornire colesterolo ai macrofagi e favorirne l'accumulo intracellulare, rappresentando un indice globale dell'aterogenicità pro-infiammatoria esercitata dalle lipoproteine circolanti[63]. Tale misura è complementare alla CEC, ovvero se quest'ultima riflette la capacità del siero di sottrarre steroli alle cellule, la CLC riflette la tendenza opposta, cioè a incrementare la massa di colesterolo cellulare. In questo contesto quindi, la misurazione della CLC fornisce un'informazione funzionale aggiuntiva sul processo di formazione di foam cells[64].

La CLC dipende in larga misura dalla concentrazione e, soprattutto, dalla qualità aterogena delle lipoproteine contenenti, inclusa la presenza di forme modificate/ossidate che possono essere internalizzate dai macrofagi tramite vie meno regolabili rispetto al classico asse LDL-recettore LDL. In condizioni di infiammazione sistemica e/o stress ossidativo, alterazioni strutturali delle LDL possono favorire il carico di colesterolo nei macrofagi attraverso percorsi non regolati, aumentando così la propensione alla formazione di foam cells anche in presenza di livelli di LDL-C non particolarmente elevati[65,66].

Dal punto di vista metodologico, la CLC viene quantificata mediante saggi in vitro che misurano l'accumulo di colesterolo in macrofagi esposti al siero del soggetto. Un protocollo ampiamente utilizzato impiega macrofagi derivati dalla linea monocitica umana THP-1, differenziati con PMA; i macrofagi vengono incubati con siero individuale per un periodo standard, quindi lavati e lisati. Il contenuto di colesterolo nei lisati cellulari viene misurato con metodiche enzimatiche/fluorimetriche e normalizzato rispetto alla quantità di

proteine cellulari, riportando il risultato come μg di colesterolo per mg di proteine. In questo assetto, la CLC rappresenta un indicatore integrato della capacità del siero di determinare accumulo netto di colesterolo nei macrofagi, risultante dall'equilibrio tra ingresso ed eventuale controbilanciamento da parte delle HDL presenti nel siero[64,67,68].

Le evidenze cliniche disponibili supportano la rilevanza della CLC come marker funzionale associato a fenotipi aterosclerotici sfavorevoli e ad aumentato rischio cardiovascolare. In un recente studio di Karpouzas et al., che hanno incluso 141 pazienti con artrite reumatoide, elevati livelli di CLC erano associati ad un aumento del rischio di eventi cardiovascolari nel lungo periodo e, nei soggetti non trattati con farmaci antireumatici biologici, alla presenza di placche coronariche a bassa attenuazione e a un maggiore carico di placca coronarica ostruttiva[63].

Inoltre, numerosi studi hanno suggerito che la CLC possa essere modulata da interventi farmacologici, con possibili implicazioni in termini di beneficio cardiovascolare[69–71]. In questo contesto, Palumbo et al. hanno recentemente osservato che, nei soggetti con ipercolesterolemia familiare, la terapia con inibitori di PCSK9 si associa a una riduzione significativa della CLC, mostrando tuttavia solo una debole correlazione con i livelli di LDL-C; ciò suggerisce un effetto del trattamento sulla CLC non interamente spiegabile dalla sola riduzione quantitativa delle LDL[72]. Coerentemente, evidenze precedenti indicano che l'accumulo di colesterolo nei macrofagi non dipende necessariamente dai livelli circolanti di LDL-C, ma può riflettere anche la qualità e/o la funzionalità delle lipoproteine[71]. Pertanto, è plausibile che gli inibitori di PCSK9 influenzino le lipoproteine ricche di apoB non solo in termini quantitativi, ma anche qualitativi, contribuendo a un profilo lipoproteico meno aterogeno.

Anche interventi nutraceutici in coorti di pazienti con dislipidemia hanno mostrato di ridurre la CLC in parallelo ad un miglioramento della funzionalità delle lipoproteine. In particolare, nello studio di Adorni et al., una combinazione contenente riso rosso fermentato (monacolina K 3.3 mg), berberina (531.25 mg) e Morus alba (200 mg) ha determinato un incremento significativo della CEC del 16.1% e una riduzione della CLC da 32.15 ± 7.28 a 28.47 ± 6.32 $\mu\text{g}/\text{mg}$ di proteine (-11.4%)[73]. In modo analogo, Formisano et al. hanno riportato che 8 settimane di trattamento con una combinazione nutraceutica contenente monacolina K (10%), berberina (500 mg) e silimarina hanno indotto una riduzione della CLC da 34.2 ± 11.6 a 26.0 ± 10.9 $\mu\text{g}/\text{mg}$ di proteine (-24%)[74].

Nel complesso, la CLC rappresenta una misura funzionale utile a descrivere l'apporto di colesterolo ai macrofagi e l'accumulo intracellulare, riflettendo il potenziale pro-aterogeno del siero in relazione alla formazione di foam cells. Valutata congiuntamente alla CEC, può offrire una caratterizzazione più completa della funzionalità delle lipoproteine rispetto alle sole concentrazioni di LDL-C e HDL-C. Tuttavia, prima di un impiego clinico routinario, risultano necessari ulteriori studi per la standardizzazione dei metodi, la definizione di intervalli di riferimento e la validazione del suo valore predittivo in popolazioni più ampie.

LAVORO SPERIMENTALE

7. Scopo dello studio

L'obiettivo del presente studio è confrontare la funzionalità delle lipoproteine e il potenziale pro-aterogeno del siero in pazienti con PBC rispetto a soggetti con ipercolesterolemia poligenica (PH). In particolare, lo studio valuta e confronta tra i due gruppi la CLC sierica e la CEC complessiva, analizzando le principali componenti via-specifiche dell'efflusso (ABCA1-mediata, PD, ABCG1-mediata e SR-BI-mediata).

8. Materiali e metodi

8.1 Disegno dello studio e criteri di eleggibilità

È stata condotta un'analisi osservazionale prospettica, monocentrica in pazienti affetti da PBC afferenti presso la Clinica Gastroenterologica IRCCS Ospedale Policlinico San Martino, Università degli Studi di Genova, tra gennaio 2024 e agosto 2024, rispetto a un gruppo di pazienti affetti da PH, seguiti l'Ambulatorio Prevenzione Vasculopatie, IRCCS Ospedale Policlinico San Martino, Genova.

Per ridurre il rischio di bias di selezione e confondimento legato alla differente provenienza clinica, la strategia di identificazione del gruppo comparatore rappresentato dai pazienti affetti da PH è stata impostata in due fasi: (i) una fase retrospettiva di screening basata su dati basali disponibili nel database ambulatoriale, utilizzata per costruire un propensity score e selezionare un campione di soggetti con PH comparabili; (ii) una fase prospettica di contatto e inclusione, in cui i pazienti affetti da PH selezionati sono stati invitati, contattati e successivamente arruolati per eseguire, secondo lo stesso protocollo della coorte PBC, il prelievo ematico e le valutazioni laboratoristiche e funzionali. In questo modo, il propensity score non è stato utilizzato per aggiustare ex post l'analisi su una coorte già campionata, ma come strumento operativo di selezione a priori dei comparatori PH sulla base delle caratteristiche basali, prima dell'esecuzione prospettica delle analisi di laboratorio

e delle misure funzionali. Per ridurre il rischio di bias di misurazione, tutte le analisi funzionali (CEC e CLC) sono state eseguite in cieco rispetto al gruppo clinico di appartenenza (PBC vs PH). I campioni sono stati codificati con identificativi anonimi e l'assegnazione al gruppo è stata sbloccata solo dopo il completamento delle letture e della normalizzazione dei saggi.

Per ciascun partecipante sono stati registrati dati demografici e antropometrici, anamnesi personale e familiare (con particolare attenzione alla storia cardiometabolica), terapie in atto e principali comorbidità. Il prelievo ematico è stato effettuato in condizioni standardizzate, con determinazione del profilo lipidico e dei parametri biochimici di routine. I campioni sierici sono stati processati e conservati secondo procedure interne di laboratorio, per consentire l'esecuzione delle valutazioni funzionali.

Sono stati inclusi pazienti di età adulta afferenti agli ambulatori coinvolti precedentemente menzionati, con campione sierico idoneo per le valutazioni funzionali e con dati clinico-laboratoristici completi. Tutti i pazienti con PBC erano in trattamento con UDCA, mentre i soggetti con PH era trattati al momento dello studio con sola terapia dietetica e non assumevano nessun farmaco ipocolesterolemizzante.

Nel gruppo PBC, l'inclusione prevedeva una diagnosi confermata in ambito specialistico e un follow-up clinico regolare presso l'ambulatorio epatologico. Nel gruppo PH, l'inclusione richiedeva una diagnosi specialistica di ipercolesterolemia poligenica in carico all'ambulatorio prevenzione vasculopatie; inoltre, i soggetti PH dovevano risultare selezionabili sulla base delle caratteristiche basali registrate (fase di screening) e disponibili a essere contattati e arruolati prospetticamente per sottoporsi alle medesime procedure di studio.

Sono stati invece esclusi pazienti con dislipidemie secondarie non coerenti con l'obiettivo comparativo, condizioni acute o instabilità clinica al momento del prelievo, patologie o trattamenti in grado di alterare in modo sostanziale il metabolismo lipidico o la

funzionalità delle lipoproteine al di fuori del quadro di interesse, pazienti in trattamento con farmaci ipolipemizzanti. Sono stati inoltre esclusi i casi con dati mancanti non recuperabili per le variabili chiave utilizzate nello screening basale e nella selezione, o con campioni non idonei alle misure funzionali. Nel gruppo PBC, sono stati esclusi pazienti con eventuali epatopatie concomitanti clinicamente rilevanti o quadri colestatici di differente eziologia. Nel gruppo PH, sono stati esclusi coloro che, pur selezionati in fase di screening, non risultavano contattabili, non acconsentivano alla partecipazione o non completavano la visita prospettica di studio.

8.2. Metodi

8.2.1. Valutazione della CEC Totale, della CEC mediata dalla diffusione passiva, e da ABCA1

L'efflusso totale, l'efflusso mediato dalla PD e quello mediato dal trasportatore ABCA1 sono stati valutati utilizzando la linea cellulare J774 mediante un metodo radioisotopico standardizzato[53,54,60,75]. Le cellule sono state seminate in piastre da 24 pozzetti (Corning) alla densità di 250.000 cellule/pozzetto. Ventiquattro ore dopo la semina, i monostrati cellulari sono stati radiomarcati con [1,2-³H]-colesterolo (2 µCi/mL; Perkin Elmer) in DMEM addizionato con 1% di FCS. Dopo ulteriori 24 ore dalla radiomarcatura, le cellule sono state trattate con DMEM contenente 0,2% di albumina sierica bovina (BSA; Sigma-Aldrich), in presenza di 0,3 mM cpt-cAMP (Sigma-Aldrich), in grado di indurre l'espressione del trasportatore ABCA1, e sono state utilizzate per la valutazione dell'efflusso totale (contributo combinato di PD e ABCA1) oppure, in assenza di cpt-cAMP, per la valutazione del solo contributo della PD. Durante le fasi di marcatura ed equilibramento, è stato aggiunto un inibitore di ACAT alla concentrazione di 2 µg/mL (Sandoz 58035; Sigma-Aldrich). Dopo 18 ore, è stata effettuata la fase di promozione dell'efflusso incubando le cellule con sieri dei pazienti al 2% (v/v) per 4 ore. La radioattività (cpm) nel mezzo di coltura è stata misurata utilizzando il liquido di scintillazione Opti-fluor (Perkin-Elmer). L'efflusso

di colesterolo cellulare è stato calcolato utilizzando un set di cellule fermate al tempo 0 (T0), prima dell'aggiunta dei sieri in esame. La percentuale di efflusso è stata calcolata mediante la seguente formula, esprimendo il colesterolo rilasciato nel mezzo come percentuale del colesterolo totale intracellulare:

$$\% \text{ efflux} = (\text{cmp medium} / \text{cpm T0}) \times 100$$

Per l'analisi del contenuto cellulare di [3H]-colesterolo nei monostrati, i lipidi sono stati estratti mediante aggiunta di 0,6 mL di 2-propanolo (VWR). In tutti gli esperimenti, un pool di sieri umani normolipidemicici è stato utilizzato come standard interno. I valori di efflusso dello standard sono stati impiegati per la normalizzazione degli esperimenti condotti in tempi differenti, al fine di ridurre la variabilità inter-assay[76]. Il contributo di ABCA1 all'efflusso è stato calcolato come differenza tra la percentuale di efflusso ottenuta nelle cellule J774 trattate con cpt-cAMP e quella osservata nelle cellule non stimulate.

8.2.2. *Valutazione della CEC mediata da ABCG1*

Per la valutazione dell'efflusso di colesterolo ABCG1-mediato sono state utilizzate cellule CHO-L3, derivate da CHO-K1 in seguito a trasfezione con un plasmide contenente il trasportatore umano ABCG1 (*habcg1*). Le cellule sono state seminate in piastre da 24 pozzetti alla densità di 25.000 cellule/pozzetto. Dopo 24 ore dalla semina, le cellule sono state trattate con [1,2-³H]-colesterolo alla concentrazione di 1 µCi/mL in mezzo contenente 5% di FCS. Trascorse 24 ore dalla marcatura, la fase di equilibramento è stata effettuata in terreno contenente 0,2% BSA per 90 minuti; successivamente le cellule sono state incubate con terreno contenente 1% (v/v) di siero del paziente per 6 ore. L'efflusso di colesterolo è stato calcolato come rapporto tra la radioattività rilasciata nel mezzo di coltura dopo esposizione ai sieri e la radioattività misurata nelle cellule al tempo 0 (T0). Anche in questo caso è stato utilizzato un pool di sieri umani normolipidemicici come standard interno per la normalizzazione degli esperimenti. La percentuale di efflusso ABCG1-mediato è stata

calcolata sottraendo il valore di efflusso delle cellule non esprimenti ABCG1 da quello delle cellule esprimenti ABCG1.

8.2.3. Valutazione della CEC mediata da SR-BI

Le cellule e cellule Fu5AH sono state seminate in piastre da 48 pozzetti alla densità di 100.000 cellule/pozzetto e mantenute per 24 ore in mezzo contenente 10% di FBS. Successivamente, le cellule sono state marcate con [1,2-³H]-colesterolo alla concentrazione di 2 µCi/mL (Perkin Elmer) in presenza di 1% di FBS e di un inibitore di ACAT (2 µg/mL). La fase di equilibramento è stata quindi effettuata in terreno contenente 0,2% di BSA in presenza dell'inibitore di ACAT. Due ore prima della fase di efflusso, è stato effettuato un pretrattamento di 2 ore con un inibitore di SR-BI (Block Lipid Transfer-1, 10 µM; ChemBridge) per valutare la PD, oppure in sua assenza per valutare l'efflusso mediato da SR-BI (in combinazione con la PD). La fase di efflusso è stata poi condotta per 4 ore in presenza del 2% (v/v) dei sieri dei soggetti in esame. L'efflusso di colesterolo è stato misurato come rapporto tra la radioattività rilasciata nel mezzo di coltura e la radioattività misurata nelle cellule al T0. Per la normalizzazione degli esperimenti è stato utilizzato un pool di sieri umani normolipidemicici come standard interno. La percentuale di efflusso SR-BI-mediato è stata calcolata sottraendo il valore ottenuto nelle cellule trattate con l'inibitore di SR-BI dal valore osservato nelle cellule non trattate.

8.2.4. Valutazione della CLC mediata dal siero

Per la valutazione della CLC sono state utilizzate cellule THP-1, che sono state seminate in piastre da 24 pozzetti alla densità di 500.000 cellule/pozzetto in mezzo contenente 10% di FBS e PMA alla concentrazione di 100 ng/mL. Dopo 72 ore dalla semina, durante le quali è avvenuta la differenziazione dei monociti in macrofagi, le cellule sono state incubate per 8 ore con il 5% (v/v) di siero dei pazienti, utilizzato come donatore di colesterolo. Al termine dell'incubazione, dopo lavaggio con PBS, i macrofagi sono stati lisati

in una soluzione contenente acido colico all'1% e DNasi (50 U/mL), mantenuta in agitazione overnight. La CLC è stata espressa come μg di colesterolo per mg di proteine. Il contenuto di colesterolo nei lisati cellulari è stato quantificato mediante kit fluorimetrico (Amplex Red Cholesterol Assay Kit; Molecular Probes by Life Technologies), mentre il contenuto proteico è stato determinato con il metodo dell'acido bicinconinico.

8.3. Selezione dei comparatori e propensity score matching

Il propensity score matching è stato impiegato come strumento di selezione dei pazienti con PH sulla base dei soli dati basali disponibili prima dell'arruolamento prospettico, al fine di rendere i due gruppi il più comparabili possibile. In particolare, è stato stimato un propensity score, definito come la probabilità individuale di appartenere al gruppo PBC condizionata a covariate basali, mediante un modello di regressione logistica che includeva età, sesso, indice di massa corporea, comorbidità, familiarità per eventi cardiovascolari, tabagismo e parametri lipidici di base. Nel matching non sono stati presi in considerazione il profilo citocolestatico ed i valori di γ -globuline in quanto rappresentano variabili strettamente legate alla patologia di esposizione (colestasi e attivazione immunitaria tipiche della PBC) e, di conseguenza, non costituiscono covariate "neutre" comparabili nel gruppo PH. Sulla base del propensity score è stata identificata una sottopopolazione di soggetti PH con profilo basale comparabile alla coorte PBC, mediante abbinamento secondo algoritmo nearest-neighbor entro un vincolo di distanza predefinito. Il bilanciamento delle covariate incluse è stato valutato con differenze medie standardizzate e con l'ispezione della sovrapposizione delle distribuzioni del propensity score. I soggetti con PH così selezionati sono stati quindi contattati e, in caso di adesione, inclusi prospetticamente per eseguire le analisi di laboratorio e le valutazioni funzionali previste dal protocollo, in parallelo e con procedure sovrapponibili a quelle applicate alla coorte PBC. Questa impostazione ha

consentito di limitare la variabilità legata alle differenze di setting assistenziale, preservando al contempo la natura prospettica delle misure funzionali nel gruppo comparatore.

8.4 Analisi statistica

Le variabili continue sono state descritte con misure di tendenza centrale e dispersione appropriate alla distribuzione; la normalità è stata esplorata con metodi grafici e test dedicati. I confronti tra gruppi per variabili continue sono stati effettuati con test parametrici o non parametrici in base alle assunzioni soddisfatte; le variabili categoriali sono state confrontate con test per proporzioni appropriati alla numerosità e alla struttura dei dati.

L'analisi principale è stata condotta nel campione finale includendo i soggetti con PH selezionati tramite propensity score e successivamente arruolati prospetticamente. Per stimare l'associazione tra stato PBC e CLC, è stato applicato un modello lineare generale con CLC come variabile dipendente e gruppo clinico come principale predittore, includendo covariate prespecificate clinicamente rilevanti per l'aggiustamento (in particolare indici antropometrici e parametri lipidici basali). È stata inoltre valutata l'associazione indipendente di anamnesi familiare cardiometabolica con la CLC all'interno dello stesso framework multivariato. Le stime sono state riportate come differenze aggiustate con intervalli di confidenza, e sono state calcolate medie marginali stimate per facilitare l'interpretazione.

Le assunzioni del modello (linearità, omoscedasticità, normalità dei residui e influenza di osservazioni anomale) sono state verificate mediante diagnostica standard. Eventuali interazioni tra gruppo clinico e covariate prespecificate sono state esplorate in modo mirato, evitando l'inclusione di termini non supportati da razionale biologico. Tutte le analisi sono state condotte con test a due code e livello di significatività convenzionale, utilizzando software quali IBM SPSS Statistics, Release Version 25.0 (SPSS, Inc., 2017, Chicago, IL,

USA, www.spss.com), R (il progetto R, R versione 3.4.3; R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria e EZR: <https://github.com/jinkim3/eZR>) e STATA 18.0 (StataCorp, 4905 Lakeway Drive, College Station, Texas 77845 USA).

9. Risultati

Prima del propensity score matching, rispetto ai pazienti con PBC, i soggetti con PH presentavano età inferiore (51 [40–60] anni vs 66 [60–74] anni; $p<0.001$), minore proporzione di sesso femminile (117/207 [56.5%] vs 23/23 [100%]; $p<0.001$), peso maggiore (69 [60–81] kg vs 61.0 [55–67] kg; $p<0.001$), maggior pressione diastolica (85 [83–87] mmHg vs 80 [70–80] mmHg; $p=0.004$). Non vi erano differenze statisticamente significative negli altri parametri confrontati. Nel profilo lipidico pre-matching, il gruppo PH presentava valori maggiori di colesterolo totale (259 [241–285] mg/dL vs 225 [199–254] mg/dL; $p<0.001$) e LDL-C (176 [154–194] mg/dL vs 145 [117–160] mg/dL, rispettivamente; $p<0.001$) rispetto ai pazienti affetti da PBC, mentre nel gruppo PBC risultavano più elevati i livelli di HDL-C (54 [42–66] mg/dL nel gruppo PH vs 73 [64–79] mg/dL nel gruppo PBC; $p<0.001$) e più bassi i valori di TG (142 [96–232] mg/dL nel gruppo PH vs 92 [66–107] mg/dL nel gruppo PBC; $p<0.001$). I dati completi dopo il propensity score sono riportati nella **Tabella 1**.

Tabella 1. Caratteristiche demografiche e cliniche dopo propensity score matching

	Ipercolesterolemia poligenica (n=13)	Colangite biliare primitiva (n=23)	p
Età [anni]	65 (60-67)	66 (60-74)	0.239
Sesso [femminile]	12 (92.3)	23 (100)	0.177
Peso [kg]	66.4 (62.2-71.2)	61 (55-67)	0.100
BMI [kg/m²]	24.3 (23.4-26.5)	23.7 (21.5-26.2)	0.537
Abitudine al fumo [fumatori attivi]	2 (15.4)	4 (17.4)	0.877
Storia familiare di ASCVD	6 (46.2)	9 (39.1)	0.681
Pressione arteriosa sistolica [mm/Hg]	130 (122-133)	120 (110-140)	0.190
Pressione arteriosa diastolica [mm/Hg]	80 (80-87)	80 (70-80)	0.140

I dati sono mostrati come valore assoluto e frequenza, e come mediana e intervallo interquartile.

Abbreviazioni: BMI, indice di massa corporea; ASCVD, malattia cardiovascolare aterosclerotica.

Dopo il propensity score matching, l'analisi prospettica ha potuto includere 13 pazienti con PH e 23 pazienti con PBC. Nel complesso, l'età era sovrapponibile tra gruppi (65 [60–67]

anni nel gruppo PH vs 66 [60–74] anni nel gruppo PBC; $p=0.239$), senza differenze significative nella proporzione di sesso femminile (gruppo PH: 12/13 [92.3%] vs gruppo PBC 23/23 [100%]; $p=0.177$). La prevalenza di fumo attivo era simile (2/13 [15.4%] nel gruppo PH vs 4/23 [17.4%] nel gruppo PBC; $p=0.877$), così come la familiarità per ASCVD (6/13 [46.2%] nel gruppo PH vs 9/23 [39.1%] nel gruppo PBC; $p=0.681$).

Nel pannello biochimico, AST (20 [18–26] U/L vs 26 [24–30] U/L; $p=0.011$), ALP (78 [69–98] U/L vs 99 [80–123] U/L; $p=0.031$) e γ -globuline (12.6 [10.9–13.7] g/L vs 15.1 [13.6–18.4]; $p=0.002$) erano significativamente inferiori nel gruppo PH rispetto al gruppo PBC, rispettivamente. Non si sono osservate differenze statisticamente significative nel profilo lipidico dei due gruppi (**Tabella 2**).

Tabella 2. Emocromo, biochimica e profilo lipidico dei pazienti inclusi nell'analisi prospettica

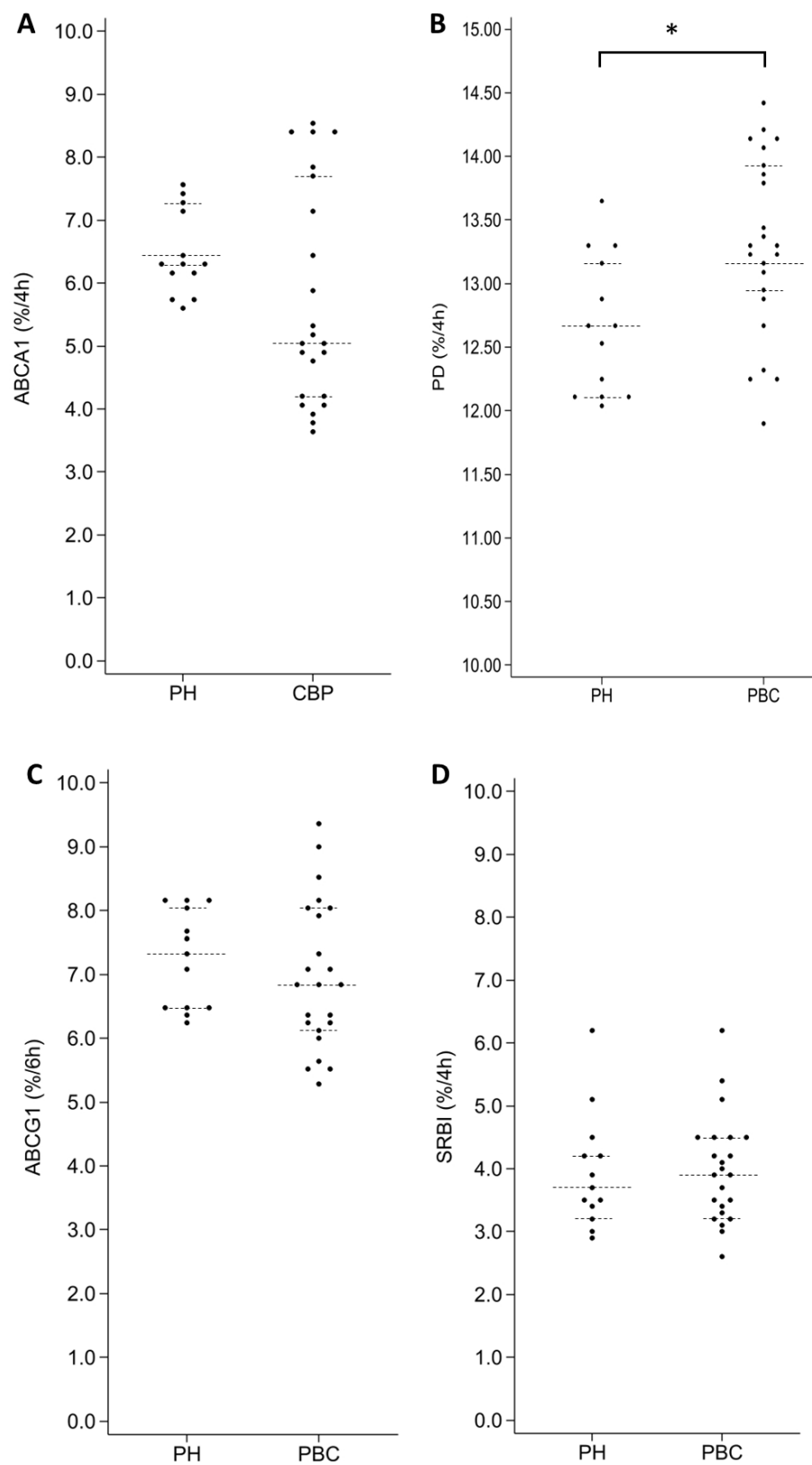
	Ipercolesterolemia poligenica (n=13)	Colangite biliare primitiva (n=23)	p
EMOCROMO			
Globuli bianchi [$\times 10^3/\mu\text{L}$]	8.1 (5.7-8.6)	6.3 (5.5-7.6)	0.179
Emoglobina [g/dL]	13.5 (12.9-14.7)	13.2 (12.3-13.7)	0.131
Volume corpuscolare medio [fl]	88 (86-91)	89 (85-92)	0.673
Piastrine [$\times 10^3/\mu\text{L}$]	247 (220-336)	240 (221-317)	0.673
BIOCHIMICA			
Creatinina [mg/dL]	0.7 (0.6-0.9)	0.7 (0.6-0.8)	0.494
Bilirubina totale [mg/dL]	0.7 (0.5-0.8)	0.6 (0.5-0.8)	0.149
Bilirubina diretta [mg/dL]	0.2 (0.1-0.2)	0.1 (0.1-0.2)	0.296
AST [U/L]	20 (18-26)	26 (24-30)	0.011
ALT [U/L]	24 (21-25)	20 (17-25)	0.361
ALP [U/L]	78 (69-98)	99 (80-123)	0.031
gGT [U/L]	45 (35-53)	35 (26-60)	0.296
Albumina [g/L]	3.6 (3.6-4.4)	4.2 (4.1-4.4)	0.087
Gamma-globuline [g/L]	12.6 (10.9-13.7)	15.1 (13.6-18.4)	0.002
PROFILO LIPIDICO			
Colesterolo totale [mg/dL]	249 (224-268)	225 (199-254)	0.055
LDL-C [mg/dL]	161 (131-172)	145 (117-160)	0.226
HDL-C [mg/dL]	63 (57-78)	73 (64-79)	0.267
Trigliceridi [mg/dL]	101 (80-142)	92 (66-107)	0.281

I dati sono mostrati come mediana e intervallo interquartile.

Abbreviazioni: AST, aspartato aminotransferasi; ALT, alanina aminotransferasi; ALP, fosfatasi alcalina; gGT, gamma-glutamyl transferasi; LDL-C, colesterolo a bassa densità lipoproteica; HDL-C, colesterolo ad alta densità lipoproteica.

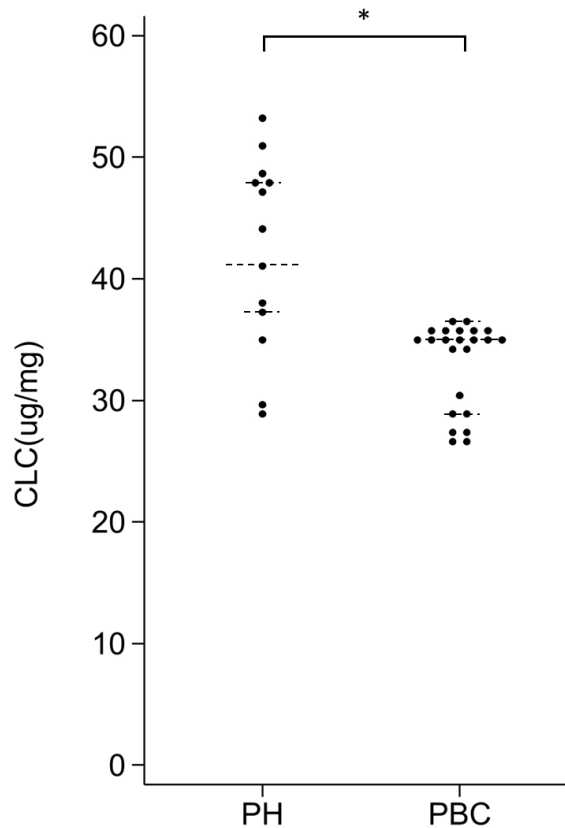
Andando a valutare i parametri di efflusso di colesterolo e di capacità di carico macrofagica, la CEC totale era pari a 19.1 (18.8–19.7) %/4 h nel gruppo PH mentre nei pazienti con PBC era pari a 18.5 (18.1–20.9) %/4 h ($p=0.361$). Tra le componenti via-specifiche, la quota ABCA1-mediata era 6.3 (6.2–7.2) %/4 h nei pazienti con PH e 5.1 (4.2–7.8) %/4 h nel gruppo PBC ($p=0.093$; **Figura 1A**); la PD è risultata significativamente inferiore nel gruppo PH rispetto ai pazienti affetti da PBC (12.67 [12.1–13.1] vs 13.3 [12.9–13.9] %/4 h; $p=0.008$; **Figura 1B**). La quota ABCG1-mediata era pari a 7.3 (6.5–8.0) %/6 h nei pazienti con PH rispetto a 6.9 (6.1–8.1) %/6 h nel gruppo PBC ($p=0.281$; **Figura 1C**); la quota SR-BI-mediata era pari a 3.7 (3.4–4.2) %/4 h nel gruppo PH rispetto a 3.9 (3.3–4.5) %/4 h nel gruppo PBC ($p=0.820$; **Figura 1D**). La CLC era significativamente più elevata nel gruppo PH rispetto al gruppo PBC, con valori pari a 43.8 (37.6–48.3) $\mu\text{g}/\text{mg}$ e 35.2 (29.2–35.6) $\mu\text{g}/\text{mg}$, rispettivamente ($p=0.001$; **Figura 2**).

Figura 1. Componenti via-specifiche della capacità di efflusso del colesterolo (CEC) nei soggetti con PBC e con ipercolesterolemia poligenica (PH): contributi ABCA1, diffusione passiva (PD), ABCG1 e SR-BI



* $p < 0.05$

Figura 2. Capacità di carico del colesterolo (CLC) sierica nei soggetti con colangite biliare primitiva (PBC) e ipercolesterolemia poligenica (PH).

 $*p<0.05$

Nel modello lineare generale aggiustato per BMI e LDL-C basale, abitudine al fumo, PBC e familiarità per ASCVD, la diagnosi di PBC rimaneva associata a valori inferiori di CLC. Le medie marginali stimate erano 40.9 (95CI: 37.0-44.7) µg/mg nel gruppo PH e 33.9 (95CI: 30.7-37.0) µg/mg nel gruppo PBC, con differenza aggiustata pari a 7.02 µg/mg (95CI: 2.0-12.0; p=0.008). La familiarità cardiometabolica risultava associata indipendentemente a CLC più elevata (PBC: differenza 8.24 µg/mg; p=0.002). La bontà di adattamento del modello era R²=0.653 (R² aggiustato=0.533). Nessun altro termine di interazione esplorato raggiungeva la significatività statistica convenzionale.

10. Discussione

La PBC è spesso caratterizzata dalla presenza di una dislipidemia associata alla colestasi, contraddistinta da ipercolesterolemia e da livelli di HDL-C spesso aumentati[32]. Tale condizione, tuttavia, si accompagna ad un apparente paradosso per cui, nonostante l'alterazione del profilo lipidico, i pazienti con PBC non sembrano mostrare un incremento proporzionale del rischio di malattia cardiovascolare aterosclerotica[49]. È pertanto plausibile ipotizzare che la qualità e la funzione delle lipoproteine possano giocare un ruolo importante nella definizione di questo fenotipo cardiovascolare[1,32]. Sulla base di questo razionale, il presente studio osservazionale prospettico ha confrontato per la prima volta la CLC e i parametri di CEC in pazienti con PBC rispetto ad un campione di soggetti con PH, con analoghe caratteristiche generali, storia familiare, comorbidità e profilo lipidico, al fine di verificare se differenze funzionali nel trasporto inverso del colesterolo e nella propensione al caricamento macrofagico possano contribuire a spiegare la minore tendenza all'aterosclerosi osservata in letteratura nella PBC.

Per rendere i due gruppi il più comparabili possibile, è stato applicato un matching mediante propensity score in base ai principali fattori, inclusi età, sesso, indice di massa corporea, comorbidità, familiarità per eventi cardiovascolari, tabagismo e parametri lipidici di base. Nel matching non sono stati presi in considerazione il profilo citocolestatico ed i valori di γ -globuline in quanto rappresentano variabili strettamente legate alla patologia di esposizione (colestasi e attivazione immunitaria tipiche della PBC) e, di conseguenza, non costituiscono covariate "neutre" comparabili nel gruppo PH. Inoltre, va considerato che tutti i pazienti PBC erano in trattamento con UDCA, benché nessuno fosse trattato con terapie di seconda linea, mentre i soggetti con ipercolesterolemia poligenica era trattati al momento dello studio con sola terapia dietetica e non assumevano nessun farmaco ipocolesterolemizzante.

Il risultato principale emerso dallo studio è una differenza significativa nella CLC tra i due gruppi, con i pazienti con PBC che presentavano valori inferiori rispetto ai soggetti con PH. Questa osservazione è di grande interesse perché suggerisce che l'ipercolesterolemia dei pazienti con PBC possa possedere un potenziale aterogeno ridotto. È noto infatti che valori di CLC più bassi identificano un siero complessivamente meno incline a caricare di colesterolo i macrofagi [64], e tale effetto è coerente con il quadro epidemiologico descritto in letteratura, secondo il quale i pazienti affetti da PBC presentano un ridotto rischio di malattie cardiovascolari[49,51]. Una possibile interpretazione potrebbe derivare dal fatto che, nella colestasi, una quota del colesterolo circolante sia veicolata da particelle atipiche, in particolare le Lp-X, ricca di fosfolipidi e colesterolo non esterificato e povera di apoB[36]. Queste particelle, oltre a veicolare colesterolo, possono contribuire a sequestrare componenti biliari e a ridurre la quota libera, svolgendo un ruolo adattativo; ne consegue che l'aumento del colesterolo totale nella PBC può non corrispondere a un incremento proporzionale delle lipoproteine classiche apoB-aterogene, con un impatto potenzialmente minore su caricamento macrofagico e formazione di foam cells[44]. Coerentemente, diversi dati sperimentali e clinici suggeriscono che la Lp-X, pur contribuendo all'elevato colesterolo plasmatico, non eserciti i tipici effetti pro-aterogeni dell'LDL-C. Infatti, in vitro, la Lp-X è stata descritta come una componente in grado di ridurre l'ossidazione delle LDL e di preservare l'integrità endoteliale, attenuando un passaggio chiave dell'aterogenesi[44]. In accordo con quest'ultima evidenza, in uno studio caso-controllo i pazienti con PBC che presentavano livelli elevati di colesterolo, presentavano uno spessore intima-media carotideo significativamente inferiore rispetto a controlli senza PBC, ma con ipercolesterolemia, così come una minore prevalenza di stenosi carotidea significativa (19% vs 43%)[50].

Inoltre, l'abbondante presenza di HDL funzionali nei pazienti PBC può competere con le LDL nell'interazione con i macrofagi, facilitando la rimozione del colesterolo ed eventualmente riducendo il netto accumulo intracellulare. Tuttavia, poiché la concentrazione

di HDL-C non riflette necessariamente la funzionalità delle HDL, è stata infatti analizzata la CEC come misura funzionale. In tal senso, nel nostro studio, la CEC totale è stata considerata come risultato dell'integrazione di due componenti, ovvero la PD e la quota ABCA1-mediata, quest'ultima stimata come differenza tra condizioni con e senza induzione di ABCA1 tramite cAMP. Complessivamente, nel nostro studio la CEC totale non differiva significativamente tra i pazienti con PBC ed i pazienti affetti da PH, suggerendo che la capacità del siero di promuovere l'efflusso di colesterolo dai macrofagi risulti simile in questi due gruppi di pazienti. Tuttavia, l'analisi delle singole componenti ha evidenziato un diverso contributo relativo, in particolare, la quota ABCA1-mediata ha mostrato una tendenza a valori inferiori nei pazienti con PBC, seppur non significativi. Al contrario, la componente attribuibile alla PD è risultata significativamente più elevata nel gruppo PBC. Pertanto, sulla base dei nostri risultati, l'interpretazione biologica più plausibile è che, nella PBC, la CEC complessiva risulti sostanzialmente preservata, ma con una diversa ripartizione tra i meccanismi di efflusso. Da un lato, la colestasi potrebbe penalizzare selettivamente l'asse apoA-I/ABCA1. Per esempio, l'attivazione del recettore FXR è stata associata all'induzione di miR-144, con conseguente riduzione di ABCA1 e dell'efflusso a esso dipendente[77,78]. Dall'altro le modificazioni qualitative delle particelle lipoproteiche in corso di colestasi possono favorire vie non saturabili e meno specifiche, come la PD, a causa della maggiore disponibilità di accettori e modifiche della superficie lipoproteica[67,76,79].

Coerentemente con questa interpretazione, gli endpoint di efflusso maggiormente dipendenti dalle HDL mature sono risultati sovrapponibili tra i gruppi. Infatti, né l'efflusso ABCG1-mediato né quello SR-BI-mediato hanno mostrato differenze significative tra PBC e PH nel nostro campione. Nel complesso, questi risultati suggeriscono che la funzionalità delle HDL mature coinvolta nelle vie ABCG1/SR-BI sia sostanzialmente preservata. Le differenze osservate sembrano invece interessare soprattutto componenti più influenzate dalla disponibilità e dalle caratteristiche degli accettori, nonché da meccanismi non ABCA1-

dipendenti[55,76]. Questa lettura appare coerente anche con il razionale delle più recenti terapie di seconda linea basate sui PPAR-agonisti[26]: seladelpar ha mostrato nel trial RESPONSE una risposta biochimica nel 61.7% dei pazienti rispetto al 20.0% con placebo, con beneficio anche sul prurito[23]; elafibranor ha ottenuto nel trial ELATIVE una risposta nel 51% dei pazienti e la normalizzazione dell'ALP nel 15%, con segnali favorevoli soprattutto sulla fatigue[24–27]. In questa prospettiva, la ridotta CLC e il maggiore contributo della diffusione passiva osservati nella nostra coorte suggeriscono che il rimodellamento lipoproteico della PBC possa rappresentare un target biologico rilevante anche per monitorare l'impatto metabolico delle nuove terapie, oltre alla sola risposta colestatica[23,24,26,54,62,64].

Per consolidare la robustezza dei nostri risultati, abbiamo condotto un'analisi multivariata includendo le principali variabili potenzialmente associate alla CLC. In questo modello, l'appartenenza al gruppo PBC è rimasta un predittore indipendente di valori più bassi di CLC. Questo dato indica che la ridotta propensione del siero dei pazienti con PBC a promuovere l'accumulo di colesterolo nei macrofagi non è spiegata unicamente dal profilo lipidico tradizionale, rafforzando l'ipotesi che vi siano alterazioni qualitative del trasporto delle caratteristiche delle lipoproteine, che conferiscono un minor potenziale aterogeno a questi pazienti. Questa interpretazione assume ulteriore rilievo se collocata nel contesto dell'attuale strategia terapeutica della PBC. Sebbene la pratica clinica continui a essere guidata soprattutto dalla risposta biochimica a UDCA, valutata principalmente mediante ALP e bilirubina, il concetto di risposta adeguata appare oggi meno rassicurante di quanto ritenuto in passato. Evidenze recenti hanno infatti mostrato che anche pazienti classificati come responder secondo i criteri convenzionali, ma con ALP persistentemente superiore alla norma, in particolare tra 1.1 e $1.5 \times \text{ULN}$, possono mantenere un rischio residuo di eventi epatici avversi, suggerendo che il controllo ottimale della malattia richieda target più profondi e una più accurata personalizzazione terapeutica[80–82]. Parallelamente,

l'ampliamento delle opzioni di seconda linea, in particolare con elafibranor e seladelpar, ha modificato in modo rilevante lo scenario terapeutico della PBC; tuttavia, l'efficacia di questi trattamenti è ancora definita prevalentemente sulla base di endpoint biochimici surrogate, mentre restano limitati i dati sugli hard outcomes e quasi assenti quelli relativi all'impatto sul profilo lipoproteico funzionale e sul rischio cardiovascolare[23,24,83,84]. In tale contesto, i nostri dati suggeriscono che CEC e CLC possano rappresentare biomarcatori complementari ai marker epatici tradizionali. La riduzione della CLC osservata nei pazienti con PBC, associata a una CEC globale preservata e a un maggiore contributo della diffusione passiva, supporta infatti l'ipotesi che l'ipercolesterolemia colestatica non coincida necessariamente con un fenotipo pro-aterogeno. Se confermate in studi longitudinali, queste misure funzionali potrebbero avere una duplice utilità: da un lato affinare la stratificazione del rischio cardiovascolare in una popolazione in cui colesterolo totale e LDL-C possono risultare fuorvianti; dall'altro fungere da biomarcatori traslazionali di risposta biologica alle terapie di seconda linea, consentendo di verificare se il miglioramento biochimico si accompagni anche a una modulazione favorevole della funzionalità HDL e della tendenza del siero a promuovere l'accumulo macrofagico di colesterolo[54,62,64]. In questa prospettiva, CEC e CLC non dovrebbero essere considerate alternative ai marker correnti di colestasi, bensì strumenti aggiuntivi per una caratterizzazione più personalizzata della PBC, in linea con il recente focus internazionale sugli endpoint surrogate e sulla real-world evidence nello sviluppo terapeutico della malattia[81,84].

Nel valutare i risultati di questo studio vanno considerati alcuni limiti metodologici e intrinseci. In primo luogo, abbiamo confrontato due gruppi distinti per patologia e, sebbene sia stato applicato un matching a priori, è possibile che la presenza di confondenti non misurati possano aver influenzato i risultati ottenuti. In secondo luogo, il campione di pazienti, sebbene attentamente selezionato, ha una numerosità relativamente limitata e proviene da un singolo centro: questo potrebbe ridurre la potenza statistica e limitare la

generalizzabilità dei risultati ad altre popolazioni. Inoltre, tra i limiti del presente studio deve essere riconosciuta la numerosità relativamente ridotta del gruppo di controllo PH. Tale aspetto è principalmente legato alla natura complessa e costosa delle analisi funzionali lipidiche e al disegno dello studio, che ha previsto intenzionalmente un matching 2:1 PBC:controlli mediante propensity score, con l'obiettivo di ottimizzare le risorse disponibili mantenendo al contempo la comparabilità tra i gruppi. Non è stato eseguito un calcolo formale preliminare della dimensione campionaria, in considerazione della natura esplorativa e meccanicistica dello studio e della mancanza di dati preliminari specifici sulla CLC nei pazienti con PBC; pertanto, i risultati devono essere interpretati con cautela e confermati in coorti indipendenti più ampie. Un altro limite tecnico riguarda la misura stessa della CLC e della CEC. Queste misurazioni funzionali sono saggi in vitro complessi che, pur standardizzati in letteratura, possono risentire di variabilità pre-analitica e analitica. Inoltre, non abbiamo misurato le isoforme delle HDL, i livelli di lipoproteina(a) e di Lp-X. In particolare, la determinazione di quest'ultimo parametro è tecnicamente complessa e raramente utilizzata clinicamente[85], anche se avrebbe potuto fornire un dato diretto sul carico di questa lipoproteina atipica nei pazienti affetti da PBC. Infine, il nostro studio non ha incluso un follow-up clinico sugli eventi cardiovascolari e, sebbene le differenze osservate tra capacità di efflusso mediata da PD e CLC suggeriscano un diverso rischio cardiovascolare potenziale, non è possibile confermare direttamente l'impatto di queste differenze sugli esiti clinici.

Accanto ai limiti, questo studio presenta diversi punti di forza che ne supportano la validità metodologica e la rilevanza scientifica. Innanzitutto, si tratta—per quanto a nostra conoscenza—del primo studio prospettico che confronta in modo diretto e approfondito le proprietà funzionali delle lipoproteine in pazienti con PBC rispetto a soggetti con PH. Infine, il lavoro offre un contributo traslazionale proponendo la PBC come modello fisiopatologico per studiare determinanti qualitativi del trasporto del colesterolo e della funzionalità

lipoproteica; in questa prospettiva, l'ipercolesterolemia compensatoria descritta nella PBC è stata indicata come possibile sistema modello per generare nuove ipotesi e orientare l'utilizzo di markers funzionali utili alla stratificazione del rischio cardiovascolare, oltre i parametri lipidici tradizionali. Pertanto, le evidenze ottenute su CEC e CLC possono infatti contribuire a interpretare e stratificare il rischio anche in altri contesti in cui infiammazione e disfunzione metabolica modulano il profilo lipidico e la biologia delle HDL. In questo senso, l'integrazione di misure funzionali con i parametri lipidici convenzionali può supportare l'identificazione di biomarcatori più informativi e di possibili target terapeutici condivisi, favorendo il passaggio dai meccanismi osservati nella PBC a strategie applicabili in scenari clinici più ampi. In particolare, futuri trial prospettici nella PBC dovrebbero includere CEC e CLC come endpoint secondari o esplorativi, valutandone l'associazione con il raggiungimento della deep response biochimica secondo i criteri Paris-II e con la risposta alle terapie di seconda linea, per chiarire se il rimodellamento funzionale delle HDL accompagna il beneficio epatico e identifichi anche un vantaggio cardiometabolico aggiuntivo non colto dai soli marker colestatici[23,24,81–84,86].

11. Conclusione

In conclusione, il nostro studio identifica un profilo funzionale distinto del trasporto del colesterolo nei pazienti con PBC rispetto ai soggetti con PH. In particolare, nei pazienti con PBC la CLC è risultata significativamente ridotta, indicando una minore propensione del siero a promuovere l'accumulo di colesterolo nei macrofagi e, quindi, la formazione di foam cells. Parallelamente, la CEC complessiva è risultata sovrapponibile tra i gruppi, ma sostenuta da una diversa distribuzione delle componenti, con una maggiore quota attribuibile alla PD nel gruppo PBC, a supporto di un efflusso globalmente preservato. Nel loro insieme, questi risultati forniscono un razionale biologico al paradosso clinico della PBC, suggerendo

che un'elevata colesterolemia in corso di colestasi non si traduce necessariamente in una maggiore aterogenicità quando il profilo lipoproteico è qualitativamente differente e funzionalmente più favorevole.

Pertanto, misure funzionali come CLC e CEC potrebbero affiancare il profilo lipidico standard per una valutazione più accurata del rischio cardiovascolare. Saranno tuttavia necessari studi prospettici più ampi, con end-point clinici e/o imaging di progressione aterosclerotica, per confermare l'associazione tra queste differenze funzionali e gli esiti cardiovascolari, definirne il valore prognostico e valutarne l'eventuale utilità come potenziali markers.

12. Bibliografia

1. Tanaka, A.; Ma, X.; Takahashi, A.; Vierling, J.M. Primary Biliary Cholangitis. *The Lancet* **2024**, *404*, 1053–1066, doi:10.1016/S0140-6736(24)01303-5.
2. Gulamhusein, A.F.; Hirschfield, G.M. Primary Biliary Cholangitis: Pathogenesis and Therapeutic Opportunities. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2020**, *17*, 93–110, doi:10.1038/S41575-019-0226-7.
3. Hirschfield, G.M.; Beuers, U.; Corpechot, C.; Invernizzi, P.; Jones, D.; Marzioni, M.; Schramm, C. EASL Clinical Practice Guidelines: The Diagnosis and Management of Patients with Primary Biliary Cholangitis. *J. Hepatol.* **2017**, *67*, 145–172, doi:10.1016/j.jhep.2017.03.022.
4. Hirschfield, G.M.; Dyson, J.K.; Alexander, G.J.M.; Chapman, M.H.; Collier, J.; Hübscher, S.; Patanwala, I.; Pereira, S.P.; Thain, C.; Thorburn, D.; et al. The British Society of Gastroenterology/UK-PBC Primary Biliary Cholangitis Treatment and Management Guidelines. *Gut* **2018**, *67*, 1568–1594, doi:10.1136/GUTJNL-2017-315259.
5. Trivella, J.; John, B. V.; Levy, C. Primary Biliary Cholangitis: Epidemiology, Prognosis, and Treatment. *Hepatol. Commun.* **2023**, *7*, doi:10.1097/HC9.0000000000000179.
6. Lindor, K.D.; Bowlus, C.L.; Boyer, J.; Levy, C.; Mayo, M. Primary Biliary Cholangitis: 2018 Practice Guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology* **2019**, *69*, 394–419, doi:10.1002/HEP.30145.
7. Gerussi, A.; Cristofori, L.; Carbone, M.; Asselta, R.; Invernizzi, P. The Immunobiology of Female Predominance in Primary Biliary Cholangitis. *J. Autoimmun.* **2018**, *95*, 124–132, doi:10.1016/j.jaut.2018.10.015.
8. Bianchi, I.; Lleo, A.; Bernuzzi, F.; Calzari, L.; Smyk, D.S.; Invernizzi, P. The X-Factor in Primary Biliary Cirrhosis: Monosomy X and Xenobiotics. *Auto Immun. Highlights* **2012**, *3*, 127–132, doi:10.1007/S13317-012-0043-2.
9. Gershwin, M.E.; Selmi, C.; Worman, H.J.; Gold, E.B.; Watnik, M.; Utts, J.; Lindor, K.D.; Kaplan, M.M.; Vierling, J.M. Risk Factors and Comorbidities in Primary Biliary Cirrhosis: A Controlled Interview-Based Study of 1032 Patients. *Hepatology* **2005**, *42*, 1194–1202, doi:10.1002/HEP.20907.
10. Tanaka, A. Current Understanding of Primary Biliary Cholangitis. *Clin. Mol. Hepatol.* **2021**, *27*, 1–21, doi:10.3350/CMH.2020.0028.
11. Tanaka, A.; Leung, P.S.C.; Gershwin, M.E. Pathogen Infections and Primary Biliary Cholangitis. *Clin. Exp. Immunol.* **2019**, *195*, 25–34, doi:10.1111/CEI.13198.
12. Wang, J.; Yang, G.; Dubrovsky, A.M.; Choi, J.; Leung, P.S.C. Xenobiotics and Loss of Tolerance in Primary Biliary Cholangitis. *World J. Gastroenterol.* **2016**, *22*, 338–348, doi:10.3748/WJG.V22.I1.338.

13. Prieto, J.; Banales, J.M.; Medina, J.F. Primary Biliary Cholangitis: Pathogenic Mechanisms. *Curr. Opin. Gastroenterol.* **2021**, *37*, 91–98, doi:10.1097/MOG.0000000000000703.
14. Yang, C.Y.; Ma, X.; Tsuneyama, K.; Huang, S.; Takahashi, T.; Chalasani, N.P.; Bowlus, C.L.; Yang, G.X.; Leung, P.S.C.; Ansari, A.A.; et al. IL-12/Th1 and IL-23/Th17 Biliary Microenvironment in Primary Biliary Cirrhosis: Implications for Therapy. *Hepatology* **2014**, *59*, 1944–1953, doi:10.1002/HEP.26979.
15. Banales, J.M.; Huebert, R.C.; Karlsen, T.; Strazzabosco, M.; LaRusso, N.F.; Gores, G.J. Cholangiocyte Pathobiology. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2019**, *16*, 269, doi:10.1038/S41575-019-0125-Y.
16. Kimura, N.; Setsu, T.; Arao, Y.; Sakai, N.; Watanabe, Y.; Abe, H.; Kamimura, H.; Sakamaki, A.; Yokoo, T.; Kamimura, K.; et al. Cumulative Risk of Developing a New Symptom in Patients with Primary Biliary Cholangitis and Its Impact on Prognosis. *JGH Open* **2022**, *6*, 577, doi:10.1002/JGH3.12789.
17. Marzioni, M.; Bassanelli, C.; Ripellino, C.; Urbinati, D.; Alvaro, D. Epidemiology of Primary Biliary Cholangitis in Italy: Evidence from a Real-World Database. *Dig. Liver Dis.* **2019**, *51*, 724–729, doi:10.1016/J.DLD.2018.11.008.
18. Scheuer, P.J. Primary Biliary Cirrhosis. *Proc. R. Soc. Med.* **1967**, *60*, 1257–1260, doi:10.1177/003591576706001205.
19. Ludwig, J.; Dickson, E.R.; McDonald, G.S.A. Staging of Chronic Nonsuppurative Destructive Cholangitis (Syndrome of Primary Biliary Cirrhosis). *Virchows Arch. A Pathol. Anat. Histol.* **1978**, *379*, 103–112, doi:10.1007/BF00432479.
20. Giannini, E.G.; Pasta, A.; Labanca, S.; Pieri, G.; Marengo, S.; Plaz Torres, M.C. Surveillance for Hepatocellular Carcinoma in Patients with Primary Biliary Cholangitis: For All or Just for Some? *JHEP Rep.* **2025**, *7*, doi:10.1016/J.JHEPR.2025.101362.
21. Bessone, F.; Hillotte, G.L.; Tamagnone, N.; Arnedillo, D.; Roma, M.G. Ursodeoxycholic Acid for the Management of Drug-Induced Liver Injury: Role of Hepatoprotective and Anti-Cholestatic Mechanisms. *J. Clin. Transl. Hepatol.* **2025**, *13*, 162–168, doi:10.14218/JCTH.2024.00325.
22. Nevens, F.; Andreone, P.; Mazzella, G.; Strasser, S.I.; Bowlus, C.; Invernizzi, P.; Drenth, J.P.H.; Pockros, P.J.; Regula, J.; Beuers, U.; et al. A Placebo-Controlled Trial of Obeticholic Acid in Primary Biliary Cholangitis. *N. Engl. J. Med.* **2016**, *375*, 631–643, doi:10.1056/NEJMOA1509840.
23. Hirschfield, G.M.; Bowlus, C.L.; Mayo, M.J.; Kremer, A.E.; Vierling, J.M.; Kowdley, K. V.; Levy, C.; Villamil, A.; Ladrón de Guevara Cetina, A.L.; Janczewska, E.; et al. A Phase 3 Trial of Seladelpar in Primary Biliary Cholangitis. *N. Engl. J. Med.* **2024**, *390*, 783–794, doi:10.1056/NEJMOA2312100.
24. Kowdley, K. V.; Bowlus, C.L.; Levy, C.; Akarca, U.S.; Alvares-da-Silva, M.R.; Andreone, P.; Arrese, M.; Corpechot, C.; Francque, S.M.; Heneghan, M.A.; et al. Efficacy and Safety of Elafibranor in Primary Biliary Cholangitis. *N. Engl. J. Med.* **2024**, *390*, 795–805, doi:10.1056/NEJMOA2306185.

25. Fiorucci, S.; Urbani, G.; Distrutti, E.; Biagioli, M. Obeticholic Acid and Other Farnesoid-X-Receptor (FXR) Agonists in the Treatment of Liver Disorders. *Pharmaceuticals (Basel)* **2025**, *18*, doi:10.3390/PH18091424.
26. Angelara, M.; Papachristou, K.; Papatheodoridi, M.; Nasiri-Ansari, N.; Karagiannakis, D.S.; Androutsakos, T. Primary Biliary Cholangitis. Treatment Options in 2025. A Narrative Review. *Front. Immunol.* **2025**, *16*, doi:10.3389/FIMMU.2025.1698833.
27. Elafibranor Long-Term Efficacy and Safety and Impact on Fatigue in Primary Biliary Cholangitis: Interim Results From the Open-Label Extension of the ELATIVE Trial Up to 3 Years. *Gastroenterol. Hepatol. (N. Y.)* **2024**, *20*, 3.
28. Giannini, E.G.; Pasta, A.; Calabrese, F.; Labanca, S.; Marengo, S.; Pieri, G.; Plaz Torres, M.C.; Strazzabosco, M. Second-Line Treatment for Patients With Primary Biliary Cholangitis: A Systematic Review With Network Meta-Analysis. *Liver Int.* **2025**, *45*, doi:10.1111/LIV.16222.
29. Corpechot, C.; Chazouillères, O.; Rousseau, A.; Le Gruyer, A.; Habersetzer, F.; Mathurin, P.; Gorla, O.; Potier, P.; Minello, A.; Silvain, C.; et al. A Placebo-Controlled Trial of Bezafibrate in Primary Biliary Cholangitis. *N. Engl. J. Med.* **2018**, *378*, 2171–2181, doi:10.1056/NEJMOA1714519.
30. Mitchell, N.E.; Lee, J.; Twohig, P.; Chan, S.Y.; Diaz, D.J.; Ansari, N. Evolving Therapeutic Landscape of Primary Biliary Cholangitis: A Review. *World J. Hepatol.* **2025**, *17*, doi:10.4254/WJH.V17.I7.107223.
31. Reshetnyak, V.I.; Maev, I. V.; Reshetnyak, V.I.; Maev, I. V. Features of Lipid Metabolism Disorders in Primary Biliary Cholangitis. *Biomedicines 2022, Vol. 10*, **2022**, *10*, doi:10.3390/BIOMEDICINES10123046.
32. Wah-Suarez, M.I.; Danford, C.J.; Patwardhan, V.R.; Jiang, Z.G.; Bonder, A. Hyperlipidaemia in Primary Biliary Cholangitis: Treatment, Safety and Efficacy. *Frontline Gastroenterol.* **2019**, *10*, 401–408, doi:10.1136/FLGASTRO-2018-101124.
33. Longo, M.; Crosignani, A.; Battezzati, P.M.; Squarcia Giussani, C.; Invernizzi, P.; Zuin, M.; Podda, M. Hyperlipidaemic State and Cardiovascular Risk in Primary Biliary Cirrhosis. *Gut* **2002**, *51*, 265–269, doi:10.1136/GUT.51.2.265.
34. Huygen, L.P.M.; Westerink, J.; Mol, G.C.; Bemelmans, R.H.H. When LDL Cholesterol Is Not LDL Cholesterol: LpX, A Clinical Lesson. *JACC Case Rep.* **2022**, *4*, 690–693, doi:10.1016/J.JACCAS.2022.03.009.
35. Brandt, E.J.; Regnier, S.M.; Leung, E.K.Y.; Chou, S.H.; Baron, B.W.; Te, H.S.; Davidson, M.H.; Sargis, R.M. Management of Lipoprotein X and Its Complications in a Patient with Primary Sclerosing Cholangitis. *Clin. Lipidol.* **2015**, *10*, 305, doi:10.2217/CLP.15.23.
36. Fellin, R.; Manzato, E. Lipoprotein-X Fifty Years after Its Original Discovery. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* **2019**, *29*, 4–8, doi:10.1016/j.numecd.2018.09.006.

37. Heimerl, S.; Boettcher, A.; Kaul, H.; Liebisch, G. Lipid Profiling of Lipoprotein X: Implications for Dyslipidemia in Cholestasis. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids* **2016**, *1861*, 681–687, doi:10.1016/j.bbalip.2016.04.016.
38. Kostner, G.M.; Laggner, P.; Prexl, H.J.; Holasek, A. Investigation of the Abnormal Low-Density Lipoproteins Occurring in Patients with Obstructive Jaundice. *Biochemical Journal* **1976**, *157*, 401, doi:10.1042/BJ1570401.
39. Murano, T.; Oyama, T.; Miyashita, Y.; Shirai, K. A Case of Obstructive Jaundice with Severe Hypercholesterolemia Probably Due to Lipoprotein-Y. *J. Atheroscler. Thromb.* **2008**, *15*, 276–280, doi:10.5551/JAT.E559.
40. Greco, S.; Campigotto, M.; D’Amuri, A.; Fabbri, N.; Passaro, A. Dyslipidemia, Cholangitis and Fatty Liver Disease: The Close Underexplored Relationship: A Narrative Review. *J. Clin. Med.* **2024**, *13*, doi:10.3390/JCM13092714.
41. Suzuki, L.; Hirayama, S.; Fukui, M.; Sasaki, M.; Hiroi, S.; Ayaori, M.; Terai, S.; Tozuka, M.; Watada, H.; Miida, T. Lipoprotein-X in Cholestatic Patients Causes Xanthomas and Promotes Foam Cell Formation in Human Macrophages. *J. Clin. Lipidol.* **2017**, *11*, 110–118, doi:10.1016/J.JACL.2016.10.013.
42. Galindo, C.L.; Khan, S.; Zhang, X.; Yeh, Y.S.; Liu, Z.; Razani, B. Lipid-Laden Foam Cells in the Pathology of Atherosclerosis: Shedding Light on New Therapeutic Targets. *Expert Opin. Ther. Targets* **2023**, *27*, 1231, doi:10.1080/14728222.2023.2288272.
43. Lynn, E.G.; Karmin, O. Role of Lipoprotein-X in Foam Cell Formation and Rat Mesangial Cell Proliferation. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **1997**, *24*, 973–975, doi:10.1111/J.1440-1681.1997.TB02731.X.
44. Chang, P.Y.; Lu, S.C.; Su, T.C.; Chou, S.F.; Huang, W.H.; Morrisett, J.D.; Chen, C.H.; Liao, C.S.; Lee, Y.T. Lipoprotein-X Reduces LDL Atherogenicity in Primary Biliary Cirrhosis by Preventing LDL Oxidation. *J. Lipid Res.* **2004**, *45*, 2116–2122, doi:10.1194/JLR.M400229-JLR200.
45. Nemes, K.; Åberg, F.; Gylling, H.; Isoniemi, H. Cholesterol Metabolism in Cholestatic Liver Disease and Liver Transplantation: From Molecular Mechanisms to Clinical Implications. *World J. Hepatol.* **2016**, *8*, 924, doi:10.4254/WJH.V8.I22.924.
46. Propst, A.; Propst, T.; Lechleitner, M.; Hoppichler, F.; Kathrein, H.; Vogel, W.; Judmaier, G.; Knapp, E.; Braunsteiner, H. Hypercholesterolemia in Primary Biliary Cirrhosis Is No Risk Factor for Atherosclerosis. *Dig. Dis. Sci.* **1993**, *38*, 379–380, doi:10.1007/BF01307562.
47. Crippin, J.S.; Lindor, K.D.; Jorgensen, R.; Kottke, B.A.; Harrison, J.M.; Murtaugh, P.A.; Dickson, E.R. Hypercholesterolemia and Atherosclerosis in Primary Biliary Cirrhosis: What Is the Risk? *Hepatology* **1992**, *15*, 858–862, doi:10.1002/HEP.1840150518.
48. Solaymani-Dodaran, M.; Aithal, G.P.; Card, T.; West, J. Risk of Cardiovascular and Cerebrovascular Events in Primary Biliary Cirrhosis: A Population-Based Cohort

- Study. *Am. J. Gastroenterol.* **2008**, *103*, 2784–2788, doi:10.1111/J.1572-0241.2008.02092.X.
49. Sorokin, A.; Brown, J.L.; Thompson, P.D. Primary Biliary Cirrhosis, Hyperlipidemia, and Atherosclerotic Risk: A Systematic Review. *Atherosclerosis* **2007**, *194*, 293–299, doi:10.1016/j.atherosclerosis.2006.11.036.
 50. Allocca, M.; Crosignani, A.; Gritti, A.; Ghilardi, G.; Gobatti, D.; Caruso, D.; Zuin, M.; Podda, M.; Battezzati, P.M. Hypercholesterolaemia Is Not Associated with Early Atherosclerotic Lesions in Primary Biliary Cirrhosis. *Gut* **2006**, *55*, 1795–1800, doi:10.1136/GUT.2005.079814.
 51. Suraweera, D.; Fanous, C.; Jimenez, M.; Tong, M.J.; Saab, S. Risk of Cardiovascular Events in Patients with Primary Biliary Cholangitis - Systematic Review. *J. Clin. Transl. Hepatol.* **2018**, *6*, 119–126, doi:10.14218/JCTH.2017.00064.
 52. von Eckardstein, A.; Nordestgaard, B.G.; Remaley, A.T.; Catapano, A.L. High-Density Lipoprotein Revisited: Biological Functions and Clinical Relevance. *Eur. Heart J.* **2023**, *44*, 1394–1407, doi:10.1093/EURHEARTJ/EHAC605.
 53. Khera, A. V.; Cuchel, M.; de la Llera-Moya, M.; Rodrigues, A.; Burke, M.F.; Jafri, K.; French, B.C.; Phillips, J.A.; Mucksavage, M.L.; Wilensky, R.L.; et al. Cholesterol Efflux Capacity, High-Density Lipoprotein Function, and Atherosclerosis. *N. Engl. J. Med.* **2011**, *364*, 127–135, doi:10.1056/NEJMOA1001689.
 54. Rohatgi, A.; Khera, A.; Berry, J.D.; Givens, E.G.; Ayers, C.R.; Wedin, K.E.; Neeland, I.J.; Yuhanna, I.S.; Rader, D.R.; de Lemos, J.A.; et al. HDL Cholesterol Efflux Capacity and Incident Cardiovascular Events. *N. Engl. J. Med.* **2014**, *371*, 2383–2393, doi:10.1056/NEJMOA1409065.
 55. Pownall, H.J.; Rosales, C.; Gillard, B.K.; Gotto, A.M. High-Density Lipoproteins, Reverse Cholesterol Transport and Atherogenesis. *Nat. Rev. Cardiol.* **2021**, *18*, 712–723, doi:10.1038/S41569-021-00538-Z.
 56. Murakami, K.; Harada, A.; Toh, R.; Kubo, T.; Miwa, K.; Kim, J.; Kiriya, M.; Iino, T.; Nishikawa, Y.; Uno, S.N.; et al. Fully Automated Immunoassay for Cholesterol Uptake Capacity to Assess High-Density Lipoprotein Function and Cardiovascular Disease Risk. *Scientific Reports* **2023**, *13*, 1899-, doi:10.1038/s41598-023-28953-x.
 57. Adorni, M.P.; Ronda, N.; Bernini, F.; Zimetti, F. High Density Lipoprotein Cholesterol Efflux Capacity and Atherosclerosis in Cardiovascular Disease: Pathophysiological Aspects and Pharmacological Perspectives. *Cells* **2021**, *10*, 574, doi:10.3390/CELLS10030574.
 58. Favari, E.; Zimetti, F.; Bortnick, A.E.; Adorni, M.P.; Zanotti, I.; Canavesi, M.; Bernini, F. Impaired ATP-Binding Cassette Transporter A1-Mediated Sterol Efflux from Oxidized LDL-Loaded Macrophages. *FEBS Lett.* **2005**, *579*, 6537–6542, doi:10.1016/J.FEBSLET.2005.10.042;ISSUE:ISSUE:DOI.

59. Favari, E.; Ronda, N.; Adorni, M.P.; Zimetti, F.; Salvi, P.; Manfredini, M.; Bernini, F.; Borghi, C.; Cicero, A.F.G. ABCA1-Dependent Serum Cholesterol Efflux Capacity Inversely Correlates with Pulse Wave Velocity in Healthy Subjects. *J. Lipid Res.* **2013**, *54*, 238–243, doi:10.1194/jlr.P030452.
60. Favari, E.; Thomas, M.J.; Sorci-Thomas, M.G. High-Density Lipoprotein Functionality as a New Pharmacological Target on Cardiovascular Disease: Unifying Mechanism That Explains High-Density Lipoprotein Protection Toward the Progression of Atherosclerosis. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **2018**, *71*, 325–331, doi:10.1097/FJC.0000000000000573.
61. Saleheen, D.; Scott, R.; Javad, S.; Zhao, W.; Rodrigues, A.; Picataggi, A.; Lukmanova, D.; Mucksavage, M.L.; Luben, R.; Billheimer, J.; et al. Association of HDL Cholesterol Efflux Capacity with Incident Coronary Heart Disease Events: A Prospective Case-Control Study. *Lancet Diabetes Endocrinol.* **2015**, *3*, 507–513, doi:10.1016/S2213-8587(15)00126-6.
62. Lee, J.J.; Chi, G.; Fitzgerald, C.; Kazmi, S.H.A.; Kalayci, A.; Korjian, S.; Duffy, D.; Shaunik, A.; Kingwell, B.; Yeh, R.W.; et al. Cholesterol Efflux Capacity and Its Association With Adverse Cardiovascular Events: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front. Cardiovasc. Med.* **2021**, *8*, doi:10.3389/FCVM.2021.774418.
63. Karpouzas, G.A.; Papotti, B.; Ormseth, S.; Palumbo, M.; Hernandez, E.; Adorni, M.P.; Zimetti, F.; Budoff, M.; Ronda, N. Serum Cholesterol Loading Capacity on Macrophages Is Linked to Coronary Atherosclerosis and Cardiovascular Event Risk in Rheumatoid Arthritis. *RMD Open* **2022**, *8*, e002411, doi:10.1136/RMDOPEN-2022-002411.
64. Adorni, M.P.; Zimetti, F.; Puntoni, M.; Bigazzi, F.; Sbrana, F.; Minichilli, F.; Bernini, F.; Ronda, N.; Favari, E.; Sampietro, T. Cellular Cholesterol Efflux and Cholesterol Loading Capacity of Serum: Effects of LDL-Apheresis. *J. Lipid Res.* **2012**, *53*, 984, doi:10.1194/JLR.P024810.
65. De Villiers, W.J.S.; Smart, E.J. Macrophage Scavenger Receptors and Foam Cell Formation. *J. Leukoc. Biol.* **1999**, *66*, 740–746, doi:10.1002/JLB.66.5.740.
66. Steinberg, D. The LDL Modification Hypothesis of Atherogenesis: An Update. *J. Lipid Res.* **2009**, *50*, S376, doi:10.1194/JLR.R800087-JLR200.
67. Zimetti, F.; Weibel, G.K.; Duong, M.N.; Rothblat, G.H. Measurement of Cholesterol Bidirectional Flux between Cells and Lipoproteins. *J. Lipid Res.* **2006**, *47*, 605–613, doi:10.1194/jlr.M500466-JLR200.
68. Perrone, F.; Favari, E.; Maglietta, G.; Verzè, M.; Pluchino, M.; Minari, R.; Sabato, R.; Mazzaschi, G.; Ronca, A.; Rossi, A.; et al. The Role of Blood Cholesterol Quality in Patients with Advanced Cancer Receiving Immune Checkpoint Inhibitors. *Cancer Immunol. Immunother.* **2023**, *72*, 2127, doi:10.1007/S00262-023-03398-3.
69. Ronda, N.; Greco, D.; Adorni, M.P.; Zimetti, F.; Favari, E.; Hjeltne, G.; Mikkelsen, K.; Borghi, M.O.; Favalli, E.G.; Gatti, R.; et al. Newly Identified Antiatherosclerotic Activity of Methotrexate and Adalimumab: Complementary Effects on Lipoprotein

- Function and Macrophage Cholesterol Metabolism. *Arthritis Rheumatol.* **2015**, *67*, 1155–1164, doi:10.1002/ART.39039.
70. Greco, D.; Gualtierotti, R.; Agosti, P.; Adorni, M.P.; Ingegnoli, F.; Rota, M.; Bernini, F.; Meroni, P.L.; Ronda, N. Anti-Atherogenic Modification of Serum Lipoprotein Function in Patients with Rheumatoid Arthritis after Tocilizumab Treatment, a Pilot Study. *J. Clin. Med.* **2020**, *9*, 1–9, doi:10.3390/JCM9072157.
 71. van Velzen, D.M.; Adorni, M.P.; Zimetti, F.; Strazzella, A.; Simsek, S.; Sirtori, C.R.; Heijer, M. den; Ruscica, M. The Effect of Transgender Hormonal Treatment on High Density Lipoprotein Cholesterol Efflux Capacity. *Atherosclerosis* **2021**, *323*, 44–53, doi:10.1016/j.atherosclerosis.2021.03.008.
 72. Palumbo, M.; Giammanco, A.; Purrello, F.; Pavanello, C.; Mombelli, G.; Di Pino, A.; Piro, S.; Cefalù, A.B.; Calabresi, L.; Averna, M.; et al. Effects of PCSK9 Inhibitors on HDL Cholesterol Efflux and Serum Cholesterol Loading Capacity in Familial Hypercholesterolemia Subjects: A Multi-Lipid-Center Real-World Evaluation. *Front. Mol. Biosci.* **2022**, *9*, 925587, doi:10.3389/FMOLB.2022.925587/FULL.
 73. Adorni, M.P.; Ferri, N.; Marchianò, S.; Trimarco, V.; Rozza, F.; Izzo, R.; Bernini, F.; Zimetti, F. Effect of a Novel Nutraceutical Combination on Serum Lipoprotein Functional Profile and Circulating PCSK9. *Ther. Clin. Risk Manag.* **2017**, *13*, 1555–1562, doi:10.2147/TCRM.S144121.
 74. Formisano, E.; Pasta, A.; Cremonini, A.L.; Favari, E.; Ronca, A.; Carbone, F.; Semino, T.; Di Pierro, F.; Sukkar, S.G.; Pisciotta, L. Efficacy of Nutraceutical Combination of Monacolin K, Berberine, and Silymarin on Lipid Profile and PCSK9 Plasma Level in a Cohort of Hypercholesterolemic Patients. *J. Med. Food* **2020**, *23*, 658–666, doi:10.1089/JMF.2019.0168.
 75. Zimetti, F.; Vuono, S. De; Gomaraschi, M.; Adorni, M.P.; Favari, E.; Ronda, N.; Ricci, M.A.; Veglia, F.; Calabresi, L.; Lupattelli, G. Plasma Cholesterol Homeostasis, HDL Remodeling and Function during the Acute Phase Reaction. *J. Lipid Res.* **2017**, *58*, 2051, doi:10.1194/JLR.P076463.
 76. Zanotti, I.; Favari, E.; Bernini, F. Cellular Cholesterol Efflux Pathways: Impact on Intracellular Lipid Trafficking and Methodological Considerations. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2012**, *13*, 292–302, doi:10.2174/138920112799095383.
 77. De Aguiar Vallim, T.Q.; Tarling, E.J.; Kim, T.; Civelek, M.; Baldán, Á.; Esau, C.; Edwards, P.A. MicroRNA-144 Regulates Hepatic ATP Binding Cassette Transporter A1 and Plasma High-Density Lipoprotein after Activation of the Nuclear Receptor Farnesoid X Receptor. *Circ. Res.* **2013**, *112*, 1602–1612, doi:10.1161/CIRCRESAHA.112.300648.
 78. Vickers, K.C.; Rader, D.J. Nuclear Receptors and MicroRNA-144 Coordinately Regulate Cholesterol Efflux. *Circ. Res.* **2013**, *112*, 1529–1531, doi:10.1161/CIRCRESAHA.113.301422.

79. Rothblat, G.H.; Phillips, M.C. High-Density Lipoprotein Heterogeneity and Function in Reverse Cholesterol Transport. *Curr. Opin. Lipidol.* **2010**, *21*, 229, doi:10.1097/MOL.0B013E328338472D.
80. Lindor, K.D.; Bowlus, C.L.; Boyer, J.; Levy, C.; Mayo, M. Primary Biliary Cholangitis: 2021 Practice Guidance Update from the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology* **2022**, *75*, 1012–1013, doi:10.1002/HEP.32117.
81. Cançado, G.G.L.; Lleo, A.; Levy, C.; Trauner, M.; Hirschfield, G.M. Primary Biliary Cholangitis and the Narrowing Gap towards Optimal Disease Control. *Lancet Gastroenterol. Hepatol.* **2025**, *10*, 855–870, doi:10.1016/S2468-1253(25)00025-1.
82. Corpechot, C.; Lemoine, S.; Soret, P.A.; Hansen, B.; Hirschfield, G.; Gulamhusein, A.; Montano-Loza, A.J.; Lytvyak, E.; Pares, A.; Olivas, I.; et al. Adequate versus Deep Response to Ursodeoxycholic Acid in Primary Biliary Cholangitis: To What Extent and under What Conditions Is Normal Alkaline Phosphatase Level Associated with Complication-Free Survival Gain? *Hepatology* **2024**, *79*, 39–48, doi:10.1097/HEP.0000000000000529.
83. Levy, C.; Bowlus, C.L. Primary Biliary Cholangitis: Personalizing Second-Line Therapies. *Hepatology* **2025**, *82*, doi:10.1097/HEP.0000000000001166.
84. Alvaro, D.; Calvaruso, V.; Carbone, M.; Cazzagon, N.; Floreani, A.; Invernizzi, P.; Marzioni, M.; Pasqualetti, P.; Pennisi, G.; Toniutto, P.; et al. Quality Measures to Enhance the Management and Treatment of Primary Biliary Cholangitis: A Delphi Consensus Study. *Liver Int.* **2025**, *45*, doi:10.1111/LIV.70118.
85. Ćwiklińska, A.; Mickiewicz, A.; Kowalski, R.; Kortas-Stempak, B.; Kuchta, A.; Mucha, K.; Makowiecki, M.; Gliwińska, A.; Lewandowski, K.; Paczek, L.; et al. Detection of Lipoprotein X (LpX): A Challenge in Patients with Severe Hypercholesterolaemia. *J. Med. Biochem.* **2020**, *39*, doi:10.2478/JOMB-2019-0038.
86. Corpechot, C.; Chazouillres, O.; Poupon, R. Early Primary Biliary Cirrhosis: Biochemical Response to Treatment and Prediction of Long-Term Outcome. *J. Hepatol.* **2011**, *55*, 1361–1367, doi:10.1016/J.JHEP.2011.02.031.