

Effetti "beyond cholesterol" delle statine: una terapia per 3 mesi con simvastatina riduce le lipoproteine aterogene in pazienti con coronaropatia prematura e basse HDL, senza fattori di rischio tradizionali

Abbiamo valutato gli effetti di una terapia per 3 mesi con simvastatina (20 mg/die) in dieci pazienti maschi con coronaropatia prematura (età media: 43 ± 7 anni) e basse HDL, in assenza di ipertensione, diabete, obesità e iperlipidemia. Dopo terapia, i livelli plasmatici di colesterolo totale ed LDL-colesterolo erano diminuiti, mentre non vi erano differenze significative nei livelli plasmatici dei trigliceridi o dell'HDL-colesterolo. Inoltre, dopo la terapia, abbiamo riscontrato un'effetto sui livelli delle lipoproteine remnants ed un aumento nel size delle LDL. Pertanto, non è da escludere che tale approccio terapeutico possa essere preso in considerazione quale scelta di prevenzione primaria per questa tipologia di pazienti.

Effects "beyond-cholesterol" by statins: a 3-months therapy with simvastatin reduces the atherogenic lipoproteins in patients with premature coronary artery disease and low HDL-cholesterol, free of the traditional cardiovascular risk factors

Summary

We evaluated the effects of a 3-months therapy with simvastatin (20 mg/day) in ten male patients (mean age: 43 ± 7 years) with premature coronary artery disease (CAD) with no hypertension, obesity, diabetes or hyperlipidemia. After therapy, plasmatic levels of both total and LDL-cholesterol decreased with no changes in triglycerides and HDL-cholesterol. In addition, after therapy, we found a raise in the LDL size and in the apoE free/apoE rich fractions ratio of triglyceride-rich lipoproteins. Therefore, simvastatin reduced the levels of atherogenic lipoproteins in normolipidemic patients with premature CAD and may be considered as a therapeutic choice in the primary prevention of such patients.

Rizzo M, Barbagallo CM, Pernice V, et al. Effects "beyond-cholesterol" by statins: a 3-months therapy with simvastatin reduces the atherogenic lipoproteins in patients with premature coronary artery disease and low HDL-cholesterol, free of the traditional cardiovascular risk factors. *Trends Med* 2004; 4(2):157-162.

© 2004 Pharma Project Group srl

Manfredi Rizzo, Carlo M Barbagallo, Vincenzo Pernice*, Antonio Rubino*, Davide Noto, Antonio Pace, Salvatore Amato, Cecilia Camarda, Vito Pinto*, Daniele Pieri*, Arian Frasheri*, Alberto Notarbartolo, Maurizio R Averna

Dipartimento di Medicina Clinica e delle Patologie Emergenti, Università degli studi di Palermo.

*Laboratorio di Emodinamica, Casa di Cura Villa Maria Eleonora, Palermo.

Key words:
therapy
statins
remnants
LDL size
risk factors

✉ **Maurizio Averna**

Dipartimento di Medicina Clinica e delle Patologie Emergenti
Policlinico "Paolo Giaccone"

Via del Vespro 141 - 90127 Palermo

e-mail: avernam@unipa.it

Tel.: 091-6552993 - Fax: 091-6552936

Introduzione

L'aterosclerosi rappresenta una malattia ad elevato costo sociale le cui complicanze rappresentano la principale causa di morte in molte popolazioni occidentali. Studi clinici ed epidemiologici hanno dimostrato l'esistenza di una serie di fattori di rischio per le malattie cardiovascolari, quali l'età avanzata, il sesso maschile, l'ipercolesterolemia, il fumo di sigaretta, l'obesità, l'ipertensione arteriosa. Tuttavia, l'assenza di tali fattori di rischio non assicura protezione dalle malattie cardiovascolari¹.

Pertanto, negli ultimi anni, sono stati proposti una serie di nuovi fattori di rischio cardiovascolare, quali l'iper-omocisteinemia, la microalbuminuria, le alterazioni dei parametri della coagulazione e della fibrinolisi, alcuni agenti infettivi, nonché una serie di alterazioni del metabolismo lipidico. Fra queste, i bassi livelli di HDL-colesterolo, l'ipertri-

gliceridemia, gli elevati livelli di Lp(a), la presenza di LDL piccole e dense, l'accumulo di lipoproteine remnants¹.

In particolare, studi clinici, epidemiologici ed angiografici hanno dimostrato che la presenza di LDL piccole e dense sia associata ad un rischio tre volte maggiore di malattia coronarica^{2,3}. Inoltre, recenti studi hanno suggerito che le lipoproteine remnants, che devono essere considerate come dei residui del catabolismo delle particelle ricche in trigliceridi, rivestano un ruolo rilevante nell'aterosclerosi^{4,5}.

E' noto che le statine, farmaci che agiscono inibendo in maniera selettiva l'enzima idrossi-metilglutaril-coenzimaA reductasi, svolgono una potente azione ipolipemizzante e sembrano inoltre possedere una serie di proprietà anti-aterogene al di là del semplice miglioramento dei livelli totali dei lipidi plasmatici⁶.

Scopo del nostro studio è stato pertanto quello di valutare se una terapia con statine (in particolare con simvastatina), in pazienti con coronaropatia accertata angiograficamente e basse HDL, esenti dai tradizionali fattori di rischio cardiovascolare (obesità, ipertensione, diabete, iperlipidemia), al di là degli effetti sui livelli totali di lipidi plasmatici, possa agire su altre anomalie del metabolismo lipidico, quali la presenza di LDL piccole e dense e sui livelli plasmatici delle lipoproteine remnants.

Materiali e metodi

Casistica

Abbiamo studiato tutti i pazienti (n=438) che si sono sottoposti consecutivamente per la durata di tre mesi all'esame angiografico presso il laboratorio di emodinamica della casa di cura Villa Maria Eleonora di Palermo e ne abbiamo raccolto i dati anamnestici e clinici. I dati raccolti includevano dati demografici ed antropometrici (sesso, età, peso, altezza), notizie anamnestiche (presenza di familiarità per malattie cardiovascolari, presenza di una pregressa patologia cerebrovascolare o cardiaca, presenza di una pregressa procedura di rivascolarizzazione coronarica, fumo di sigaretta), notizie cliniche (presenza di arteriopatia periferica, di eventuali malattie d'organo intercorrenti, di ipertensione o di diabete), notizie riguardanti la terapia in atto.

Tra tutti i pazienti maschi che presentavano una stenosi critica (>75%) dell'albero coronarico (n=250) abbiamo selezionato quelli esenti dai clas-

sici fattori di rischio cardiovascolare, identificando un sottogruppo di dieci pazienti. I criteri di inclusione erano i seguenti: età minore di 55 anni; assenza di ipertensione (pressione sistolica o diastolica minore rispettivamente di 140 e 90 mmHg, e assenza di terapia con farmaci anti-ipertensivi); assenza di diabete o di ridotta tolleranza glucidica (glicemia a digiuno minore di 110 mg/dl e assenza di terapia con farmaci anti-diabetici o con insulina); assenza di fumo di sigaretta; BMI minore di 30 Kg/m²; colesterolemia totale minore di 200 mg/dl e trigliceridemia minore di 170 mg/dl. I criteri di esclusione erano: la presenza di malattie renali, endocrine o epatiche; l'uso di farmaci che potessero condizionare il metabolismo lipidico (statine, fibrati, steroidi, diuretici, β -bloccanti). Abbiamo effettuato un prelievo ematico di 20 cc in provette con EDTA, dopo un digiuno di 12-14h, per il dosaggio dell'assetto lipidico e delle lipoproteine plasmatiche in due momenti successivi: di base, la mattina del giorno della coronarografia, e dopo una terapia per 3 mesi con 20 mg/die di simvastatina.

Assetto lipidico

Colesterolo totale e trigliceridi sono stati dosati secondo le metodiche enzimatiche standard^{7,8}, l'HDL-colesterolo dopo precipitazione con acido fosfotungstenico e cloruro di magnesio⁹, mentre l'LDL-colesterolo è stato calcolato usando la formula di Friedewald.

Ultracentrifugazione preparativa

Il plasma è stato separato immediatamente tramite centrifugazione a 4.000 giri/min per 20 minuti a 4°C. Tramite metodica di ultracentrifugazione preparativa è stata separata dal plasma la frazione contenente le lipoproteine ricche in trigliceridi, ovvero la frazione con densità minore di 1.019 g/L. Tale frazione conteneva le lipoproteine a densità molto bassa (very-low-density-lipoproteins: VLDL) e quelle a densità intermedia (intermediate-density-lipoproteins: IDL). In dettaglio, la densità di 6 ml di plasma veniva portata a densità pari a 1.019 g/L con NaBr e i campioni ultracentrifugati a 40.000 giri/min per 18 ore a 10°C in tubi da 6 ml in un rotore Beckman ad angolo fisso, modello 40ti. Alla fine della ultracentrifugazione è stato rimosso il top di 2 ml, contenente le VLDL+IDL totali¹⁰.

Cromatografia in affinità

Le VLDL+IDL totali sono state successivamente separate in due differenti sottofrazioni a se-

condo del contenuto di apoE tramite una metodica di cromatografia in affinità con colonna di eparina-sepharosio¹¹. Preliminarmente, la frazione contenente le VLDL+IDL totali è stata dializzata per un periodo di 24-48 h col tampone di equilibrio della colonna e, dopo essere stata filtrata, è stata passata attraverso la colonna. La sottofrazione povera in apoE non si legava alla colonna (frazione "Unbound") e quindi è passata immediatamente, mentre la sottofrazione ricca in apoE si legava alla colonna (frazione "Bound") e veniva da questa staccata aggiungendo sale ad alta molarità (NaCl 1M) al tampone di equilibrio. Entrambe le sottofrazioni così ottenute dalla metodica di cromatografia sono state dializzate per un periodo di 24-48 h contro soluzione fisiologica e successivamente ne è stato dosato il contenuto proteico¹².

Elettroforesi del plasma su gels in gradiente di poliaccrilamide

Per la valutazione del size delle LDL è stata utilizzata una metodica, già standardizzata nel nostro laboratorio¹³, di elettroforesi del plasma su gels in gradiente 2-14% di poliaccrilamide (Alamo Gels, San Antonio, TX, USA)^{14,15}. Dopo la corsa elettroforetica per 24h, i gels sono stati colorati per proteine e lipidi. Il size delle LDL corrispondente a ciascun campione è stato calcolato tramite una curva generata dalla distanza di migrazione di proteine standard di diametro noto, quali bande di latex, tireoglobulina, apoferritina con diametri di 380 Å, 170 Å e 122 Å e di standard plasmatici di valore noto gentilmente forniti dal Prof. Ronald M. Krauss (Department of Molecular and Nuclear Medicine, Lawrence Berkeley National Laboratory, University of California, USA). Il fenotipo aterogeno delle LDL (il cosiddetto "pattern B") è stato definito con valori di size minori a 263.4 Å. Valori superiori sono stati attribuiti al "pattern A"^{13,16}.

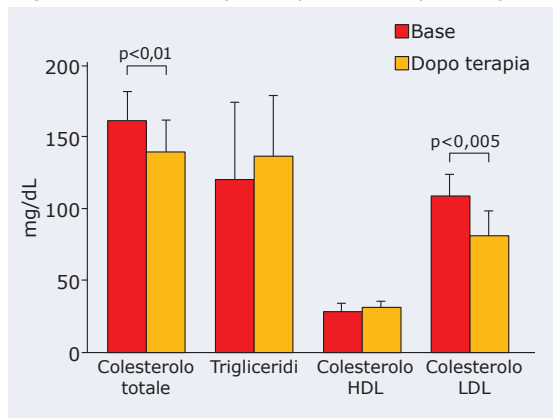
Analisi statistica

Per l'analisi statistica si è usato il programma Statview (Abacus Concepts Inc, USA). Sono state calcolate le medie e le deviazioni standard e le differenze sono state analizzate usando il test t di Student per dati appaiati e, quando necessario, il test non parametrico Mann-Whitney.

Risultati

I dieci pazienti maschi studiati avevano una età media di 43 ± 7 anni e un BMI medio di 27 ± 2 .

Figura 1. Assetto lipidico prima e dopo terapia.



Uno di essi presentava all'anamnesi familiarità cardiovascolare, quattro avevano sofferto di infarto miocardico acuto e tre erano stati già rivascolarizzati mediante angioplastica coronarica. Un paziente aveva inoltre sofferto di ictus cerebrale. Per quanto riguarda l'estensione della malattia aterosclerotica coronarica, due di essi erano tri-vasali, altri due erano bi-vasali, gli altri erano mono-vasali. Cinque sono stati sottoposti ad angioplastica coronarica con impianto di stent. Nessuno soffriva di arteriopatia periferica e, secondo i criteri di inclusione nello studio, nessuno era diabetico, iperteso, obeso o iperlipidemico.

Nella figura 1 sono mostrati i livelli dei lipidi plasmatici prima e dopo la terapia con 20 mg/die di simvastatina. Dopo terapia abbiamo riscontrato una significativa riduzione dei livelli di colesterolemia totale (139 ± 23 vs 161 ± 21 , $p < 0,01$) e di LDL-colesterolemia (80 ± 17 vs 109 ± 15 , $p < 0,005$); le concentrazioni plasmatiche dei trigliceridi non mostravano differenze significative (136 ± 43 vs 120 ± 54). I livelli dell'HDL-colesterolo erano bassi

Figura 2. Livelli delle lipoproteine ricche in trigliceridi prima e dopo terapia.

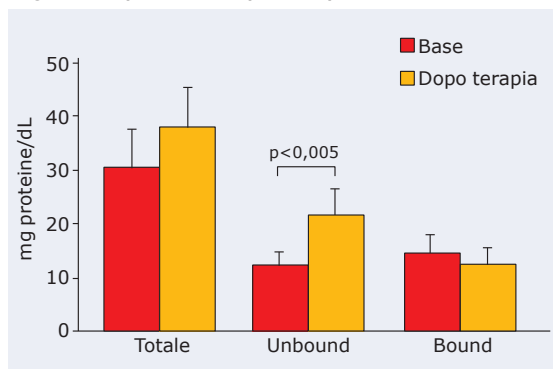
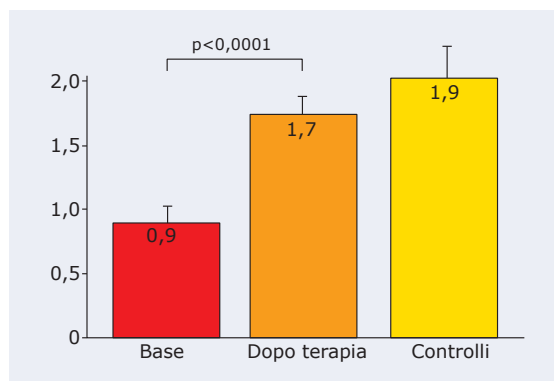


Figura 3. Rapporto Unbound/Bound nelle lipoproteine ricche in trigliceridi prima e dopo terapia e in una popolazione di controllo.



ed aumentavano di circa il 10% dopo terapia (31 ± 5 vs 28 ± 6), anche se non si raggiungeva la significatività statistica.

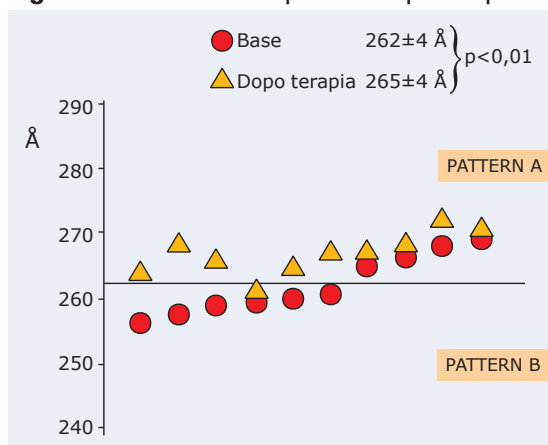
I livelli delle lipoproteine ricche in trigliceridi prima e dopo cromatografia in affinità sono mostrati nella figura 2. Dopo terapia i livelli delle VLDL+IDL totali e della frazione Bound non mostravano differenze significative (38 ± 7 vs 31 ± 7 e 13 ± 3 vs 15 ± 4 , rispettivamente), mentre i livelli della frazione Unbound erano significativamente aumentati (21 ± 5 vs 13 ± 2 , $p < 0,005$). Pertanto (figura 3), il rapporto Unbound/Bound era significativamente aumentato dopo terapia (0,9 vs 1,7, $p < 0,0001$) e raggiungeva un valore assai simile a quello riscontrato in un gruppo di soggetti sani, matchati per sesso ed età, usati come popolazione di controllo.

La figura 4 mostra i valori di size delle LDL prima e dopo terapia in ciascun paziente. All'esame di base, sei pazienti su dieci presentavano il fenotipo aterogeno pattern B delle LDL, con prevalenza delle LDL piccole e dense. Dopo terapia, di questi sei pazienti soltanto un paziente era rimasto con il pattern B; gli altri avevano subito uno "shift" dal pattern B al pattern A. Il size medio delle LDL era pertanto aumentato in maniera significativa dopo terapia: 265 ± 2 vs 262 ± 4 Å, $p < 0,01$.

Discussione e conclusioni

L'apoE è una glicoproteina con un ruolo chiave nel metabolismo lipidico; in particolare stimola il binding e la clearance dei remnants delle lipoproteine ricche in trigliceridi ed inoltre influenza l'idrolisi delle particelle più larghe, che è mediata dall'azione dell'enzima lipoprotein-lipasi^{10,17}. E'

Figura 4. Size delle LDL prima e dopo terapia.



stato documentato che nel plasma le lipoproteine ricche in trigliceridi possono contenere o meno l'apoE e sembra che l'accumulo delle particelle che ne siano ricche sia associato alla severità dell'aterosclerosi coronarica, anche se tale accumulo è frequentemente associato ad altre condizioni metaboliche, quali diabete e dislipidemia¹¹. Pertanto, è difficile stabilire la loro peculiare aterogenicità.

Per tali ragioni ci siamo proposti in passato di studiare i livelli plasmatici delle lipoproteine ricche in trigliceridi con e senza apoE in un gruppo di pazienti maschi con coronaropatia prematura e basse HDL, in assenza dei classici fattori di rischio per malattie cardiovascolari¹⁸. Recenti evidenze cliniche hanno identificato i remnants delle lipoproteine ricche in trigliceridi quali importanti targets terapeutici e le statine sembrano agire su tali lipoproteine^{19,20}.

Il nostro studio ha dimostrato che pazienti maschi con coronaropatia prematura e basse HDL, in assenza dei fattori di rischio tradizionali per CAD (obesità, ipertensione, diabete, fumo, ipercolesterolemia) accumulavano lipoproteine ricche in trigliceridi relativamente ricche in apoE¹⁸. Inoltre, tali pazienti avevano una maggiore prevalenza di LDL piccole e dense, che, come è noto, rappresentano un'ulteriore fattore di rischio cardiovascolare, associato ad un rischio tre volte maggiore di malattia coronarica²⁻³. Pertanto, tali pazienti possedevano un peculiare profilo aterogeno, in assenza di altre condizioni metaboliche. Abbiamo speculato sui potenziali meccanismi coinvolti: l'aumentata produzione dei remnants delle lipoproteine ricche in trigliceridi poteva aver saturato i normali pathways per il loro catabolismo o clearance; altre caratteristiche delle lipo-

proteine ricche in trigliceridi relativamente ricche in apoE nei pazienti coronaropatici (es.: l'aumentato contenuto di apoCIII) poteva aver compromesso il loro metabolismo e clearance; la clearance in vivo di queste particelle poteva essere dipendente da recettori la cui funzione era forse compromessa nei pazienti coronaropatici.

Scopo del presente studio è stato quello di valutare se una terapia con statine, ed in particolare con simvastatina a dosaggio di 20 mg/die, possa dare dei benefici a questa categoria di pazienti, valutandone in particolare l'azione terapeutica "beyond cholesterol" sulle LDL aterogene piccole e dense e sui livelli plasmatici delle lipoproteine remnants.

Abbiamo riscontrato che in un gruppo di pazienti con valori di colesterolemia totale e trigliceridemia nella norma, ma con bassi livelli di HDL-colesterolo, affetti da cardiopatia prematura, la terapia per tre mesi con simvastatina ha comportato una significativa riduzione nei livelli del colesterolo totale e dell'LDL-colesterolo. Abbiamo inoltre osservato un significativo aumento nel size delle LDL e un'effetto sui livelli plasmatici delle lipoproteine remnants. In particolare, i livelli della frazione unbound erano aumentati (probabil-

mente per il lieve e non significativo aumento dei trigliceridi plasmatici) e il rapporto Unbound/ Bound, anch'esso aumentato, raggiungeva un valore assai simile a quello riscontrato in un gruppo di soggetti sani, matchati per sesso ed età, usati come popolazione di controllo.

Dobbiamo precisare che i pazienti inclusi nel nostro studio presentavano bassi livelli di HDL-colesterolo. Altri studi hanno considerato in prevenzione secondaria pazienti con caratteristiche simili e in particolare lo studio VA-HIT²¹ ha dimostrato in oltre 2.000 pazienti coronaropatici e con bassi livelli di HDL-colesterolo, seguiti per 5 anni, che l'uso di un fibrato (il gemfibrozil) può determinare una significativa riduzione (22%) del rischio coronarico.

Nel nostro studio, l'utilizzo della simvastatina in pazienti coronaropatici con livelli di LDL-colesterolo normale o basso ha determinato una serie di effetti qualitativi sul profilo lipoproteico, che possono rappresentare uno dei meccanismi che spiegano i benefici di tale terapia. Non è da escludere che questo approccio terapeutico possa essere preso in considerazione quale scelta di prevenzione primaria per questa tipologia di pazienti. **TiM**

Bibliografia

1. **National Cholesterol Education Program (NCEP)** Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation* 2002; 106:3143-421.
2. **Austin MA, Breslow JL, Hennekens CH, et al.** Low-density lipoprotein subclass patterns and risk of myocardial infarction. *JAMA* 1988; 260:1917-1921.
3. **Austin MA, King MC, Vranizan KM, et al.** Atherogenic lipoprotein phenotype. A proposed genetic marker for coronary heart disease risk. *Circulation* 1990; 82:495-506.
4. **Kugiyama K, Doi H, Takazoe K, et al.** Remnant lipoprotein levels in fasting serum predict coronary events in patients with coronary artery disease. *Circulation* 1999; 99:2852-2854.
5. **Masuoka H, Kamei S, Wagayama H, et al.** Association of remnant-like particle cholesterol with coronary artery disease in patients with normal total cholesterol levels. *Am Heart J* 2000; 139:305-310.
6. **Stancu C, Sima A.** Statins: mechanism of action and effects. *J Cell Mol Med* 2001; 5:378-387.
7. **Allain CC, Poon LS, Chan CS, et al.** Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin Chem* 1974; 20:470-475.
8. **Nagele U, Hagele EO, Sauer G, et al.** Reagent for the enzymatic determination of serum total triglycerides with improved lipolytic efficiency. *J Clin Chem Clin Biochem* 1984; 22: 165-174.
9. **Warnick GR, Nguyen T, Albers JJ.** Comparison of improved precipitation methods for quantification of high density lipoprotein cholesterol. *Clin Chem* 1985; 31:217-222.
10. **Barbagallo CM, Fan J, Blanche PJ, et al.** Overexpression of human hepatic lipase and apoprotein E in transgenic rabbits attenuates response to dietary cholesterol and alter lipoprotein subclass distributions. *Arterioscl Thromb Vasc Biol* 1999; 19:625-632.
11. **Cohn JS, Marcoux C, Davignon J.** Detection, quantification and characterization of potentially atherogenic triglyceride-rich remnant lipoproteins. *Arterioscl Thromb Vasc Biol* 1999; 19:2474-2486.
12. **Rizzo M, Barbagallo CM, Noto D, et al.** Lipoprotein remnants accumulation in end-stage renal disease: evidence of an active role of heparin administration during hemodialysis. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2003; 13:336.
13. **Barbagallo CM, Rizzo M, Cefalù AB, et al.** Changes in plasma lipids and low-density lipoprotein peak particle size during and after myocardial infarction. *Am J Cardiol* 2002; 9:460-462.
14. **Rainwater DL, Andres DW, Ford AL, et al.** Production of polyacrylamide gradient gels for the

- electrophoretic resolution of lipoproteins. *J Lipid Res* 1992; 33:1876-1881.
15. **Rizzo M, Taylor JM, Barbagallo CM, et al.** Effects on lipoprotein subclasses of combined expression of human hepatic lipase and human apoB in transgenic rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24:141-146.
 16. **Rizzo M, Barbagallo CM, Severino M, et al.** Low-density-lipoproteins particle size in a population living in a small mediterranean island. *Eur J Clin Invest* 2003; 33:126-133.
 17. **Curtiss LK, Boisvert WA.** Apolipoprotein E and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 2000; 11: 243-51.
 18. **Rizzo M, Barbagallo CM, Noto D, et al.** Accumulation of apoE-containing triglyceride-rich lipoproteins in normolipidemic men with premature coronary artery disease. *Circulation* 2000; 102:601-602.
 19. **Havel RJ.** Remnant lipoproteins as therapeutic targets. *Curr Opin Lipidol* 2000; 11: 615-620.
 20. **Santos RD, Sposito AC, Ventura LI, et al.** Effect of pravastatin on plasma removal of a chylomicron-like emulsion in men with coronary artery disease. *Am J Cardiol* 2000; 85:1163-1166.
 21. **Robins SJ, Collins D, Wittes JT, et al.** Relation of Gemfibrozil Treatment and Lipid Levels With Major Coronary Events: VA-HIT: A Randomized Controlled Trial. *JAMA* 2001; 285: 1585-1591.

