

REVIEW

ATORVASTATINA RIDUCE L'ACCUMULO DI MACROFAGI NELLA PLACCA ATEROSCLEROTICA IN PAZIENTI SOTTOPOSTI AD ENDOARTERIECTOMIA CAROTIDEA

Atorvastatin treatment reduces macrophage content in atherosclerotic plaques in patients undergoing carotid endarterectomy

MASSIMO PUATO¹, MARCELLO RATTAZZI^{1,2}, MARTA ZANON¹,
ELISABETTA FAGGIN¹, FRANCESCO CIPOLLONE³, ANDREA MEZZETTI³,
PAOLO PAULETTO^{1,2}, ALBERTO ZAMBON¹

¹Dipartimento di Medicina, Azienda Ospedaliera Universitaria di Padova, Padova;

²Medicina Interna I, Ospedale Ca' Foncello, Treviso;

³Dipartimento di Medicina e Scienze dell'Invecchiamento, Università G. D'Annunzio, Chieti

SUMMARY

The aim of our study was to compare the effect of a statin-based therapy vs. a non statin-based treatment (cholestyramine plus sitosterol) on cell composition of carotid atherosclerotic plaque.

Methods. We recruited 60 hypercholesterolemic patients (total cholesterol range: 220-300 mg/dL) eligible for carotid endarterectomy. Patients had never received any lipid-lowering treatment before recruitment. Three months before surgery, patients were randomized into 2 groups, receiving atorvastatin (AT, average dose 40 mg/day, n=40) or cholestyramine 8 g/day plus sitosterol 2.5 g/day (C-S, n=20). Analysis of plaque cell composition was performed on endarterectomy specimens.

Results. Both AT and C-S treatments resulted in a significant reduction of total cholesterol (TC) and low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), although the decrease in total cholesterol and LDL-C was of smaller magnitude in the cholestyramine plus sitosterol as compared to the AT group (TC -23 mg/dl vs -57 mg/dl e LDL-C -17 mg/dl vs -52 mg/dl respectively, $p < 0.0005$). The two regimens did not significantly influence the levels of inflammatory markers (including high-sensitivity serum C-reactive protein). Macrophage content was significantly lower in carotid plaques from the AT group compared to the C-S group (8.2% vs 20.9 % of plaque area, $p < 0.05$). These differences remained significant after the adjustment for changes in non-high density lipoprotein cholesterol plasma levels (non-HDL-C) at follow-up. Smooth muscle cell plaque content was higher in the AT than the C-S group (10.9% vs 5.1% of plaque area) and the trend, although not significant, was observed even after adjustment for non HDL-C levels. No difference in lymphocyte number was observed within treatments. A significant inverse association was observed between changes in non HDL-C and macrophage content in the carotid plaques ($r = -0.391$, $p = 0.022$).

Conclusions. Short-term treatment with intermediate-dose statin is superior to a non statin lipid-lowering regimen in reducing macrophage cell content within atherosclerotic lesions. This effect is partly accounted for by the degree of non HDL-C lowering with therapy, supporting the hypothesis of a specific pleiotropic, anti-inflammatory effect peculiar of the statin-based lipid-lowering therapy.

Keywords: Atherosclerosis, lipoproteins, carotid plaques, statin, macrophages, inflammation.

Introduzione

L'effetto della terapia con statine sulla riduzione degli eventi cardiovascolari sembra essere dovuto principalmente alla riduzione dei livelli di colesterolo, specificamente del colesterolo LDL (LDL-C), ed in misura minore, ed ancora oggetto di discussione, agli effetti pleiotropici non dipendenti dai lipidi (1-4).

Un beneficio significativo a breve termine, e quindi verosimilmente indipendente dalla riduzione della colesterolemia, della terapia con statine è già stato descritto in pazienti con sindrome coronarica acuta sottoposti ad angioplastica percutanea (4, 5) e con eventi cerebrovascolari (6).

Queste osservazioni confermano l'ipotesi che le statine possiedono molteplici punti d'attacco sui meccanismi fisiopatologici dell'aterotrombosi, alcuni dei quali potenzialmente indipendenti dall'effetto ipocolesterolemizzante (effetti pleiotropici) (7).

In tal senso, numerosi studi clinici hanno dimostrato un effetto anti-infiammatorio delle statine, in particolare documentando una riduzione della proteina C reattiva ad elevata sensibilità (hs-PCR) (3, 8-10).

Vi sono dati tuttavia che indicano come anche la sola riduzione del LDL-C potrebbe contribuire in modo significativo alla riduzione dei marcatori dell'infiammazione nei pazienti trattati con statina (11). Inoltre, non è noto come i differenti trattamenti ipolipemizzanti (statine nei confronti delle terapie ipolipemizzanti non

statiniche) possano modulare il processo infiammatorio alla base dell'insorgenza e dello sviluppo della placca aterosclerotica. In uno studio di Crisby e collaboratori, su 10 pazienti che venivano sottoposti ad endoarteriectomia dopo 3 mesi di trattamento con pravastatina, è stata dimostrata una riduzione sia dei linfociti contenuti nella placca che dell'accumulo di lipidi nelle arterie dei soggetti trattati rispetto ai controlli che non assumevano statina (12). In questo studio, tuttavia, non erano stati inclusi pazienti trattati con una terapia ipolipemizzante non statinica.

Scopo del nostro studio è stato quello di valutare gli effetti di differenti terapie ipolipemizzanti (statina vs farmaci non statinici) sulla composizione cellulare della placca carotidea dopo un breve periodo di trattamento di 3 mesi. In particolare, abbiamo cercato di separare il contributo della riduzione dei livelli di colesterolo (in particolare LDL-C e non HDL-C) dagli effetti indipendenti dai lipidi, sulla composizione cellulare della placca aterosclerotica e specificamente sulla concentrazione di macrofagi e di cellule muscolari lisce, componenti correlate alla stabilità della placca stessa.

Materiali e metodi

Disegno dello studio

Sono stati arruolati 60 pazienti con ipercolesterolemia (range colesterolo totale 220-300 mg/dl), mai trattati in precedenza con farmaci ipolipemizzanti che presentavano una placca carotidea sintomatica con stenosi $\geq 70\%$ per criteri NASCET (13), eleggibili per l'intervento di endoarteriectomia.

Tutti i pazienti sono stati reclutati tra i 20 e i 30 giorni dall'evento clinico (TIA o ictus) e randomizzati in 2 gruppi di tratta-

Indirizzo per la corrispondenza

Alberto Zambon

Clinica Medica 1

Dipartimento di Medicina DIMED

4° Piano Policlinico Universitario

Via Giustiniani, 2 - 35128 Padova, Italia

E-mail: alberto.zambon@unipd.it

mento. Quaranta pazienti hanno ricevuto una dose media di atorvastatina 40 mg/die (AT) e 20 pazienti hanno ricevuto colestiramina (Questran) 8 g/die in associazione a sitosterolo (Unilever) 2,5 g/die (C-S) per i 3 mesi antecedenti l'intervento di chirurgia vascolare. I pazienti sono stati sottoposti all'intervento di endoarteriectomia dopo 12 settimane \pm 2 giorni dall'inizio della terapia.

Per motivi etici, nessun gruppo ha ricevuto placebo in considerazione dell'elevato rischio cardiovascolare di questa popolazione. Questo studio è stato approvato dal comitato etico locale ed è stato registrato al sito ClinicalTrial.org (CT identificativo: NCT01053065). Tutti i pazienti hanno fornito il loro consenso informato alla partecipazione allo studio.

Analisi biochimiche

All'inizio dello studio, durante la degenza in chirurgia vascolare, i pazienti sono stati sottoposti a prelievo di sangue venoso per il dosaggio dei lipidi (CT, LDL-C, HDL-C, trigliceridi), dei marcatori dell'infiammazione (hs-PCR, IL-6, IL-8, IL-10, IL-1b, RANTES, proteina-1 chemotattica dei monociti, TNF- α , ligando del mediatore solubile CD40, CD40), e delle molecole di adesione (P selectina solubile, molecola solubile 1 di adesione all'endotelio o sVCAM-1).

I livelli sierici di IL-6, IL-8, IL-1 β , IL-10, e del TNF- α sono stati ottenuti tramite dosaggio immunocitometrico in chemiluminescenza attraverso l'analizzatore Immulite 1000 (IMMULITE; Siemens Diagnostics). P-selectina solubile, sCD40L, proteina-1 chemotattica dei monociti, sVCAM-1 e la concentrazione di RANTES sono state misurate mediante test immunoenzimatico enzyme-linked (BioSource International). Per la determinazione quantitativa dei livelli sierici di hs-PCR, C3 e C4 è stata

utilizzata la nefelometria (Behring nephelometer analyzer - Dade-Behring).

Immunoistochimica ed analisi di immagine

I campioni di endarterectomia carotidea, ottenuti dalla chirurgia vascolare, sono stati immediatamente inclusi in OCT (Tissue Tek Compound Miles Inc, USA), congelati in azoto liquido e conservati a -80°C. Per ogni campione sono state eseguite delle criosezioni seriate dello spessore di 8 μ m, distanziate una dall'altra di circa 500 μ m, in modo da valutare la regione d'interesse anche in senso longitudinale (14).

La composizione cellulare è stata analizzata utilizzando i seguenti anticorpi monoclonali: l'anticorpo SM-E7, specifico per le catene pesanti della miosina muscolare liscia (SM-MyHC 1 e SM-MyHC2) e che pertanto riconosce tutte le cellule della linea muscolare liscia (CML) (15); l'HAM-56 diretto contro i monociti-macrofagi (Dako); il CD45RO, specifico per i linfociti (Dako).

I campioni sono processati mediante immunoperossidasi. Sulle sezioni criostatizzate viene distribuito l'anticorpo primario opportunamente diluito in tampone fosfato (PBS; pH 7,4), Albumina Sierica Bovina (BSA; 1%) e siero completo (1%) previa centrifugazione al fine di rimuovere eventuali aggregati molecolari. Le sezioni vengono incubate a 37°C per 30 min. in ambiente umido.

Seguono due lavaggi in PBS e l'incubazione con l'anticorpo secondario costituito da IgG di coniglio anti-topo coniugate con perossidasi (HRP; Dako; 1:40). I nuclei sono stati evidenziati utilizzando la marcatura con bis-benzimide (Hoechst 33258, Sigma, St. Louis, Mo) e mediante colorazione con ematossilina ed eosina in sezioni adiacenti.

Le sezioni sono state osservate ed ana-

lizzate con microscopio Leica DMRE. Le immagini della regione d'interesse ad un ingrandimento di 20X, sono state registrate mediante telecamera a colori Leica DC100. L'analisi quantitativa delle diverse componenti cellulari è stata eseguita con software dedicato (Leica Qwin) secondo una metodica precedentemente validata (14, 16).

La positività alla marcatura di ciascuna popolazione cellulare è stata calcolata contando il numero di cellule, per unità di area, positive per i diversi anticorpi (SM-E7, HAM 56, CD45R0). Per ciascun anticorpo sono state analizzate tre sezioni valutando complessivamente per ciascun campione nove aree. La prevalenza relativa di ciascun tipo cellulare è stata calcolata come percentuale di cellule positive per ciascun anticorpo aggiustando per la cellularità (espressa come numero di nuclei positivi) (16).

Analisi statistica

Le variabili continue, espresse come media±deviazione standard, sono state analizzate mediante coefficiente di correlazione di Pearson e matrice delle probabilità di Bonferroni.

Alla positività dei campioni per i diversi tipi cellulari è stata applicata l'analisi della co-varianza dopo correzione per la cellularità totale della sezioni. È stato considerato significativo un valore di $p < 0,05$. Per l'analisi statistica è stato utilizzato il sistema SPSS Statistics.

Risultati

Caratteristiche della popolazione ed effetti del trattamento ipolipemizzante sul profilo lipidico

I pazienti randomizzati al trattamento con atorvastatina (AT) e quelli alla terapia

con colestiramina-sitosterolo (C-S) non differivano significativamente all'arruolamento per grado di stenosi carotidea, età, sesso, pressione arteriosa, glicemia e livelli plasmatici di CT, LDL-C, HDL-C e TG (*Tabella 1*).

Tutti i pazienti erano in terapia con antiaggreganti piastrinici (acido acetil-salicilico o ticlopidina). Dopo tre mesi di trattamento, i valori di CT, LDL-C e non HDL-C erano significativamente ridotti in ambedue i gruppi rispetto ai livelli basali (tabella; $p < 0,001$ per tutti).

I valori di pressione arteriosa non si sono modificati durante il periodo di trattamento.

La diminuzione dei livelli di CT, LDL-C e non HDL-C è risultata significativamente minore nel gruppo C-S rispetto al gruppo AT; non sono state osservate differenze significative tra i due gruppi alla fine del periodo di studio per quanto riguarda i livelli di trigliceridi.

Non sono stati segnalati eventi avversi o effetti collaterali maggiori in entrambi i regimi ipocolesterolemizzanti.

Effetti del trattamento sui marcatori circolanti dell'infiammazione

I livelli plasmatici di PCR determinati con metodo ad alta sensibilità non differivano significativamente nei due gruppi (AT e C-S) all'arruolamento e risultavano tali anche dopo 3 mesi di trattamento (*Tabella 1*).

I livelli di citochine infiammatorie IL-6, IL-8, CD40 e TNF- α non differivano significativamente nei due gruppi al basale. I due diversi regimi terapeutici non hanno modificato significativamente i livelli di citochine con l'eccezione del TNF- α che si riduce maggiormente ed in modo significativo nel gruppo AT.

Anche i livelli di complementemia (C3-C4) e di altri marcatori dell'infiamma-

zione, come RANTES e le selectine, non sono stati modificati dai diversi regimi terapeutici (dati non riportati).

Composizione cellulare e morfometrica della placca carotidea

Nelle sezioni di placche carotee ottenute dopo endoarteriectomia è stata rilevata una significativa riduzione dell'accumulo dei macrofagi nel gruppo AT rispetto

al gruppo C-S (rispettivamente $8,2 \pm 6,5$ vs $21,0 \pm 14,6\%$ di area della placca, $p < 0,001$, dati non presentati).

Il trend opposto è stato osservato per le CML contenute nella placca aterosclerotica. Infatti è stato rilevato un numero significativamente più alto di CML nei campioni del gruppo AT rispetto al gruppo C-S ($10,9 \pm 9,4$ vs $5,1 \pm 5,26\%$ di area della placca, $p = 0,029$).

Tabella I - Parametri clinici e biomorali (basali e Δ) della popolazione studiata.

	Sitosterolo + Colestiramina (n=20)	Atorvastatina (n=40)	P
Età (anni)	79,4 \pm 4,5	78,7 \pm 5,0	NS (0,622)
Maschi (nr.)	11	18	NS (0,404)
PA sistolica (mmHg)	142 \pm 16	144 \pm 16	NS (0,633)
Δ PA sistolica (mmHg)	-9 \pm 12	-8 \pm 11	NS (0,725)
PA diastolica (mmHg)	81 \pm 12	81 \pm 11	NS (0,788)
Δ PA diastolica (mmHg)	-3 \pm 9	-4 \pm 8	NS (0,635)
Colesterolo totale (mg/dl)	263 \pm 17	270 \pm 35	NS (0,400)
Δ colesterolo totale (mg/dl)	-23 \pm 18	-57 \pm 22	<0,0005
LDL-C (mg/dl)	188 \pm 22	194 \pm 44	NS (0,546)
Δ LDL-C (mg/dl)	-17 \pm 16	-52 \pm 27	<0,0005
HDL-C (mg/dl)	49 \pm 11	52 \pm 18	NS (0,372)
Δ HDL-C (mg/dl)	0,3 \pm 5,3	-2,4 \pm 7,1	NS (0,159)
Non HDL-C (mg/dl)	215 \pm 20	218 \pm 47	NS (0,790)
Δ non HDL-C (mg/dl)	-23 \pm 19	-55 \pm 25	<0,0005
Trigliceridi (mg/dl)	143 \pm 76	124 \pm 54	NS (0,273)
Δ Trigliceridi (mg/dl)	-25 \pm 49	-9 \pm 44	NS (0,231)
hs-PCR (mg/L)	3,34 \pm 2,00	3,73 \pm 3,47	NS (0,653)
Δ hs-PCR (mg/L)	-1,52 \pm 2,61	-1,26 \pm 3,55	NS (0,774)
IL-6 (pg/ml)	3,6 \pm 2,4	7,1 \pm 15,2	NS (0,328)
Δ IL-6 (pg/ml)	-0,8 \pm 2,7	-3,5 \pm 15,4	NS (0,463)
TNF- α (pg/ml)	8,01 \pm 3,09	8,94 \pm 4,73	NS (0,438)
Δ TNF- α (pg/ml)	1,68 \pm 9,81	-2,83 \pm 5,19	0,025
CD40 (ng/ml)	1,75 \pm 1,23	3,59 \pm 2,73	0,007
Δ CD40 (ng/ml)	-0,22 \pm 2,01	0,82 \pm 3,50	NS (0,237)

Per le variabili continue è riportata la media \pm DS. PA: pressione arteriosa, Non HDL-C = colesterolo totale - HDL-C. hs-PCR, PCR ad alta sensibilità; CD-40, ligando del mediatore solubile CD40. Δ = dati al follow-up - valori all'arruolamento. Pearson χ^2 per le variabili categoriche e t-test per le variabili continue.

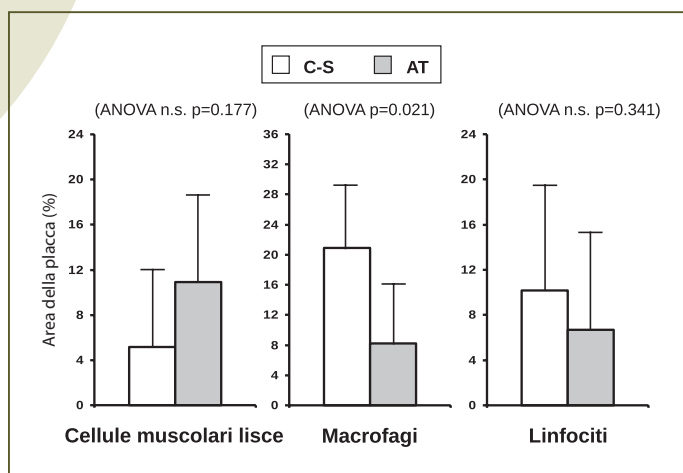


Figura 1 - Composizione cellulare della placca carotidea dopo 3 mesi di trattamento ipocolesterolemizzante. Le placche dei pazienti in terapia con atorvastatina (AT) hanno mostrato un contenuto significativamente minore di macrofagi e un maggior numero di cellule muscolari lisce, seppur non significativo, rispetto ai soggetti in trattamento con colestiramina più sitosterolo (C-S). Nessuna differenza è stata osservata per quanto riguarda i linfociti. La cellularità è espressa come percentuale di area di placca positiva ad uno specifico anticorpo monoclonale normalizzata per la nuclearità. ANOVA aggiustata per i livelli di non HDL-C al follow-up.

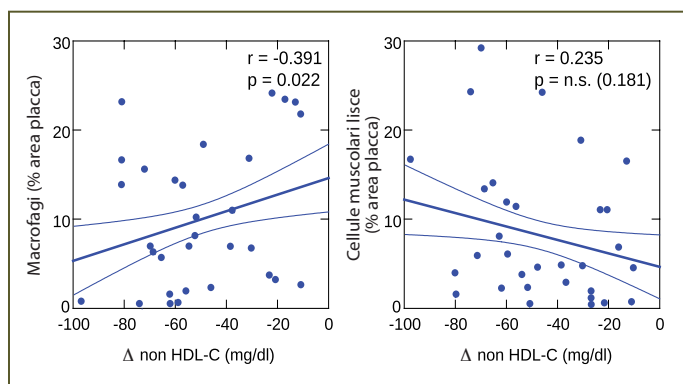


Figura 2 - Correlazione univariata tra i cambiamenti di non HDL-C e la cellularità della placca aterosclerotica carotidea. Il pannello di sinistra mostra come il numero dei macrofagi sia progressivamente minore tanto più marcata è la diminuzione dei livelli di non HDL-C. Viceversa le cellule muscolari lisce mostrano un trend diretto con il decremento dei valori di non HDL-C: quanto più si riduce il non HDL-C tanto più elevato è il numero di cellule muscolari lisce nella placca. La cellularità è espressa come percentuale di area di placca positiva ad uno specifico anticorpo monoclonale normalizzata per la nuclearità. I cambiamenti di non HDL-C sono stati calcolati come valore al follow-up meno il valore iniziale.

In considerazione del diverso impatto dei due regimi terapeutici sull'assetto lipidico, l'analisi è stata aggiustata per i cambiamenti dei livelli di LDL-C e non HDL-C in corso di terapia. In particolare, dopo correzione per il cambiamento dei livelli di non-HDL-C, la differenza del contenuto in macrofagi è rimasta significativa tra i due gruppi di trattamento ($p=0,021$; *Figura 1*), mentre la differenza di CML, pur rimanendo evidente, non raggiungeva la significatività ($p=0,177$). La concentrazione di linfociti e il contenuto di lipidi nella placca è risultato simile nei 2 gruppi (rispettivamente $p=0,341$ e $p=0,842$).

La regressione lineare ha mostrato una significativa correlazione inversa tra la diminuzione dei livelli di non HDL-C e il contenuto di macrofagi nella placca ($p=0,022$, $r=-0,391$) ed una relazione diretta con il contenuto di CML sebbene non significativa ($r=0,235$, $p=0,181$) (*Figura 2*).

L'analisi lineare multivariata ha mostrato che le variabili coinvolte nella determinazione del numero di macrofagi nella placca aterosclerotica dopo trattamento ipocolesterolemizzante erano principalmente i valori di pressione arteriosa, i valori di non HDL-C, e i parametri di infiammazione, in particolare i livelli plasmatici di CD40 (*Figura 3a*).

Variazioni in corso di trattamento ipolipemizzante di questi tre parametri riescono a spiegare quasi il 50% delle differenze nel contenuto in macrofagi della placca carotidea (R^2 aggiustato =47,6%; *Figura 3a*). Inserendo i valori di C-LDL nella regressione, al posto del non HDL-C, si otteneva un risultato simile anche se modestamente inferiore (R^2 aggiustato =43,7%; *Figura 3b*).

Discussione

In questo studio abbiamo dimostrato che un breve periodo di trattamento con

statina è più efficace di un trattamento ipolipemizzante non basato su statine nel ridurre il contenuto di macrofagi nella placca aterosclerotica carotidea e che tale effetto è in parte modulato dalla riduzione

dei livelli lipidici, in particolare del non HDL-C, e in parte imputabile a meccanismi anti-infiammatori verosimilmente peculiari del trattamento con statina e raggruppati nella definizione di effetti pleiotropici.

Come atteso, una maggior riduzione dei livelli dei lipidi plasmatici, come osservato nel gruppo AT, si è accompagnata ad un più rilevante rimodellamento della placca in termini di cellularità.

Lo studio MIRACL ha mostrato che un trattamento precoce e intensivo di soli 4 mesi con atorvastatina 80 mg/die è stato in grado di ridurre il rischio di nuovi eventi ischemici in pazienti con sindrome coronarica acuta (4).

Nel nostro studio abbiamo dimostrato che il trattamento con atorvastatina promuove una maggiore riduzione di macrofagi nella placca aterosclerotica e che tale riduzione è correlata al grado di riduzione del LDL-C e in misura ancora maggiore dei valori di non HDL-C, suggerendo un effetto dose-dipendente della statina attraverso la riduzione dei livelli dei lipidi plasmatici sulla stabilizzazione della placca carotidea. Questo può essere uno dei meccanismi fisiopatologici alla base degli effetti benefici osservati nello studio MIRACL.

L'attivazione dei macrofagi comporta un aumento delle metalloproteinasi e di specie reattive dell'ossigeno che sono in grado di ridurre l'integrità del cappuccio fibroso della placca rendendola instabile e aumentando il rischio di rottura. Sembra quindi che la riduzione del numero di macrofagi nella lesione aterosclerotica, mediante la terapia con statina, rappresenti un importante fattore promuovente l'integrità della placca stessa.

Infine, in accordo con lo studio di Crisby et al. (12), abbiamo osservato un aumento del numero di CML nella placca. Questo dato conferma che una terapia con

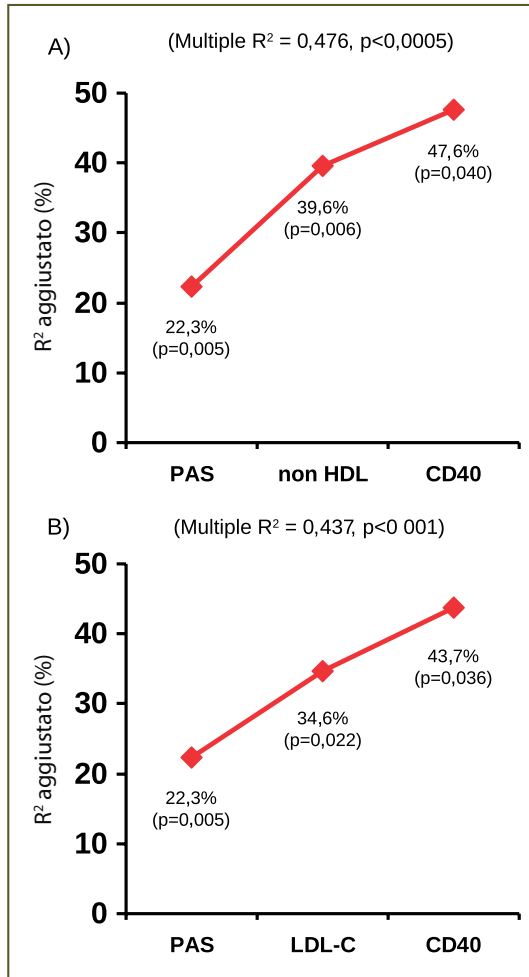


Figura 3 - Regressione lineare multipla dei predittori del contenuto di macrofagi nella placca aterosclerotica carotidea (best fit model). A) L'analisi lineare multivariata ha mostrato che le principali variabili coinvolte nella determinazione del numero di macrofagi nella placca aterosclerotica dopo trattamento ipocolesterolemizzante erano i valori di pressione arteriosa (specie la sistolica, PAS), i livelli di non HDL-C e i parametri di infiammazione, in particolare i livelli plasmatici di CD40, alla fine dello studio. B) Regressione multivariata con valori di LDL-C in sostituzione di non HDL-C.

statina, anche di durata relativamente breve, favorisce la stabilizzazione della placca aterosclerotica.

Uno studio su pazienti sottoposti a chirurgia vascolare e trattati prima dell'intervento con fluvastatina, supporta l'ipotesi che la stabilità della placca può essere ottenuta anche in un breve periodo di tempo (mediana 37 giorni), sebbene resti dibattuto il rispettivo contributo della riduzione del colesterolo LDL e degli effetti anti-infiammatori (17).

Esistono pochi studi prospettici che hanno analizzato l'efficacia della terapia con statine (in particolare pravastatina e atorvastatina) nel modulare la composizione cellulare della placca, e tali studi non hanno incluso un gruppo di controllo trattato con farmaci ipolipemizzanti non statinici (12, 18-20).

Altri studi retrospettivi hanno portato a risultati non univoci sull'effetto della statina sulla composizione cellulare della placca carotidea (20-23).

Il confronto dei nostri dati con precedenti studi non risulta facilmente attuabile sia per il diverso disegno dello studio sia perché i nostri pazienti non erano mai stati in precedenza sottoposti a terapia ipolipemizzante.

I nostri dati confermano che sia la terapia con sitosterolo-colestiramina che con statina sono in grado di ridurre significativamente i livelli di CT, LDL-C e di non HDL-C dopo 3 mesi di trattamento, sebbene l'effetto maggiore, come prevedibile, si sia ottenuto nel gruppo AT. Un dato interessante che emerge dalle nostre osservazioni è che anche correggendo i dati sulla cellularità della placca carotidea per i livelli di non HDL-C la differenza del contenuto di macrofagi nella placca tra i due gruppi rimaneva significativa (*Figura 1*).

Abbiamo utilizzato il parametro del non HDL-C in quanto meglio questo riflette il

numero totale di lipoproteine aterogene nel plasma: lipoproteine a bassissima densità, VLDL, lipoproteine a densità intermedia, IDL ed LDL. Inoltre il non HDL-C correla in modo significativo con i livelli plasmatici di apolipoproteina B, il più accurato predittore di rischio cardiovascolare a nostra disposizione. Già i primi studi sulla vasculopatia carotidea (24, 25) avevano suggerito l'importanza delle lipoproteine ricche in trigliceridi (appunto VLDL ed IDL) nella progressione della placca aterosclerotica. Il nostro studio conferma in tal senso la rilevanza fisiopatologica delle lipoproteine ricche in TG in aggiunta alla classica colesterolemia LDL.

A conferma della suo ruolo fisiopatologico nei processi aterotrombotici, il non HDL-C è definito come target secondario (secondo solo al LDL-C) nelle più recenti linee guida europee sul trattamento delle dislipidemie (26) e fornisce una più accurata stima del rischio di eventi CV rispetto al LDL-C in particolare in pazienti con ipertrigliceridemia, nei diabetici, nei pazienti con sindrome metabolica e con insufficienza renale cronica come messo chiaramente in luce da una recente meta-analisi di 14 trial con statina, sette con fibrati e sei studi con acido nicotinico (27).

Dai dati presentati in questo studio viene confermato quindi il ruolo significativo che le modificazioni del profilo lipidico in corso di terapia ipolipemizzante esercitano sulle caratteristiche istologiche della placca carotidea ed in particolare sul contenuto di macrofagi. Negli anni passati, molti studi in vitro e in modelli animali hanno ipotizzato la presenza dei cosiddetti effetti pleiotropici delle statine (7).

I principali effetti antiaterogeni sulla placca apparentemente non correlati all'effetto sui lipidi plasmatici includono gli effetti protettivi sulla disfunzione endoteliale, sull'attivazione piastrinica ed i mec-

canismi di formazione del trombo e più in generale sui processi infiammatori coinvolti nella patogenesi dell'aterotrombosi.

Questi effetti riconoscono tuttavia lo stesso meccanismo fisiopatologico che porta alla riduzione della colesterolemia plasmatica, ed in particolare sono correlati all'inibizione nella cascata biosintetica del mevalonato derivante dall'inibizione della HMG-CoA reduttasi, che comporta una riduzione della produzione di isoprenoidi e all'inibizione della via della kinasi Rho/Rho. Questo meccanismo comune che è alla base sia degli effetti ipolipemizzanti sia degli effetti pleiotropici delle statine è supportato da una meta-analisi di Kinley (11) che mette in chiara evidenza come la maggior parte degli effetti anti-infiammatori della terapia ipolipemizzante sia correlata direttamente alla diminuzione dei valori plasmatici di LDL-C.

Il reclutamento dei macrofagi nella placca aterosclerotica rappresenta il meccanismo fisiopatologico che sta alla base dell'iniziale processo di formazione della placca, della sua progressione e delle complicanze. I nostri risultati che mostrano una riduzione del numero di macrofagi nelle lesioni aterosclerotiche in seguito alla terapia con statine, sono in accordo con precedenti studi nell'uomo ed in modelli animali (18, 28, 29). Non abbiamo osservato un cambiamento del numero di linfociti nella placca. Questo significa che un breve periodo di terapia ipolipemizzante non comporta verosimilmente alterazioni della risposta immunitaria adattativa, tuttavia può implicare una modificazione della risposta immunitaria innata. Non è ancora certo se un trattamento a lungo termine con statine sia in grado di indurre una riduzione del numero di macrofagi seguita da un'analogia riduzione del numero di linfociti, come suggerito dal trend riportato in *figura 1*.

Precedenti studi clinici hanno dimostrato che il trattamento con statina, anche per un breve periodo, può diminuire i livelli circolanti di molecole infiammatorie (9, 30, 31). Nel nostro studio non abbiamo osservato un effetto significativo del trattamento ipolipemizzante sui livelli di molteplici molecole dell'infiammazione, inclusa la hs-PCR. L'assenza di tale effetto può essere dovuto alla relativa bassa numerosità del nostro campione rispetto al grande numero di pazienti reclutati in altri studi clinici che non si erano proposti lo studio della cellularità della placca.

I nostri dati, tuttavia, suggeriscono che la riduzione del numero dei macrofagi osservata nei pazienti trattati con statina può precedere le modifiche dello stato infiammatorio sistemico.

Una potenziale limitazione dello studio è legata alla limitata numerosità della serie studiata. In particolare, per confermare il riscontro che la composizione cellulare della placca ateromasica carotidea, e di riflesso la sua stabilità, è modulata sia dalla modificazione del profilo lipidico plasmatico sia da meccanismi in apparenza indipendenti dalla riduzione della colesterolemia sia LDL che più specificamente non-HDL, servirebbe una popolazione con numerosità più elevata rispetto a quella presentata nel nostro studio. Va tuttavia considerato che lo studio di una popolazione più ampia potrebbe essere problematico alla luce del fatto che le linee guida attuali rendono difficile reclutare una popolazione di pazienti ad alto rischio cardiovascolare e non ancora in terapia ipolipemizzante.

Conclusioni

La composizione cellulare della placca aterosclerotica, ed in definitiva la stabilità della placca stessa, è significativamente

modificata da poche settimane di terapia ipolipemizzante. La riduzione del contenuto in macrofagi è significativamente correlata alle variazioni dell'assetto lipidico in corso di terapia ipolipemizzante ed in particolare alla riduzione dei livelli di non HDL-C.

Gli effetti antinfiammatori e pleiotropici della terapia con statina contribuiscono anch'essi in modo significativo alla stabilizzazione della placca aterosclerotica carotidea caratterizzando l'efficacia della terapia con statina rispetto ad un trattamento ipocolesterolemizzante non statinico. Questi dati supportano le attuali linee guida che indicano target progressivamente più bassi di non HDL-C in relazione all'aumentare del rischio cardiovascolare individuale.

Glossario

AT: atorvastatina

C-S: colestiramina-sitosterolo

CML: cellula muscolare liscia

CD40L: ligando del mediatore solubile CD40

HMG-CoA reduttasi: idrossimetilglutaril-CoA reduttasi

hs-PCR: proteina C reattiva ad elevata sensibilità

IL-6: interleuchina-6

IL-8: interleuchina-8

RANTES: "regulated on activation, normal T cell expressed and secreted" o chemochina CCL5

TNF- α : fattore di necrosi tumorale α

VCAM-1: molecola di adesione cellulare vascolare

RIASSUNTO

Lo studio ha analizzato l'effetto sulla composizione cellulare della placca aterosclerotica carotidea della terapia con statine rispetto ad un trattamento ipocolesterolemizzante non basato sull'utilizzo di statina (colestiramina più sitosterolo).

Metodi. Sono stati valutati 60 pazienti ipercolesterolemici (colesterolo totale - CT 220-300 mg/dl), mai trattati in precedenza con statine, candidati all'intervento di endoarteriectomia carotidea per la presenza di stenosi sintomatica. Tre mesi prima dell'intervento i pazienti sono stati randomizzati in due gruppi: un gruppo ha ricevuto atorvastatina (AT, dose media 40 mg/die, n=40); un altro gruppo colestiramina 8 gr/die + sitosterolo 2,5 gr/die (C-S, n=20). L'analisi della composizione cellulare è stata eseguita sui campioni tessutali di endoarteriectomia carotidea.

Risultati. Ambedue i trattamenti ipocolesterolemizzanti hanno comportato una riduzione significativa di CT e LDL-C, benché la diminuzione sia stata di minore entità nel gruppo C-S rispetto al gruppo AT (rispettivamente CT -23 mg/dl vs -57 mg/dl e LDL-C -17 mg/dl vs -52 mg/dl, $p < 0,0005$). I regimi terapeutici non hanno influenzato i livelli circolanti dei marcatori d'infiammazione (inclusa hs-PCR). Il contenuto in macrofagi è risultato significativamente minore nelle placche del gruppo AT rispetto al gruppo C-S (rispettivamente 8,2% vs 20,9% dell'area di placca, $p < 0,05$). Queste differenze rimanevano significative dopo aggiustamento per la variazione dei livelli di colesterolo non-HDL (non HDL-C) al follow-up. Il contenuto di cellule muscolari lisce è risultato maggiore nel gruppo AT (rispettivamente 10,9 vs 5,1% area placca nei C-S) e tale differenza, pur rimanendo evidente, non raggiungeva la significatività dopo aggiustamento per non HDL-C. Non sono state osservate differenze significative tra i trattamenti per quanto riguarda il numero di linfociti. È emersa una correlazione inversa tra le modificazioni dei livelli di non HDL-C e il contenuto in macrofagi delle placche carotidee ($r = -0,391$, $p = 0,022$), e una correlazione diretta ai limiti della significatività tra non HDL-C ed il contenuto in cellule muscolari lisce ($r = 0,235$, $p = 0,181$).

Conclusioni. Un trattamento a breve termine con statina a dosaggi intermedi è risultato più efficace rispetto ad un trattamento ipolipemizzante non statinico nel ridurre il contenuto di macrofagi nelle lesioni aterosclerotiche. Tale effetto è solo in parte attribuibile al grado di riduzione del colesterolo, ed in particolare del non HDL-C, in corso di terapia, supportando l'ipotesi di un effetto pleiotropico peculiare del trattamento con statina rispetto ad un trattamento ipolipemizzante non statinico.

Parole chiave: Aterosclerosi, arterie carotidi, lipidi, statine, macrofagi, endoarteriectomia.

Bibliografia

1. Grundy SM, Cleeman JI, Merz CN, Brewer HB Jr., Clark LT, Hunninghake DB, et al. A summary of implications of recent clinical trials for the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III guidelines. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004; 24: 1329-1330.
2. LaRosa JC, Grundy SM, Waters DD, Shear C, Barter P, Fruchart JC, et al. Intensive lipid lowering with atorvastatin in patients with stable coronary disease. *N Engl J Med.* 2005; 352: 1425-1435.
3. Ridker PM, Danielson E, Fonseca FA, Genest J, Gotto AM, Jr., Kastelein JJ, et al. Rosuvastatin to prevent vascular events in men and women with elevated C-reactive protein. *N Engl J Med.* 2008; 359: 2195-2207.
4. Schwartz GG, Olsson AG, Ezekowitz MD, Ganz P, Oliver MF, Waters D, et al. Effects of atorvastatin on early recurrent ischemic events in acute coronary syndromes: the MIRACL study: a randomized controlled trial. *Jama.* 2001; 285: 1711-1718.
5. Patti G, Pasceri V, Colonna G, Miglionico M, Fischetti D, Sardella G, et al. Atorvastatin pretreatment improves outcomes in patients with acute coronary syndromes undergoing early percutaneous coronary intervention: results of the ARMYDA-ACS randomized trial. *J Am Coll Cardiol.* 2007; 49: 1272-1278.
6. Amarencu P, Bogousslavsky J, Callahan A, 3rd, Goldstein LB, Hennerici M, Rudolph AE, et al. High-dose atorvastatin after stroke or transient ischemic attack. *N Engl J Med.* 2006; 355: 549-559.
7. Ray KK, Cannon CP. The potential relevance of the multiple lipid-independent (pleiotropic) effects of statins in the management of acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol.* 2005; 46: 1425-1433.
8. Albert MA, Danielson E, Rifai N, Ridker PM. Effect of statin therapy on C-reactive protein levels: the pravastatin inflammation/CRP evaluation (PRINCE): a randomized trial and cohort study. *Jama.* 2001; 286: 64-70.
9. Kinlay S, Schwartz GG, Olsson AG, Rifai N, Leslie SJ, Sasiela WJ, et al. High-dose atorvastatin enhances the decline in inflammatory markers in patients with acute coronary syndromes in the MIRACL study. *Circulation.* 2003; 108: 1560-1566.
10. McCarey DW, McInnes IB, Madhok R, Hampson R, Scherbakov O, Ford I, et al. Trial of Atorvastatin in Rheumatoid Arthritis (TARA): double-blind, randomised placebo-controlled trial. *Lancet.* 2004; 363: 2015-2021.
11. Kinlay S. Low-density lipoprotein-dependent and - independent effects of cholesterol-lowering therapies on C-reactive protein: a meta-analysis. *J Am Coll Cardiol.* 2007; 49: 2003-2009.
12. Crisby M, Nordin-Fredriksson G, Shah PK, Yano J, Zhu J, Nilsson J. Pravastatin treatment increases collagen content and decreases lipid content, inflammation, metalloproteinases, and cell death in human carotid plaques: implications for plaque stabilization. *Circulation.* 2001; 103: 926-933.
13. Barnett HJ, Taylor DW, Eliasziw M, Fox AJ, Ferguson GG, Haynes RB, et al. Benefit of carotid endarterectomy in patients with symptomatic moderate or severe stenosis. North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial Collaborators. *N Engl J Med.* 1998; 339: 1415-1425.
14. Pauletto P, Puato M, Faggini E, Santipolo N, Pagliara V, Zoleo M, et al. Specific cellular features of atheroma associated with development of neointima after carotid endarterectomy: the carotid atherosclerosis and restenosis study. *Circulation.* 2000; 102: 771-778.
15. Sartore S, Chiavegato A, Franch R, Faggini E, Pauletto P. Myosin gene expression and cell phenotypes in vascular smooth muscle during development, in experimental models, and in vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997; 17: 1210-1215.
16. Puato M, Faggini E, Rattazzi M, Paterni M, Kozakova M, Palombo C, et al. In vivo non-invasive identification of cell composition of intimal lesions: a combined approach with ultrasonography and immunocytochemistry. *J Vasc Surg.* 2003; 38: 1390-1395.
17. Schouten O, Boersma E, Hoeks SE, Benner R, van Urk H, van Sambeek MR, et al. Fluvastatin and perioperative events in patients undergoing vascular surgery. *N Engl J Med.* 2009; 361: 980-989.

18. Martin-Ventura JL, Blanco-Colio LM, Gomez-Hernandez A, Munoz-Garcia B, Vega M, Serrano J, et al. Intensive treatment with atorvastatin reduces inflammation in mononuclear cells and human atherosclerotic lesions in one month. *Stroke*. 2005; 36: 1796-1800.
19. Cortellaro M, Cofrancesco E, Arbustini E, Rossi F, Negri A, Tremoli E, et al. Atorvastatin and thrombogenicity of the carotid atherosclerotic plaque: the ATROCAP study. *Thromb Haemost*. 2002; 88: 41-47.
20. Puato M, Zambon A, Faggin E, Rattazzi M, Pauletto P. Statin treatment and carotid plaque composition. Review of clinical studies. *Curr Vasc Pharmacol*. Oct 17.
21. Verhoeven BA, Moll FL, Koekkoek JA, van der Wal AC, de Kleijn DP, de Vries JP, et al. Statin treatment is not associated with consistent alterations in inflammatory status of carotid atherosclerotic plaques: a retrospective study in 378 patients undergoing carotid endarterectomy. *Stroke*. 2006; 37: 2054-2060.
22. Koutouzis M, Nomikos A, Nikolidakis S, Tzavara V, Andrikopoulos V, Nikolaou N, et al. Statin treated patients have reduced intraplaque angiogenesis in carotid endarterectomy specimens. *Atherosclerosis*. 2007; 192: 457-463.
23. Kunte H, Amberger N, Busch MA, Ruckert RI, Meiners S, Harms L. Markers of instability in high-risk carotid plaques are reduced by statins. *J Vasc Surg*. 2008; 47: 513-522.
24. Hodis HN, Mack WJ, Dunn M, Liu C, Liu C, Selzer RH, et al. Intermediate-density lipoproteins and progression of carotid arterial wall intima-media thickness. *Circulation*. 1997; 95: 2022-2026.
25. Hodis HN, Mack WJ, LaBree L, Selzer RH, Liu C, Liu C, et al. Reduction in carotid arterial wall thickness using lovastatin and dietary therapy: a randomized controlled clinical trial. *Ann Intern Med*. 1996; 124: 548-556.
26. Reiner Z, Catapano AL, De Backer G, Graham I, Taskinen MR, Wiklund O, et al. ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: the Task Force for the management of dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Atherosclerosis Society (EAS). *Eur Heart J*. 2011; 32: 1769-1818.
27. Robinson JG, Wang S, Smith BJ, Jacobson TA. Meta-analysis of the relationship between non-high-density lipoprotein cholesterol reduction and coronary heart disease risk. *J Am Coll Cardiol*. 2009; 53: 316-322.
28. Sukhova GK, Williams JK, Libby P. Statins reduce inflammation in atheroma of nonhuman primates independent of effects on serum cholesterol. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002; 22: 1452-1458.
29. Cuccurullo C, Iezzi A, Fazio ML, De Cesare D, Di Francesco A, Muraro R, et al. Suppression of RAGE as a basis of simvastatin-dependent plaque stabilization in type 2 diabetes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006; 26: 2716-2723.
30. Ridker PM, Rifai N, Lowenthal SP. Rapid reduction in C-reactive protein with cerivastatin among 785 patients with primary hypercholesterolemia. *Circulation*. 2001; 103: 1191-1193.
31. Rattazzi M, Puato M, Faggin E, Bertipaglia B, Zambon A, Pauletto P. C-reactive protein and interleukin-6 in vascular disease: culprits or passive bystanders? *J Hypertens*. 2003; 21: 1787-1803.