

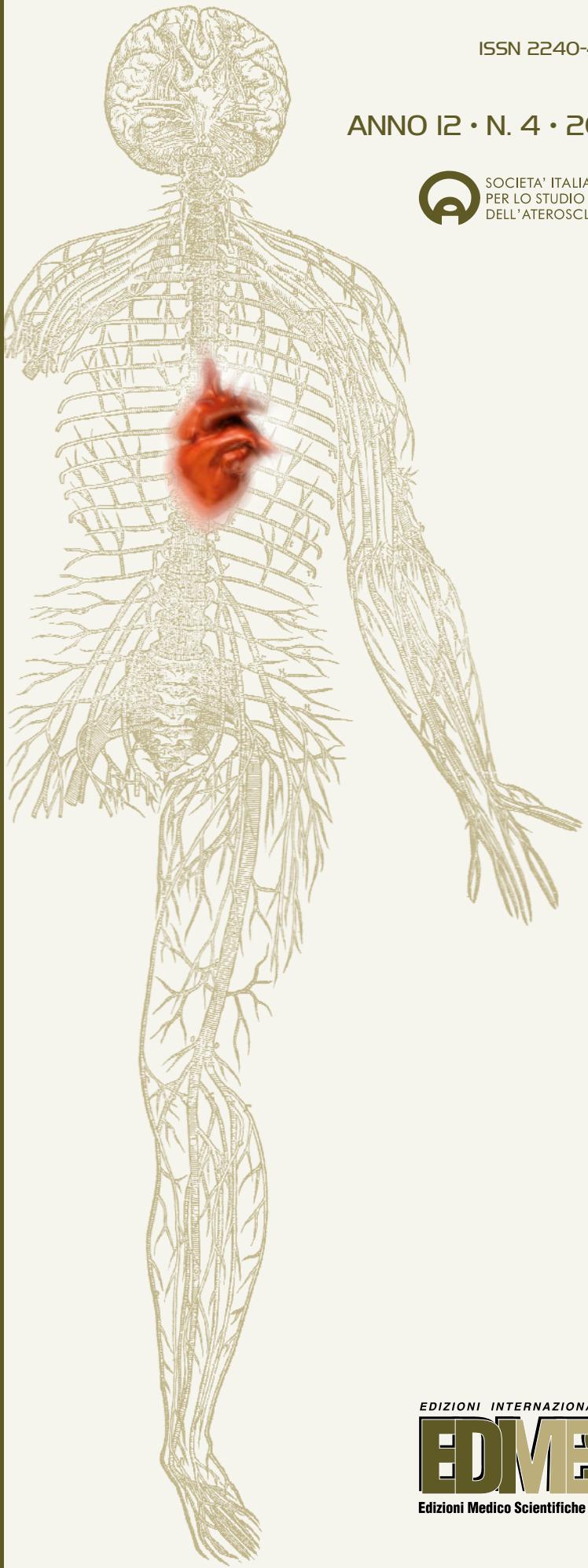
GIORNALE ITALIANO dell'ARTERIOSCLEROSI

ISSN 2240-4821

ANNO 12 • N. 4 • 2021



SOCIETÀ ITALIANA
PER LO STUDIO
DELL'ATEROSCLEROSI



EDIZIONI INTERNAZIONALI srl

EDMES

Edizioni Medico Scientifiche - Pavia



Rivista ufficiale della Società Italiana
per lo Studio dell'Aterosclerosi (SISA)

Direttori emeriti

M. Averna
G. Crepaldi
R. Fellin
E. Mannarino
E. Manzato
A. Mezzetti
G.F. Salviovi
A. Ventura

Direttore scientifico

M. Arca (Roma)

Editore
L. Cattin (Trieste)

Vice Editore
F. Angelico (Roma)

Responsabili di area

Review e Linee Guida – D. Sommariva (Milano)
Ricerca e Farmacologia – G.D. Norata (Milano)
Studi Clinici – M. Pirro (Perugia)
Epidemiologia – S. Panico (Napoli)

Comitato di Redazione

A. Baragetti (Milano)
C.M. Barbagallo (Palermo)
A. Belfiore (Bari)
F. Bonacina (Milano)
M. Casula (Milano)
M. Del Ben (Roma)
O. Guardamagna (Torino)
M.R. Mannarino (Perugia)
T. Montalcini (Catanzaro)
L. Pisciotta (Genova)
A. Poli (Milano)
T. Sampietro (Pisa)
R. Sarzani (Ancona)
G.B. Vigna (Ferrara)
A. Zambon (Padova)

Segreteria editoriale

V. Flores d'Arcais
E. Loggia
R. Zecca
Via Balzaretti, 7 - 20133 Milano
E-mail: giornalearteriosclerosi@sisa.it

In copertina: De Humani Corporis Fabrica
di Andreas Vesalius (Basilea, 1543)

Anno 12 • N. 4 • 2021

SOMMARIO

FISIOPATOLOGIA DELL'ATEROSCLEROSI PCSK9 oltre il fegato: Focus su Pancreas, Cuore

e Sistema nervoso 5

**PCSK9 beyond the liver: focus on Pancreas, Heart
and Nervous System**

Lorenzo Da Dalt, Giuseppe Danilo Norata

FARMACOGENETICA

**Dagli studi real-world alla farmacogenetica:
obiettivi attuali e futuri nella gestione della dislipidemia
nel paziente con diabète** 15

**From Real-World to Pharmacogenetic Studies:
Current and Future Needs in Dyslipidemia Management
in Patients with Diabetes**

*Mario Luca Morieri, Gian Paolo Fadini, Alessandro Doria,
Angelo Avogaro*

AFERESI

Aferesi lipoproteica e PCSK9i: quale integrazione? 30

**Lipoprotein Apheresis and PCSK9inhibitors:
which integration?**

Maria Grazia Zenti

MEDICINA, SCIENZA E SOCIETÀ

Legge IBO quarant'anni dopo. Un cambiamento senza fine 36

Law IBO forty years later. An endless change

Peppé Dell'Acqua

NOTIZIE DA CONGRESSI INTERNAZIONALI

European Society of Cardiology (ESC) 2021 41

Manuela Casula

Riassunto delle comunicazioni presentate

al 35° Congresso Nazionale S.I.S.A. 49

Indice degli Autori

EDIZIONI INTERNAZIONALI srl

EDIMES
Edizioni Medico Scientifiche - Pavia

Edizioni Internazionali srl

Divisione EDIMES
EDIZIONI MEDICO SCIENTIFICHE - PAVIA
Via Riviera 39 - 27100 Pavia
Tel. 0382526253 r.a. - Fax 0382423120
E-mail: edint.edimes@tin.it

GIORNALE ITALIANO dell'ARTERIOSCLEROSI



Consiglio Direttivo SISA

Marcello Arca - Presidente
Carlo M. Barbagallo
Anna Belfiore
Marco Bucci
Giulia Chiesa
Giuliana Fortunato
Luigi Gentile
Patrizia Tarugi
Maria Grazia Zenti
Enzo Manzato - Past President
Matteo Pirro - Segretario

Presidenti Sezioni Regionali SISA

Francesco Cipollone (Adriatica)
Piero Portincasa (Appulo-Lucana)
Arcangelo Iannuzzi (Campania)
Angelina Passaro (Emilia-Romagna)
Maria Del Ben (Lazio)
Alberico L. Catapano (Lombardia)
Luigi Gentile (Piemonte-Liguria-
Valle d'Aosta)
Antonio Baule (Sardegna)
Tiziana Montalcini (Sicilio-Calabria)
Tiziana Sampietro (Toscana)
Nadia Citroni (Triveneto)
Giacomo Pucci (Umbria)



Società Italiana per lo Studio
dell'Aterosclerosi
Viale Maresciallo Pilsudski, 118
00197 Roma

Autorizzazione Trib. di Milano n. 242
del 21/09/2016

Direttore Responsabile: P. E. Zoncada

Norme editoriali

Pubblicità/Abbonamenti

Redazione GIA
Via Balzaretti, 7
20133 Milano
Tel. 0249636373
Fax 0249633384
E-mail: giornalearteriosclerosi@sisa.it

Condizioni di abbonamento

Canone per l'Italia € 65,00, per l'estero € 75,00.

Periodicità

Trimestrale

Scopi

Il "Giornale Italiano dell'Arteriosclerosi" (GIA), è un periodico di aggiornamento che nasce come servizio per i medici, operatori sanitari e studenti di medicina e delle professioni sanitarie, con l'intenzione di rendere più facilmente disponibili informazioni e revisioni critiche nel campo dell'arteriosclerosi e delle malattie ad essa correlate. Lo scopo della rivista è quello di assistere il lettore fornendogli:

- a) revisioni critiche di argomenti di grande rilevanza nel campo dell'arteriosclerosi sia per quanto riguarda gli aspetti di base che gli aspetti clinico-applicativi;
- b) quesiti relativi agli argomenti trattati per una verifica di auto apprendimento;
- c) opinioni di esperti qualificati sui nuovi sviluppi delle conoscenze sull'arteriosclerosi;
- d) lavori originali relativi ad aspetti di ricerca sanitaria nell'ambito dell'arteriosclerosi e delle malattie ad essa correlate.

TIPOLOGIA E STRUTTURA DEGLI ARTICOLI

GIA accetta le seguenti categorie di contributi: lavori originali, rassegne, casi clinici e forum dei lettori. Titolo e, se previsti, parole chiave e sommario dovranno essere sia in italiano che in inglese.

Le tabelle dovranno pervenire in formato editabile (word, excel, txt, ecc...).

Le figure dovreanno essere inviate oltre al formato originario anche in formato grafico (pdf, jpg, png, ecc...).

Lavori originali

I lavori originali saranno sottoposti a processo di "peer review". La lunghezza del testo non deve superare le 4.000 parole (esclusa la bibliografia)

ma incluso l'abstract, con un massimo di 4 figure o tabelle.

Il frontespizio dovrà contenere:

- 1) Titolo
- 2) Autori e loro affilazione
- 3) Nome e affilazione dell'autore corrispondente.

- **Sommario:** dovrà essere strutturato (premesse, obiettivi, metodi, risultati, conclusioni) e non dovrà superare le 250 parole.

- **Parole chiave:** Si raccomanda di indicare 4-6 parole chiave.

- **Testo:** Il corpo del testo dovrà comprendere: a) Introduzione b) Materiali e metodi c) Risultati d) Discussione e) Tavole f) Figure g) Bibliografia.

Bibliografia

Citazione di articoli su riviste: Es. 1: Austin MA, Hutter CM, Zimmern RL, Humphries SE. Familial hypercholesterolemia and coronary heart disease. *Am J Epidemiol* 160: 421-429, 2004. Es. 2: Humphries SE, Whittall RA, Hubbard CS et al. Genetic causes of familial hypercholesterolemia in patients in the UK: a relation to plasma lipid levels and coronary heart disease risk. *J Med Genet* 43: 943-949, 2006. Citazioni di capitoli di libri Assmann G, von Eckardstein A, Brewer H. Familial analphalipoproteinemia: Tangier disease. In "The metabolic and molecular bases of inherited disease", Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds, 8th ed. New York, McGraw-Hill, 2001; 2937-60.

Rassegne

Il frontespizio dovrà contenere:

- 1) Titolo;
- 2) Autori e loro affilazione;
- 3) Nome e affilazione dell'autore corrispondente.

La lunghezza del testo non deve superare di norma le 5.000 parole, incluso, sommario, glossario, e l'elenco puntato degli argomenti affrontati (bullet points). Il numero massimo di figure e tabelle è 5. Il numero massimo di voci bibliografiche è 50. Le rassegne devono includere in appendice un questionario di autoapprendimento relativo all'argomento affrontato nella rassegna.

- **Sommario:** non dovrà superare le 250 parole.

- **Parole chiave:** Si raccomanda di indicare 4-6 parole chiave.

- **Testo:** L'autore è invitato a suddividere la rassegna in capitoli e sotto-capitoli.

Al termine del testo è opportuno inserire un capitolo dedicato alle prospettive future con particolare riferimento agli aspetti clinico-applicativi.

Glossario: È uno strumento di comunicazione fortemente raccomandato.

Esso dovrebbe contenere una concisa ma esauriente spiegazione dei termini "nuovi o meno comuni" utilizzati nella rassegna. Qualora l'autore lo ritenga utile, al glossario può essere allegata una o più "finestre esplicative" dedicate ad argomenti a cui si fa riferimento nella rassegna e che non sono discussi in sufficiente dettaglio nel corpo del testo.

Elenco degli argomenti trattati: A conclusione della rassegna l'autore è invitato a fornire un conciso elenco puntato degli aspetti più rilevanti affrontati.

Bibliografia: Le citazioni bibliografiche dovranno essere numerate secondo l'ordine di comparsa nel testo. Le pubblicazioni citate dovranno contenere il nome di tutti gli autori (fino a un massimo di 4). Nel caso gli autori fossero più di quattro, si mette dopo il terzo autore la scritta et al.

Questionario di auto-apprendimento: Per ogni rassegna il questionario dovrà contenere 5-10 domande con risposta a scelta multipla.

Casi clinici

Si riferisce alla presentazione di un caso clinico, preparato su richiesta da medici esperti, che ha lo scopo di rafforzare standard di comportamento clinico, diagnostico e/o terapeutico, basati sulle evidenze.

Forum su Medicina, Scienza e Società

Si tratta di articoli brevi o lettere all'editore (1.500 parole) sollecitati ad esperti, riguardanti commenti e/o opinioni su temi di particolare attualità. Il testo non dovrà superare le 1.500 parole. Non è richiesto un sommario. Le voci bibliografiche non devono superare il numero di 10 e devono essere riportate come indicate per le rassegne.

NOTE PER GLI AUTORI

Il testo dell'articolo deve essere predisposto utilizzando il programma Microsoft Word per Windows o Macintosh. I dischetti devono riportare sull'apposita etichetta il nome del primo autore, il titolo abbreviato dell'articolo, il programma di scrittura e la versione, ed il nome del contenuto/file.

L'autore è tenuto ad ottenere l'autorizzazione di "Copyright" qualora riproduca nel testo tabelle, figure, microfotografie od altro materiale iconografico, già pubblicato altrove. Tale materiale illustrativo dovrà essere riprodotto con la dicitura "per concessione di..." seguito dalla citazione della fonte di provenienza.

PRESENTAZIONE DEL NUMERO

■ Fisiopatologia dell'aterosclerosi

Effetti di PCSK9 non legati al Fegato

PCSK9 interagisce con diversi recettori della famiglia LDLr, ma anche con CD36, e guida la loro degradazione lisosomiale. Oltre che nel fegato, PCSK9 è espressa in tessuti extraepatici come pancreas, cuore e cervello. La rassegna descrive gli effetti del suo deficit e dell'accumulo di lipidi nei tessuti extraepatici.

PCSK9 beyond the liver

PCSK9 interacts with several LDLr family receptors, but also with CD36, and drives their lysosomal degradation. In addition to the liver, PCSK9 is expressed in extrahepatic tissues such as the pancreas, heart and brain. The review describes the effects of its deficit and the accumulation of lipids in extrahepatic tissues.

■ Farmacogenetica

Dagli studi Real-World alla farmacogenetica nella gestione della dislipidemia nel paziente con diabete

La revisione focalizza l'attenzione sui nuovi approcci terapeutici che, combinando informazioni cliniche e genetiche, consentono di migliorare le strategie di prevenzione cardiovascolare e la risposta ai trattamenti intensivi o specifici nei pazienti con diabete.

From Real-World to pharmacogenetics in dyslipidemia management of patients with diabetes

The review focuses on new therapeutic approaches which, by combining clinical and genetic information, make it possible to improve cardiovascular prevention strategies and the response to intensive or specific treatments in patients with diabetes.

■ Aferesi

Terapia aferetica in associazione con PCSK9 inibitori nell'ipercolesterolemia familiare.

La rassegna propone un algoritmo terapeutico nei pazienti a rischio cardiovascolare alto e molto alto, in cui il dosaggio di Lp(a) risulta cruciale per l'indicazione alla LDL-aferesi. L'effetto sinergico dell'aferesi con le nuove classi di farmaci ipolipemizzanti permette di raggiungere i *target* raccomandati e di ridurre la frequenza dei trattamenti aferetici.

Lipoprotein Apheresis and PCSK9inhibitors: which integration?

The review proposes a therapeutic algorithm in patients with high and very high cardiovascular risk, in which the Lp(a) dosage is crucial for the indication of LDL-apheresis. The synergistic effect of apheresis with the new classes of lipid-lowering drugs makes it possible to reach the recommended targets and reduce the frequency of apheretic treatments.

■ Medicina scienza e società

Legge 180 quarant'anni dopo

A 40 anni dalla legge 180 niente è più come prima; il tempo non è passato invano, servizi e politiche per la salute mentale sono presenti in ogni regione e “la malattia mentale” può essere narrata con storie di persone che hanno potuto attraversare Centri di salute mentale capaci di accoglierle e accompagnarle nel percorso di ripresa.

Law 180 forty years later

Forty years after the law 180, nothing is the same as before; time has not passed in vain, mental health services and policies are present in every region and “mental illness” can be told with stories of people who have been able to go through mental health centers capable of welcoming them and accompanying them on their recovery path.

■ Notizie da Congressi Internazionali

Notizie dal congresso dell'European Society of Cardiology 2021

■ RIASSUNTO DELLE COMUNICAZIONI PRESENTATE AL 35° CONGRESSO NAZIONALE S.I.S.A.

FISIOPATOLOGIA DELL'ATEROSCLEROSI

PCSK9 OLTRE IL FEGATO: FOCUS SU PANCREAS, CUORE E SISTEMA NERVOSO

PCSK9 beyond the liver: focus on Pancreas, Heart and Nervous System

LORENZO DA DALT¹, GIUSEPPE DANILO NORATA^{1,2}

¹Department of Pharmacological and Biomolecular Sciences, Università degli Studi di Milano, Milan, Italy;

²Centro SISA per lo studio dell'Aterosclerosi, Ospedale Bassini, Cinisello Balsamo, Italy

SUMMARY

“Proprotein convertase subtilisin Kexin type 9” (PCSK9) is a 692 amino acid glycoprotein that belongs to the proprotein convertase family. PCSK9 is mainly produced by the liver and secreted into the bloodstream. PCSK9 interacts with several LDL family receptors, including VLDLr, LRP1 but also with CD36, and drives their lysosomal degradation. The observation that PCSK9 can also be produced by extrahepatic tissues has drawn attention to the possibility that its deficiency is associated with an increase in the expression of the LDLr family receptors, contributing to an increase in the accumulation of lipids in extrahepatic tissues and a change in cellular metabolism.

Key words: PCSK9, LDLR, CD36, lipoproteins, lipid metabolism, extrahepatic tissues.

PCSK9 come funziona e come viene regolata

PCSK9 è stata scoperta nel 2003 a livello neuronale e per questo inizialmente chiamata *neural apoptosis-regulated convertase* (NARC-1) e appartiene a un gruppo di proteasi seriniche che portano all'idrolizzazio-

ne dei legami peptidici. PCSK9 viene sintetizzata come proPCSK9 del peso di 75 kDa ed è composta da diverse sub-unità: un peptide segnale, un prodominio, un dominio catalitico, una regione cerniera esposta e un dominio C-terminale arricchito in cisteina e istidina (1). Il peptide segnale funziona da guida per PCSK9 e la indirizza al reticolo endoplasmatico dove proPCSK9 subisce una scissione autocatalitica necessaria per il suo ripiegamento e la conseguente secrezione (*Figura 1*). Una volta tagliato, il peptide segnale, grazie al legame idrogeno, rimane attaccato al dominio catalitico di

Indirizzo per la corrispondenza

Lorenzo Da Dalt
Dipartimento di Scienze Farmacologiche
e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano
Via Balzaretti 9, 20133 Milano
E-mail: lorenzo.dadalt@unimi.it

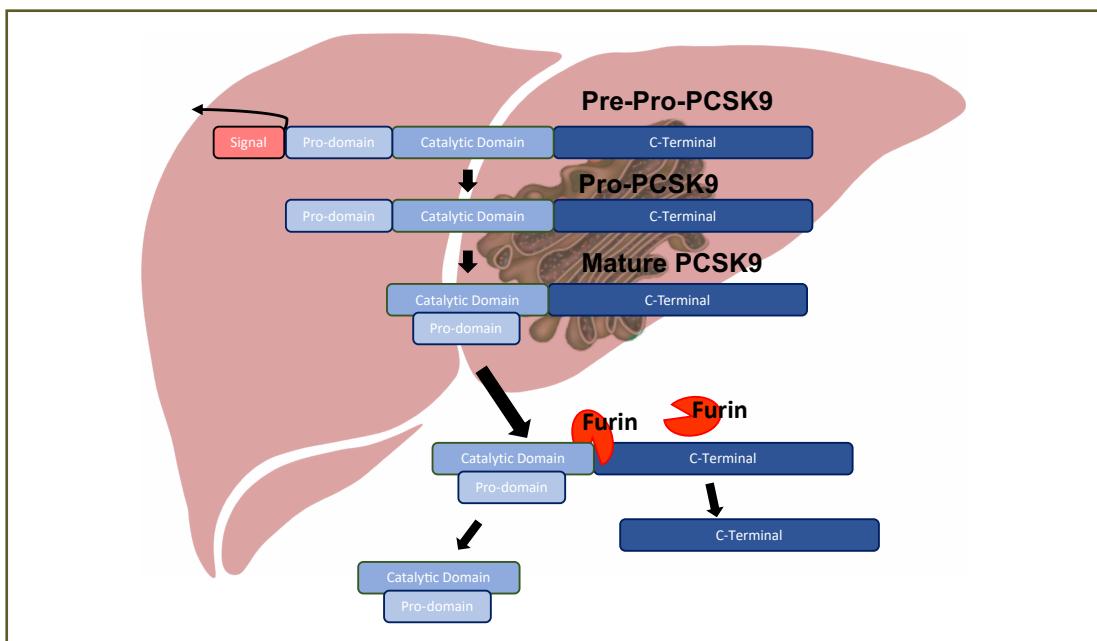


Figura 1 - PCSK9 viene prodotto principalmente a livello epatico come pre-pro proteina che presenta un dominio c-terminale, un dominio catalitico, un prodominio e una sequenza segnale che lo indirizza a livello del reticolo endoplasmatico. Qui la sequenza segnale viene rimossa e la pro-proteina PCSK9 va in contro a una scissione autocatalitica che permette il distacco del pro-domain segnale che si posiziona sopra PCSK9 maturo per proteggerlo da altre modifiche post-trascrizionali. La proteina viene quindi rilasciata nel plasma dove può subire il taglio da parte della furina mantenendo comunque la sua attività.

PCSK9 inibendo l'interazione laterale con altri substrati finché la proteina si trova a livello cellulare. Una volta matura PCSK9 viene impacchettata in vescicole a livello dell'apparato di Golgi e quindi secreta (1). Il riconoscimento del *target* da parte di PCSK9 avviene attraverso il legame del dominio catalitico con la sequenza simile al fattore di crescita epidermico A (EGF-A) presente nei recettori che appartengono alla famiglia dell'LDLr. Una volta legato al dominio EGF-A, il complesso PCSK9-LDLr viene internalizzato per endocitosi mediata da clatrina (2). Il pH acido caratteristico dell'endosoma tardivo rafforza il legame tra PCSK9 ed EGF-A e questa forte interazione impedisce la dissociazione e il riciclo del recettore sulla membrana cellulare, portando a una degradazione del complesso (3). Di

conseguenza, osserviamo una ridotta espressione di LDLr, una diminuzione del catabolismo delle LDL e un aumento dei livelli plasmatici di colesterolo LDL (LDL-C) (4). Accanto a LDLr, altri recettori, inclusi altri membri della stessa famiglia, come il recettore per le lipoproteine a densità molto bassa (VLDLr) e ApoER2 oppure gli *scavenger receptors* come CD36 sono target di PCSK9. Come avviene per l'LDLr, PCSK9 media la degradazione del CD36 guidando il recettore direttamente ai lisosomi; infatti, è stato dimostrato e come l'espressione di CD36 risulti aumentata sia in modelli *in vitro* che *in vivo* con delezione di PCSK9 (5).

È stato anche proposto un ruolo intracellularare per PCSK9 nella regolazione del metabolismo del colesterolo. Infatti, è stato visto come in soggetti con ipercolesterolemia

autosomica recessiva (ARH), dove la proteina ARH, coinvolta nell'internalizzazione dell'LDLR, risulta mancante, PCSK9 porta a una ridotta espressione dell'LDLR e come il trattamento con Evolocumab sia funzionale nella riduzione dei livelli di colesterolo (6-8). PCSK9 è quindi una proteina chiave nella regolazione del metabolismo del colesterolo e, a sua volta, può essere regolata a diversi livelli. Una volta rilasciata in circolo, PCSK9 è soggetta a modificazioni post-traduzionali: ad esempio, la furina scinde PCSK9 matura producendo una proteina troncata di circa 55 KDa con una minore abilità nel legare l'LDLr rispetto alla forma completa (9) (*Figura 1*). A conferma di questa osservazione, è stato visto che PCSK9 può circolare libero, e quindi più suscettibile al taglio furinico, o legarsi alle lipoproteine a bassa densità LDL, mantenendo la sua forma integrale e quindi la massima capacità di legare il suo bersaglio (10).

PCSK9 circolante è quasi interamente prodotto e rilasciato dal fegato. Tra i fattori che influenzano l'espressione di PCSK9 troviamo il ritmo circadiano, gli ormoni, la dieta, l'esercizio fisico, i livelli di colesterolo cellulare nel fegato. Anche i farmaci ipocolesterolemizzanti, come le statine, diminuendo la biosintesi di colesterolo nel fegato attivano una risposta cellulare che aumenta la produzione di PCSK9.

Il suo promotore, infatti, contiene diversi elementi regolatori tra i cui il *sterol regulatory element* (SRE), il fattore epatico nucleare-1 (HNF-1) (11), il fattore di trascrizione *specificity protein 1* (SP1) e l'*insulin-response element* (IRE). Proprio per la presenza di questi siti regolatori, l'espressione di PCSK9 è sensibile ai livelli intracellulari di colesterolo che, modulando l'attivazione delle *sterol regulatory binding protein* (SREBP), possono attivarne la trascrizione legandosi ai siti SRE. Proprio per questo stretto legame tra PCSK9 e i livelli di cole-

sterolo i principali regolatori della sua espressione sono le isoforme 2 e 1c della famiglia delle SREBP. In particolare, l'espressione di PCSK9 è aumentata nelle condizioni di mancanza di colesterolo intracellulare e come conseguenza del trattamento con statine. Il secondo regolatore chiave dell'espressione di PCSK9 è HNF1 la cui sequenza si trova a livello del promotore di PCSK9 vicino alla sequenza SRE. Quindi l'attivazione di HNF1, collaborando con SREBP2, aumenta l'espressione di PCSK9 in situazioni di bassi livelli di colesterolo intracellulare. Vicino alla sequenza del promotore di PCSK9, ci sono anche molti siti di legame per il co-attivatore che possono aumentare la trascrizione genica. Uno di questi è il sito di legame per il fattore nucleare dell'istone H4 (HINFP) che promuove quindi la produzione PCSK9. Essendo l'acetilazione dell'istone H4 un regolatore positivo dell'espressione di PCSK9, la mancanza di istone deacetilasi Sirtuin 6 (SIRT6) e Sirtuin 1 (SIRT1) è stata vista essere associata ad un aumento della produzione di PCSK9. Il fattore di trascrizione *forkhead-box protein O3* (FOX3), svolge il ruolo opposto e, portando alla deacetilazione dell'istone H3 e promuovendo l'attività di SIRT6, porta all'inattivazione di SREBP2 e HNF1 e alla conseguente inibizione della trascrizione di PCSK9 (4, 12).

In che modo l'inibizione di PCSK9 influenza la funzionalità epatica e quella di altri tessuti?

PCSK9 è diventato un candidato particolarmente interessante a livello farmacologico da quando sono state scoperte delle varianti genetiche con perdita di funzione (LOF) che si associano a variazioni nei livelli plasmatici di LDL-C (13). In particolare, individui con varianti LOF mostravano un ridotto rischio cardiovascolare. Questa os-

servazione ha portato velocemente a sviluppare delle strategie volte ad inibire PCSK9 come gli anticorpi monoclonali o le strategie di silenziamento genico. A livello epatico, l'inibizione di PCSK9 aumenta l'espressione dell'LDL-R sulla superficie delle cellule aumentando il catabolismo delle LDL.

Questo *pathway* è particolarmente efficiente e fa sì che il fegato controlli l'eccesso di colesterolo in circolo veicolandolo nel fegato ed eventualmente eliminandolo attraverso la via degli acidi biliari o rimpacchettandolo nelle lipoproteine.

Altri tessuti, tuttavia, non hanno la stessa capacità del fegato nel gestire l'eccesso di colesterolo e per questo motivo un eccessivo *uptake* porta a lipotossicità, o tossicità da lipidi. Questa comprende una serie di manifestazioni che si verificano in particolare a livello dei tessuti che dipendono in maniera sostanziale dagli acidi grassi per la produzione di energia tra i quali, cuore, arterie, muscoli, pancreas e reni. La lipotossicità è causata dall'alterazione del metabolismo lipidico e dall'accumulo di intermedi lipidici, con conseguente compromissione metabolica e funzionale degli organi danneggiati. Il termine è stato utilizzato per la prima volta negli anni '90 da Roger Unger, che per primo ipotizzò che l'eccesso di lipidi fosse collegato allo sviluppo del diabete e della cardiomiopatia (14). Anche se ad oggi sono stati fatti molti studi, la tossicità mediata dall'accumulo di lipidi rimane poco conosciuta e non è chiaro se la causa scatenante sia l'eccessiva produzione di lipidi, oppure il ridotto utilizzo come intermedi metabolici e quindi l'inadeguata rimozione degli intermedi lipidici tossici.

Alterazione della funzionalità pancreatica e PCSK9

Il metabolismo lipidico svolge un ruolo chiave nella funzionalità delle cellule β pan-

creatiche, la loro disfunzione e lo sviluppo di disordini metabolici, incluso il diabete di tipo 2, è stata associata anche alla presenza di lipotossicità (*Figura 2*). L'accumulo di ceramidi, sfingolipidi e colesterolo sembrano essere particolarmente importanti nell'indurre lipotossicità; i ceramidi, in particolare promuovono l'apoptosi delle cellule β . Anche il colesterolo è importante nel metabolismo delle cellule β e contribuisce al controllo delle proprietà strutturali delle membrane, influenzando la localizzazione e la funzionalità di tutte quelle proteine che si localizzano a livello della membrana, nonché la formazione e la fusione delle vescicole di insulina. L'accumulo di colesterolo cellulare può influenzare il movimento dei granuli tra reticolo endoplasmatico, i mitocondri e membrana cellulare ed in ultima analisi influenzare il rilascio di insulina (15). In particolare, il colesterolo accumulandosi sul reticolo endoplasmatico può alterare l'omeostasi del calcio portando all'esaurimento delle riserve cellulari necessarie per il rilascio di insulina (16). Come componente chiave dei *lipid rafts*, microdomini della membrana plasmatica presenti in tutte le cellule, il colesterolo, accumulandosi, può portare ad alterazione della funzione delle proteine SNARE e SNAP25, nonché dell'ATP K⁺ e del canale Ca₂₊ voltaggio-dipendente, contribuendo ad un'alterazione nel rilascio di insulina (17).

È importante notare che l'accumulo di colesterolo non interessa solo l'alterazione strutturale delle β -cellule pancreatiche ma modula anche il metabolismo energetico cellulare. Il colesterolo in eccesso può mantenere in forma dimerica e ancorato a livello dei *lipid droplets* l'enzima nNOS impedendo così l'attivazione della glucosidasi e la conseguente inibizione del flusso glicolitico (15). Inoltre, il colesterolo, aumentando la rigidità della membrana mitocondriale può portare ad un'alterazione

della catena di trasporto degli elettroni (ETC) e ad un ridotto efflusso di protoni; aspetti che influiscono sulla capacità dei mitocondri delle β -cellule di produrre ATP con conseguente riduzione del traffico di vescicole. Proprio per l'importanza del colesterolo nella modulazione della funzionalità pancreatica e nel rilascio di insulina, diversi studi hanno dimostrato l'impatto della modulazione del metabolismo del colesterolo sulla comparsa di diabete nell'uomo. Studi di randomizzazione mendeliana e metanalisi hanno osservato come la modulazione di geni coinvolti nel metabolismo del colesterolo, come HMGCoA riduttasi, NPC1L1 e PCSK9, siano associati ad un aumentato rischio di sviluppare disfun-

zione pancreaticica e diabete (18, 19). Anche a livello farmacologico, le statine aumentano il rischio di sviluppare diabete (18), anche se il beneficio in termini di riduzione degli eventi cardiovascolari è maggiore del rischio associato alla comparsa di nuovi casi di diabete.

Anche per PCSK9, studi di randomizzazione mendeliana mostrano come varianti LOF di PCSK9 si associno ad aumentato rischio di sviluppare diabete. Tuttavia, gli studi con PCSK9i non hanno confermato un aumento del rischio di insorgenza di diabete e alterazioni nei livelli di glicemia (19).

Per questo motivo abbiamo indagato i meccanismi molecolari che legano PCSK9 alla funzionalità pancreatica. Abbiamo no-

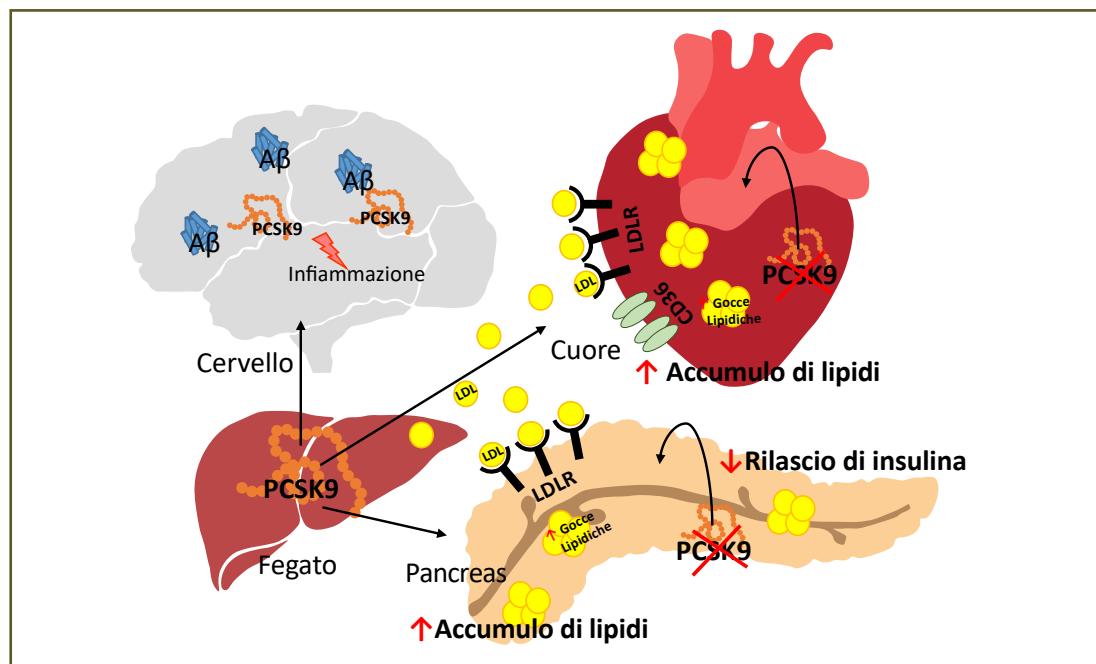


Figura 2 - PCSK9 circolante viene prodotto principalmente a livello epatico e rilasciato nel circolo sanguigno. PCSK9 viene prodotto anche da molti altri tessuti quali il cuore, il cervello e il pancreas. Dati sperimentali suggeriscono come PCSK9 prodotto localmente a livello pancreatico e cardiaco, attraverso la degradazione del recettore delle LDL e CD36, possa contribuire a mantenere la corretta omeostasi lipidica e limitare l'accumulo di lipidi cellulari. La deficienza di PCSK9, pertanto, potrebbe portare ad accumulo di lipidi cellulari, a un ridotto rilascio di insulina a livello pancreatico ed a cardiolipotossicità. A livello cerebrale è stato visto come PCSK9 svolga un ruolo nella modulazione dell'infiammazione post-ischemica e come, attraverso la modulazione di CD36, sia coinvolto nella clearance dei residui di beta amiloido (A β).

tato come la mancanza di PCSK9 si associa ad un aumento dei livelli di colesterolo nelle cellule beta pancreatiche e ad un ridotto rilascio di insulina nel circolo sanguigno. Il ridotto rilascio di insulina non era dovuto però a una ridotta produzione, ma a un ridotto rilascio dalle vescicole che si accumulavano a livello citoplasmatico. Queste osservazioni hanno confermato come PCSK9 abbia un impatto sul metabolismo pancreatico (*Figura 2*). Inoltre, è stato visto come la mancanza di PCSK9, ma solamente la componente locale e non quella circolante, fosse in grado di modulare l'espressione dell'LDLR nelle β -cellule portando all'accumulo di colesterolo e allo sviluppo di diabete di tipo 2 (20).

PCSK9 e funzionalità cardiaca

Il cuore tra tutti gli organi del corpo umano è uno tra quelli che richiede più energia; per questo motivo il metabolismo aerobico svolge un ruolo cruciale nel fornire i substrati necessari per la produzione di adenosina trifosfato (ATP). Le principali vie di generazione dell'ATP a livello cardiaco in un individuo sano sono la glicolisi e l'ossidazione degli acidi grassi. In particolare, il cuore utilizza principalmente acidi grassi come substrato energetico per la fosforilazione ossidativa, infatti oltre il 70% dell'ATP è generata dall'ossidazione degli acidi grassi (22). A differenza del fegato, il cuore non è capace di sintetizzare acidi grassi partendo dal glucosio e dagli amminoacidi, quindi il fabbisogno energetico è principalmente alimentato dai lipidi provenienti dal circolo sanguigno. I recettori per le lipoproteine, grazie alla lipolisi delle lipoproteine a bassissima densità mediata dalla lipoproteinlipasi (LPL), svolgono un ruolo chiave nell'assorbimento di acidi grassi derivati dai trigliceridi (TG), mentre CD36 media l'assorbimento di acidi grassi non

esterificati, trasportati principalmente dall'albumina (23, 24).

Il metabolismo lipidico del cuore è finemente bilanciato tra l'assorbimento dei lipidi e l'ossidazione mitocondriale per prevenire l'accumulo di lipidi in eccesso nel cardiomiocita. L'accumulo di lipidi a livello cardiaco e la conseguente lipotossicità, oltre a generare complicanze metaboliche cardiovascolari e quindi lo sviluppo di patologie quali il diabete mellito e la sindrome metabolica, è associato allo sviluppo di disfunzione cardiaca e insufficienza cardiaca nell'uomo ed in modelli sperimentali.

La lipotossicità è un parametro comune in differenti patologie cardiache come ad esempio in seguito ad un'ischemia al miocardio dove l'espressione di VLDL_r, aumenta l'endocitosi delle lipoproteine ricche di trigliceridi (25, 26). L'accumulo di lipidi nei cardiomiociti può quindi portare a disfunzione e scompenso cardiaco. L'insufficienza cardiaca (HF) in particolare, è una condizione patologica in cui il cuore non è più in grado di pompare il sangue in misura sufficiente per sostenere le richieste dell'organismo. Questa malattia è caratterizzata da esaurimento energetico dovuto all'aumento dello stress ossidativo e ai cambiamenti metabolici nel substrato utilizzato per la produzione di energia (21). Tra i fattori associati a questi cambiamenti metabolici è stata riscontrata la disfunzione mitocondriale che compromette l'efficacia della fosforilazione ossidativa e la generazione di ATP. Proprio in questo contesto PCSK9 attraverso la capacità di modulare VLDL_r² e CD36⁵ svolge un ruolo chiave nella modulazione della funzionalità cardiaca. È stato osservato come la mancanza di PCSK9 a livello cardiaco si associa ad un amentato accumulo di colesterolo sotto forma di gocce lipidiche e che questo, causando danno mitocondriale, porti a deplezione energetica a livello cardiaco. Come conseguenza di que-

ste alterazioni, modelli sperimentali privi di PCSK9 sviluppano insufficienza cardiaca con preservata frazione di eiezione (28) (*Figura 2*).

PCSK9 e funzionalità neuronale

PCSK9 è stato inizialmente scoperto nel cervello come convertasi-1 regolata dall'apoptosi neurale (NARC-1) in quanto la sua espressione risulta bassa in condizioni fisiologiche ma aumenta durante l'apoptosi. PCSK9 ha mostrato la capacità di promuovere eventi apoptotici nei neuroni dei granuli cerebellari (CGN) attraverso la via JNK (29) e l'attivazione di vie apoptotiche estrinseche e intrinseche.

PCSK9 a livello cerebrale è principalmente prodotto localmente. La regolazione dei lipidi a livello cerebrale svolge un ruolo chiave in quanto sia i neuroni, per mantenere le strutture di membrana degli assoni, che la guaina mielinica contengono elevati livelli di colesterolo (30). È interessante notare come PCSK9 sia altamente espresso da cellule in rapida proliferazione sia nel cervello adulto che durante le fasi di sviluppo neurologico a livello del telencefalo e del cervelletto (31). Come attore principale nella regolazione del metabolismo lipidico e dell'infiammazione, il ruolo di PCSK9 è stato studiato in diverse neuropatologie, inclusa la malattia di Alzheimer (32). Nel modello murino è stato osservato che, modulando l'espressione di LRP1 e CD36, PCSK9, può essere un mediatore nella clearance di β -Amiloide ($A\beta$) e quindi coinvolto nel controllo della patologia. Per supportare ulteriormente questo ruolo di PCSK9 nell'eliminazione di $A\beta$ (*Figura 2*), è stato visto come CD36, uno dei suoi target principali, è espresso ad alte concentrazioni a livello delle cellule microgliali dove ne regola il turnover, supportando un possibile ruolo di PCSK9 nella progressione della patolo-

gia (33). Ulteriori studi hanno anche collegato PCSK9 a neuroinfiammazione e, in particolare in un modello di lesione ischemica, l'inibizione di PCSK9 ha limitato l'attivazione di NF κ B (34), l'attivazione e la proliferazione della microglia e degli astrociti. Questi dati suggeriscono la necessità di chiarire ulteriormente il ruolo di PCSK9 nel sistema nervoso.

Conclusioni

Dopo la scoperta dell'associazione di mutazioni con guadagno di funzione di PCSK9 con ipercolesterolemia familiare, l'attenzione si è focalizzata sullo studio dei meccanismi molecolari responsabili ed in particolare sulla capacità di PCSK9 di regolare i livelli di recettore LDL a livello epatico. Contemporaneamente lo studio di inibitori di PCSK9 ha portato all'approvazione degli anticorpi monoclonali anti-PCSK9 e più di recente dell'approccio di silenziamento genico per il trattamento dei pazienti ad altissimo rischio cardiovascolare con livelli di colesterolo LDL difficilmente controllabili con le altre terapie disponibili.

È interessante notare come questi farmaci bloccano essenzialmente l'attività di PCSK9 di origine epatica ed in questo modo migliorano l'efficienza della ricaptazione di LDL a livello epatico. Tuttavia, PCSK9 è espresso anche in altri tessuti e la caratterizzazione di soggetti con mutazioni con perdita di funzione di PCSK9 ha permesso di studiare gli effetti della mancanza della proteina in altri tessuti. Per esempio, pazienti LOF per PCSK9 presentano un aumentato rischio di sviluppare diabete di tipo 2, un effetto che non si osserva nei soggetti trattati con inibitori di PCSK9. Questa apparente discrepanza è stata spiegata attraverso lo studio di modelli sperimentali privi di PCSK9 che hanno permesso di capire come solo la protei-

na prodotta localmente nel pancreas regola la funzionalità della cellula beta ed influenza il rilascio di insulina. Analogamente PCSK9 prodotta a livello cardiaco contribuisce a controllare l'eccessivo *uptake* di lipidi a livello del cardiomiocita attraverso la regolazione di recettori differenti da LDL-R. Nuovamente questo effetto è indipendente da PCSK9 circolante escluden-

do un impatto degli inibitori di PCSK9 sul metabolismo lipidico a livello del cardiomiocita. Studi con PCSK9i hanno escluso un ruolo per questi farmaci nell'alterare la funzionalità cerebrale, tuttavia, l'osservazione che PCSK9 risulti altamente espresso a livello del sistema nervoso centrale lascia ancora aperta la domanda sul suo ruolo in questa sede.

RIASSUNTO

La proteasi "Proprotein convertasi subtilisin Kexin tipo 9" (PCSK9) è una glicoproteina di 692 aminoacidi che appartiene alla famiglia delle proprotein convertasi. È prodotta principalmente dal fegato, e secreta nel circolo sanguigno. PCSK9 interagisce con diversi recettori della famiglia LDLR, inclusi VLDLR, LRP1 ma anche con CD36, e guida la loro degradazione lisosomiale. L'osservazione che PCSK9 possa essere prodotta anche da tessuti extraepatici ha posto l'attenzione sulla possibilità che un suo deficit si associa ad un aumento dell'espressione dei recettori della famiglia LDLR contribuendo ad un aumento dell'accumulo di lipidi nei tessuti extraepatici ed un cambiamento nel metabolismo cellulare.

Parole chiave: PCSK9, LDLR, CD36, lipoproteine, metabolismo lipidico, tessuti extraepatici.

Bibliografia

- Canuel M, Sun X, Asselin MC, Paramithiotis E, Prat A, Seidah NG. Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9 (PCSK9) Can Mediate Degradation of the Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 1 (LRP-1). *PLoS One*. 2013.
- Poirier S, Mayer G, Benjannet S, Bergeron E, Marcinkiewicz J, Nassoury N, Mayer H, Nimpf J, Prat A, Seidah NG. The proprotein convertase PCSK9 induces the degradation of low density lipoprotein receptor (LDLR) and its closest family members VLDLR and ApoER2. *J Biol Chem*. 2008.
- Benjannet S, Saavedra YGL, Hamelin J, Asselin M-C, Essalmani R, Pasquato A, Lemaire P, Duke G, Miao B, Duclos F, Parker R, Mayer G, Seidah NG. Effects of the prosegment and pH on the activity of PCSK9: evidence for additional processing events. *J Biol Chem*. 2010; 285: 40965-40978.
- Lipari MT, Li W, Moran P, Kong-Beltran M, Sai T, Lai J, Lin SJ, Kolumam G, Zavala-Solorio J, Izrael-Tomasevic A, Arnott D, Wang J, Peterson AS, Kirchhofer D. Furin-cleaved proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) is active and modulates low density lipoprotein receptor and serum cholesterol levels. *J Biol Chem*. 2012; 287: 43482-43491.
- Demers A, Samami S, Lauzier B, Rosiers C Des, Sock ETN, Ong H, Mayer G. PCSK9 Induces CD36 Degradation and Affects Long-Chain Fatty Acid Uptake and Triglyceride Metabolism in Adipocytes and in Mouse Liver. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2015.
- Park SW, Moon Y-A, Horton JD. Post-transcriptional regulation of low density lipoprotein receptor protein by proprotein convertase subtilisin/kexin type 9a in mouse liver. *J Biol Chem United States*. 2004; 279: 50630-50638.
- Rodríguez-Jiménez C, Gómez-Coronado D, Frías Vargas M, Cerrato F, Lahoz C, Saban-Ruiz J, González-Nieto D, Lasunción MA, Mostaza JM, Rodríguez-Nóvoa S. A new variant (c.1A>G) in LDLRAP1 causing autosomal recessive hypercholesterolemia: Characterization of the defect and response to PCSK9 inhibition. *Atherosclerosis Ireland*. 2019; 284: 223-229.
- Fahy EF, McCarthy E, Steinhagen-Thiessen E, Vaughan CJ. A case of autosomal recessive hypercholesterolemia responsive to proprotein convertase subtilisin/kexin 9 inhibition. *J Clin Lipidol United States*. 2017; 11: 287-288.
- Benjannet S, Rhainds D, Hamelin J, Nassoury N, Seidah NG. The proprotein convertase (PC) PCSK9 is inactivated by furin and/or PC5/6A: functional consequences of natural mutations

- and post-translational modifications. *J Biol Chem United States*. 2006; 281: 30561-30572.
10. Kosenko T, Golder M, Leblond G, Weng W, Lagace TA. Low density lipoprotein binds to proprotein convertase subtilisin/kexin type-9 (PCSK9) in human plasma and inhibits PCSK9-mediated low density lipoprotein receptor degradation. *J Biol Chem*. 2013; 288: 8279-8288.
 11. Dong B, Singh AB, Shende VR, Liu J. Hepatic HNF1 transcription factors control the induction of PCSK9 mediated by rosuvastatin in normolipidemic hamsters. *Int J Mol Med Greece*. 2017; 39: 749-756.
 12. Tao R, Xiong X, DePinho RA, Deng C-X, Dong XC. FoxO3 transcription factor and Sirt6 deacetylase regulate low density lipoprotein (LDL)-cholesterol homeostasis via control of the proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (Pcsk9) gene expression. *J Biol Chem*. 2013; 288: 29252-29259.
 13. Chaudhary R, Garg J, Shah N, Sumner A. PCSK9 inhibitors: A new era of lipid lowering therapy. *World J Cardiol*. 2017; 9: 76-91.
 14. Nishi H, Higashihara T, Inagi R. Lipotoxicity in Kidney, Heart, and Skeletal Muscle Dysfunction. *Nutrients*. 2019; 11.
 15. Perego C, Da Dalt L, Pirillo A, Galli A, Catapano AL, Norata GD. Cholesterol metabolism, pancreatic β -cell function and diabetes. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 2019.
 16. Cnop M, Landchild MJ, Vidal J, Havel PJ, Knowles NG, Carr DR, Wang F, Hull RL, Boyko EJ, Retzlaff BM, Walden CE, Knopp RH, Kahn SE. The concurrent accumulation of intra-abdominal and subcutaneous fat explains the association between insulin resistance and plasma leptin concentrations : distinct metabolic effects of two fat compartments. *Diabetes United States*; 2002; 51: 1005-1015.
 17. Xia F, Gao X, Kwan E, Lam PPL, Chan L, Sy K, Sheu L, Wheeler MB, Gaisano HY, Tsushima RG. Disruption of pancreatic beta-cell lipid rafts modifies Kv2.1 channel gating and insulin exocytosis. *J Biol Chem United States*; 2004; 279: 24685-24691.
 18. Ference BA, Robinson JG, Brook RD, Catapano AL, Chapman MJ, Neff DR, Voros S, Giugliano RP, Davey Smith G, Fazio S, Sabatine MS. Variation in PCSK9 and HMGCR and Risk of Cardiovascular Disease and Diabetes. *N Engl J Med*. 2016.
 19. Lotta LA, Sharp SJ, Burgess S, Perry JRB, Stewart ID, Willems SM, Luan J, Ardanaz E, Arriola L, Balkau B, Boeing H, Deloukas P, Forouhi NG, Franks PW, Grioni S, Kaaks R, Key TJ, Navarro C, Nilsson PM, Overvad K, Palli D, Panico S, Quirós JR, Riboli E, Rolandsson O, Sacerdote C, Salamanca-Fernandez E, Slimani N, Spijkerman AMW, Tjonneland A, et al. Association between low-density lipoprotein cholesterol-lowering genetic variants and risk of type 2 diabetes: A meta-analysis. *JAMA - J Am Med Assoc*. 2016.
 20. Schwartz GG, Steg PG, Szarek M, Bhatt DL, Bitner VA, Diaz R, Edelberg JM, Goodman SG, Hanotin C, Harrington RA, Jukema JW, Lecorps G, Mahaffey KW, Moryusef A, Pordy R, Quintero K, Roe MT, Sasiela WJ, Tamby J-F, Tricoci P, White HD, Zeiher AM. Alirocumab and Cardiovascular Outcomes after Acute Coronary Syndrome. *N Engl J Med United States*. 2018; 379: 2097-2107.
 21. Da Dalt L, Ruscica M, Bonacina F, Balzarotti G, Dhyani A, Cairano E Di, Baragetti A, Arnaboldi L, Metrio S De, Pellegatta F, Grigore L, Botta M, Macchi C, Ubaldi P, Perego C, Catapano AL, Norata GD. PCSK9 deficiency reduces insulin secretion and promotes glucose intolerance: the role of the low-density lipoprotein receptor. *Eur Heart J*. 2018.
 22. Schulze PC, Drosatos K, Goldberg IJ. Lipid use and misuse by the heart. *Circ Res*. 2016.
 23. Bharadwaj KG, Hiyama Y, Hu Y, Huggins LA, Ramakrishnan R, Abumrad NA, Shulman GI, Blaner WS, Goldberg IJ. Chylomicron- and VLDL-derived lipids enter the heart through different pathways: In vivo evidence for receptor- and non-receptor-mediated fatty acid uptake. *J Biol Chem*. 2010.
 24. Carley AN, Bi J, Wang X, Banke NH, Dyck JRB, O'Donnell JM, Lewandowski ED. Multiphasic triacylglycerol dynamics in the intact heart during acute in vivo overexpression of CD36. *J Lipid Res* 2013; 54: 97-106.
 25. Schneider WJ, Nimpf J. LDL receptor relatives at the crossroad of endocytosis and signaling. *Cell. Mol. Life Sci*. 2003.
 26. Takahashi S, Sakai J, Fujino T, Hattori H, Zenimaru Y, Suzuki J, Miyamori I, Yamamoto TT. The very low-density lipoprotein (VLDL) receptor: characterization and functions as a peripheral lipoprotein receptor. *J. Atheroscler. Thromb.* 2004.
 27. Neubauer S. The failing heart—an engine out of fuel. *N Engl J Med United States*. 2007; 356: 1140-1151.
 28. Da Dalt L, Castiglion L, Baragetti A, Audano M, Svecla M, Bonacina F, Pedretti S, Ubaldi P, Benzonni P, Giannetti F, Barbuti A, Pellegatta F, Indino S, Donetti E, Sironi L, Mitro N, Catapano AL, Norata GD. PCSK9 deficiency rewires heart metabolism and drives heart failure with preserved ejection fraction. *Eur Heart J*. 2021; 42: 3078-3090.

29. Kysenius K, Muggalla P, Mätilik K, Arumäe U, Huttunen HJ. PCSK9 regulates neuronal apoptosis by adjusting ApoER2 levels and signaling. *Cell Mol Life Sci Switzerland*. 2012; 69: 1903-1916.
30. Dietschy JM. Central nervous system: cholesterol turnover, brain development and neurodegeneration. *Biol Chem*. 2009; 390: 287-293.
31. Seidah NG, Mayer G, Zaid A, Rousselet E, Nasraoui N, Poirier S, Essalmani R, Prat A. The activation and physiological functions of the proprotein convertases. *Int J Biochem Cell Biol Netherlands*. 2008; 40: 1111-1125.
32. Adorni MP, Ruscica M, Ferri N, Bernini F, Zimetti F. Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9, Brain Cholesterol Homeostasis and Potential Implication for Alzheimer's Disease. *Front Aging Neurosci*. 2019; 11: 120.
33. Hickman SE, Allison EK, Khouri J El. Microglial dysfunction and defective beta-amyloid clearance pathways in aging Alzheimer's disease mice. *J Neurosci*. 2008; 28: 8354-8360.
34. Apaijai N, Moisescu DM, Palee S, McSweeney CM, Saiyasin N, Maneechote C, Boonnag C, Chattipakorn N, Chattipakorn SC. Pretreatment With PCSK9 Inhibitor Protects the Brain Against Cardiac Ischemia/Reperfusion Injury Through a Reduction of Neuronal Inflammation and Amyloid Beta Aggregation. *J Am Heart Assoc*. 2019; 8: e010838.

FARMACOGENETICA

DAGLI STUDI REAL-WORLD ALLA FARMACOGENETICA: OBIETTIVI ATTUALI E FUTURI NELLA GESTIONE DELLA DISLIPIDEMIA NEL PAZIENTE CON DIABETE

From Real-World to Pharmacogenetic Studies: Current and Future Needs in Dyslipidemia Management in Patients with Diabetes

MARIO LUCA MORIERI^{1,2,3}, GIAN PAOLO FADINI¹, ALESSANDRO DORIA^{2,3},
ANGELO AVOGARO¹

¹UOC Malattie del Metabolismo, Dipartimento di Medicina, University of Padova, Italy

²Genetic & Epidemiology Section, Joslin Diabetes Center, Boston, MA

³Department of Medicine, Harvard Medical School, Boston, MA

SUMMARY

The causal role of LDL-cholesterol in atherogenesis and cardiovascular disease has been clearly elucidated over the last decades both in subjects with and without diabetes. In line with this, and with the availability of high-intensive LDL-c lowering agents (e.g., PCSK9-inhibitors, combination of high-intensity statin and ezetimibe), the cardiovascular preventive guidelines have recommended achievement of progressively lower LDL-c targets over years. In this review, we summarize the evidence showing that, as reported in the general population, also among subjects with diabetes these recommendations are poorly implemented in real-world settings. Such distance between every-day clinical practice and guidelines recommendation is highly costly, and over the next ten years, if unchanged, might be responsible for thousands of avoidable cardiovascular events among subjects with diabetes in Italy. While this represents one of the most important unmet clinical needs for cardiovascular prevention in diabetes, new studies are paving the way into a “precise medicine” approach to address also future needs in the treatment of dyslipidemia. Genetic and epidemiology study have reinvigorated the importance of lowering TG-rich lipoproteins, and showed that TG-lowering treatments (e.g., fenofibrate or omega-3 fatty acids) could be effective on cardiovascular prevention if used in well-selected population. This review is therefore also focused on new approaches, that combining clinical and genetic information will allow to improve cardiovascular risk assessment and to identify subjects with better response to intensive or specific treatments (e.g., pharmacogenetic studies on PCSK9i and fenofibrate), hence representing future direction to improve cardiovascular preventive strategies in patients with diabetes.

Key words: *Pharmacogenetics, diabetes, dyslipidemia, atherosclerosis, cardiovascular disease.*

Introduzione

Negli ultimi vent'anni, grazie all'ottimizzazione delle terapie di prevenzione cardiovascolare abbiamo assistito, sia nella popolazione generale che in quella con diabete, ad un progressivo calo della morbidità e mortalità cardiovascolare (1, 2). Come riassunto in *figura 1*, analizzando i recenti dati inglesi pubblicati da Pearson-Stuttard et al (2), si può osservare chiaramente come l'incidenza di mortalità cardiovascolare, pur restando tra le principali cause di morbidità e mortalità nei paesi occidentali, si è progressivamente ridotta nell'arco degli ultimi 20 anni.

Tuttavia, tale calo è stato simile ("parallelo") nei soggetti senza e con diabete, non permettendo pertanto di ridurre il rischio cardiovascolare relativo al diabete. Ancora oggi infatti un soggetto con diabete ha un rischio cardiovascolare almeno del 50% maggiore rispetto ad un soggetto con caratteristiche simili ma senza diabete (3-5). Se a questo si aggiunge il progressivo incremento della prevalenza di diabete nella popolazione (6), risulta chiaro quanto sia importante la necessità sanitaria di ridurre questo gap. In questo contesto, questa revisione narrativa della letteratura è focalizzata sull'importanza del corretto trattamento delle dislipidemie del paziente con diabete. Nella prima parte viene fornita una fotografia del livello di applicazione delle attuali linee guida ESC/EAS e EASD per il controllo della dislipidemia nella pratica clinica quotidiana (*real-world studies*).

Indirizzo per la corrispondenza

Mario Luca Morieri
UOC Malattie Del Metabolismo
Dipartimento di Medicina
Università di Padova
Via Giustiniane 2, Padova 35121
E-mail: morieri.ml@gmail.com

Vengono poi forniti spunti per capire gli effetti clinici della inadeguata applicazione di tali linee guida e per migliorarne l'implementazione.

Nella seconda parte, questa *review* descrive alcuni possibili approcci futuri basati sulla medicina di precisione che potrebbero aiutare il clinico nella ottimizzazione della terapia delle dislipidemie. In particolare, vengono descritti alcuni studi di farmacogenetica per mostrare come sia possibile, attraverso la combinazione di informazioni cliniche e genetiche, migliorare l'identificazione di soggetti in grado di ottenere i massimi benefici dalle terapie più intensive (es. inibitori PCSK9) o più specifiche (es. fenofibrato).

Where should we stand? La riduzione colesterolo LDL come target primario

Gli interventi per ridurre il rischio cardiovascolare nei soggetti con diabete prevedono un approccio multifattoriale, comprensivo di modifiche dello stile di vita (attività fisica regolare, dieta equilibrata e varia, iposodica, cessazione dell'abitudine tabagica, riduzione dell'eccesso di peso corporeo) e farmacologico (ottimizzazione del controllo glicemico, utilizzo farmaci antidiabetici innovativi, controllo dell'ipertensione arteriosa e appropriata terapia antiaggregante) dove il controllo della dislipidemia dovrebbe rappresentare un aspetto di primaria importanza data la sua conclamata efficacia (7, 8). Infatti, grazie alla ricerca scientifica svolta negli ultimi 40 anni è stato possibile dimostrare il ruolo causale delle LDL nell'aterogenesi, e quindi nella manifestazione delle malattie cardiovascolari come l'infarto miocardico e l'arteriopatia periferica (9, 10). Il risultato diretto di queste evidenze è che tutte le linee guida

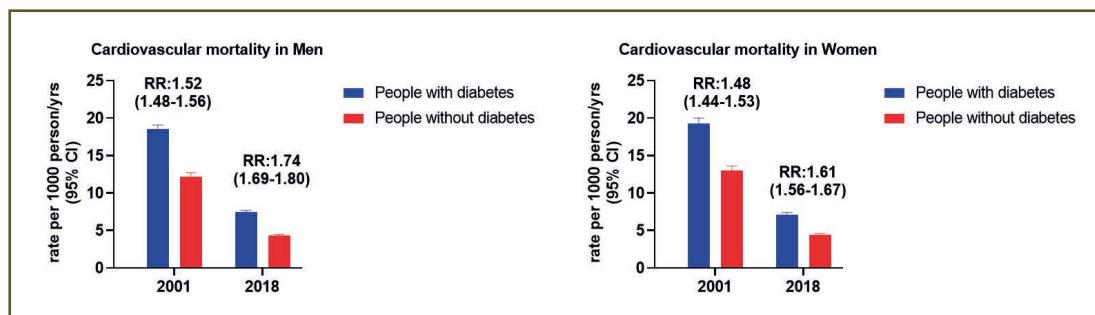


Figura 1 - Trend temporale (tra il 2001 e il 2018) del confronto tra incidenza della mortalità cardiovascolare nella popolazione con diabete rispetto alla popolazione generale (divisa per sesso della popolazione). (Rielaborazione dei dati pubblicati da Pearson-Stuttard, Lancet Diabetes & Endocrinology 2021).

internazionali delle dislipidemie (e/o di prevenzione cardiovascolare) riportano chiaramente come obiettivo primario (sia nei pazienti diabetici che non) è quello di ridurre il colesterolo LDL.

Inoltre, tale riduzione deve essere tanto più intensa quanto più è elevato il rischio cardiovascolare dei soggetti da trattare (5, 8).

Tale approccio (“the lower the better”) è supportato dagli studi che hanno dimostrato, combinando studi di epidemiologia genetica (esempio gli studi di randomizzazione mendeliana) ai dati di decine di trial clinici randomizzati, che la riduzione relativa del rischio cardiovascolare segue una relazione log-lineare con la riduzione ottenibile del colesterolo LDL (3, 9). Per esempio, la riduzione di 1 mmol/L (38 mg/dL) di colesterolo LDL per 5 anni si associa ad una riduzione del rischio relativo di eventi cardiovascolari maggiori circa del 21-22%. Inoltre, questa riduzione del rischio relativo di eventi cardiovascolari per ogni riduzione di 1 mmol/L di LDLC, risulta simile nei pazienti senza o con diabete (3, 11). Tuttavia, dato il rischio aumentato di partenza dei soggetti con diabete, il vantaggio in termini di riduzione del rischio assoluto cardiovascolare diventa più alto in quest’ultimi.

"Where do we stand?" distanza tra raccomandazioni e pratica clinica

La maggior parte degli studi *Real-World* sulla corretta implementazione delle linee guida nella pratica clinica quotidiana ambulatoriale sono stati condotti sulla popolazione generale e prevalentemente in soggetti in prevenzione secondaria (12-16). Sebbene questi studi includessero anche soggetti con diabete (in prevalenza variabile tra il 5 e il 40%), sono pochi gli studi che si sono concentrati in maniera specifica sul diabete. Per questo motivo il nostro gruppo ha recentemente condotto alcuni studi *real-world* (17, 18), il primo dei quali (17) è parte dello studio retrospettivo multicentrico DARWIN (DAta for Real World evIdeNce in Type 2 Diabetes), che ha raccolto i dati di pazienti afferenti a 46 centri di diabetologia distribuiti su tutto il territorio nazionale, appositamente disegnato per effettuare analisi di appropriatezza diagnostica e terapeutica (19, 20). In questo studio, partendo da una popolazione di circa 281,000 pazienti afferenti ai centri di diabetologia, è stato possibile analizzare i dati di circa 104.726 pazienti con DM2, valutati tra il 2015 e il 2016, con informazioni disponibili sull’utilizzo di terapia ipolipemizzante e di cui

87,909 (83.4%) soggetti avevano valori di c-LDL disponibili. Grazie all'estrazione anonimizzata dei dati della cartella clinica elettronica è stato quindi valutato l'utilizzo di terapie ipolipemizzanti, e il raggiungimento dei target LDL-c, in base alle diverse categorie di rischio cardiovascolare (valutati secondo le linee guida EAS del 2016 o 2019 e le linee guida ESC/EASD del 2019) (5, 8, 21), nonché in base alla specifica presenza o assenza di precedenti eventi cardiovascolari maggiori. Lo studio ha permesso di sottolineare alcuni aspetti importanti: il primo è che la maggior parte dei pazienti seguiti in questi centri avessero rischio CV molto-elevato (70%) o elevato (29%); il secondo è che, nonostante tale rischio cardiovascolare, vi era una percentuale eccessivamente elevata di pazienti senza terapia ipolipemizzante complessivamente pari al 37% (35% nel gruppo a rischio molto-elevato e 41% in quello a rischio elevato). Tale proporzione scendeva al 17% nei soggetti in prevenzione secondaria, in linea con la *survey* europea EUROASPIRE-V, dove su ~8,000 pazienti con pregresso evento cardiovascolare (di cui il 29% con diabete) l'utilizzo di statine era pari all'80% (22). Se da un lato queste percentuali appaiono in miglioramento rispetto a studi precedenti (ad esempio in uno studio basato sui dati riferiti al 2007, il 35-40% dei soggetti diabetici in prevenzione secondaria era senza trattamento con statine (23)), è chiaro che tali percentuali appaiono ancora ben lontane dall'ideale. Bisogna infatti considerare che visto il rischio elevato o molto-elevato osservato nella quasi totalità dei pazienti inclusi in questa *survey*, l'utilizzo di statine dovrebbe raggiungere il 100%.

Inoltre, osservando i dati in maniera più dettagliata, e analizzando la percentuale di soggetti in grado di raggiungere i *target* terapeutici raccomandati dalle linee guida (ossia pari al 50% di riduzione del coleste-

rolo LDL e il raggiungimento di valori inferiori a 55 mg/dl nei soggetti a rischio molto-elevato e inferiori a 70 mg/dl nei soggetti con rischio elevato) la situazione risulta ancor più lontana da quanto considerato "ideale". In questa *survey*, solo il 14% della popolazione raggiungeva questi obiettivi di riduzione assoluta e relativa del colesterolo LDL e, anche applicando i *target* meno stringenti delle precedenti linee guida (in essere al momento della raccolta di tali dati), la percentuale di soggetti a *target* saliva solo al 35%. Questi dati erano derivati da una popolazione seguita dai centri specialistici tra il 2015 e 2016, tuttavia, analizzando la popolazione "mista", ossia seguita anche dai medici di medicina generale, la proporzione di raggiungimento dei *target* risulta ancora minore. Infatti, in un secondo studio (18), condotto su dati aggiornati a fine 2018 e partendo da una popolazione di quasi 1 milione di soggetti residenti nella regione Veneto, è emerso che tra ≈38.000 soggetti in terapia attiva con statina (ossia con il ritiro di almeno una confezione di statine dalla farmacia nei 6 mesi precedenti) solo il 10% dei soggetti in prevenzione secondaria con diabete (tipo 1 o tipo 2) raggiungeva i *target* raccomandati dalle attuali linee guida.

Mancata opportunità di prevenzione cardiovascolare

Questi studi hanno inoltre permesso di analizzare nel dettaglio quali terapie sarebbero necessarie per raggiungere i *target* raccomandati (17, 18). In primis, da tali analisi emerge che la quasi totalità della popolazione analizzata potrebbe raggiungere i *target* raccomandati dalle linee guida (in una situazione teorica di completa aderenza e assenza di intolleranza al trattamento). In maniera più specifica, pur con i limiti degli studi retrospettivi, è stato stimato per

ogni paziente la terapia necessaria per raggiungere i *target*. Da tali analisi è emerso (con poche differenze tra i diversi studi) che in queste popolazioni di soggetti con diabete e a rischio cardiovascolare elevato o molto-elevato, più di un terzo della popolazione richiederebbe un trattamento con statine ad alta intensità, un altro terzo an-

che l'associazione con ezetimibe, mentre circa un quarto della popolazione richiederebbe anche l'aggiunta di inibitori del PCSK9 per raggiungere i livelli di colesterolo LDL raccomandati.

Sulla base di queste ideali modifiche terapeutiche, è quindi stato possibile stimare la riduzione di colesterolo LDL ottenibile dall'implementazione di queste terapie, e di conseguenza (seguendo la relazione log-lineare tra riduzione del colesterolo LDL e del rischio CV relativo) è stato possibile ipotizzare la riduzione del rischio cardiovascolare relativo e assoluto che si otterrebbe attuando queste raccomandazioni. In figura 2 si può apprezzare come, dato il rischio cardiovascolare di partenza la riduzione del colesterolo LDL seguendo i *target* delle linee guida, si tradurrebbe nell'arco di 10 anni in un calo importante e significativo del rischio cardiovascolare assoluto in questa popolazione. Se si prende in considerazione la popolazione di circa 100.000 soggetti analizzata nello studio DARWIN, si può quindi stimare che nell'arco di 10 anni, il numero di eventi cardiovascolari attesi si ridurrebbe di un terzo, passando da una incidenza di 24.000 a 16.000 eventi per 100.000 pazienti/10-anni (riduzione teorica del tasso di incidenza: 0.68; 95% C.I. 0.67-0.70, $p<0.001$). Pertanto, se da un lato è vero che l'utilizzo delle terapie ipolipemizzanti sta migliorando nel corso degli anni (12, 13, 17), dall'altro diventa essenziale trovare i punti chiave per velocizzare tale processo e prevenire eventi cardiovascolari che sarebbero evitabili (o almeno posticipabili).

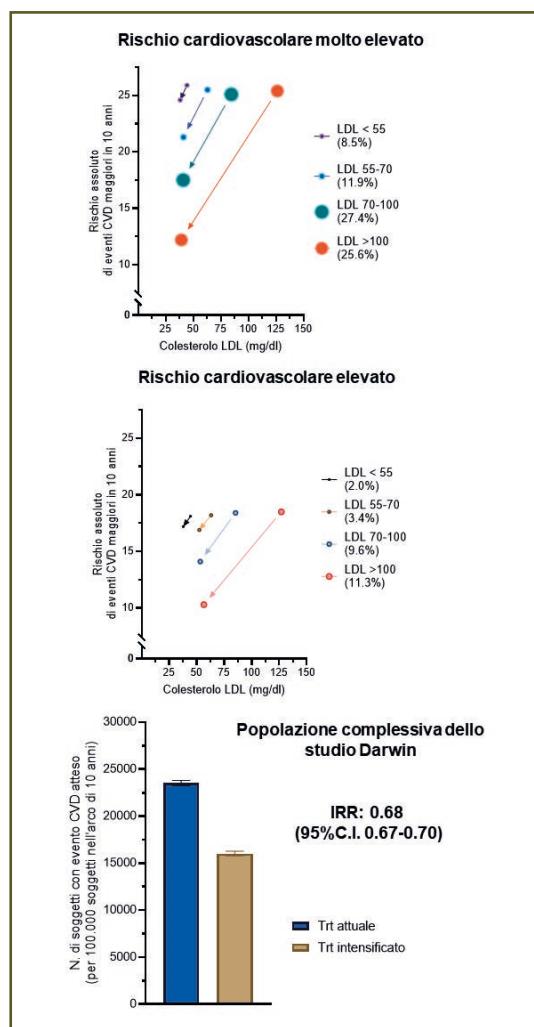


Figura 2 - Riduzione teorica del rischio cardiovascolare assoluto ottenibile dall'applicazione delle linee guida per il controllo del colesterolo LDL nella popolazione diabetica analizzata nello studio Darwin (Adattato da Morieri et al, Cardiovascular Diabetology 2020).

Come ridurre la distanza tra pratica clinica e linee guida

Il problema della distanza dalle linee guida non è un problema specifico di pochi paesi ma piuttosto diffuso, come evidenzia-

to da diversi lavori internazionali (6, 12-15, 18). Tra i diversi fattori alla base di tale distanza, molti studi hanno evidenziato il problema dell'aderenza e dell'eccessivo *report* di eventi avversi, anche quando questi non sono dovuti al farmaco (ossia l'effetto "nocebo") (24-30).

Il problema della bassa aderenza alla terapia ipolipemizzante (come per molte terapie di prevenzione) è nota da tempo e data la sua relazione intrinseca con il raggiungimento dei *target* è chiara l'importanza di una sua correzione. Anche in questo caso, alcuni studi mostrano dei *trend* di miglioramento nel corso degli ultimi anni (6), tuttavia resta un aspetto su cui è necessario migliorare ulteriormente (ad esempio favorendo l'educazione del paziente al riguardo e fornendo al medico e al paziente strumenti appropriati di misurazione dell'aderenza, come l'integrazione con i dati di percentuale di ritiro del farmaco dalla farmacie). L'educazione del paziente risulta anche essenziale per contrastare le informazioni sbagliate o sproporzionate sui potenziali effetti avversi dei farmaci. Diversi studi hanno infatti ormai documentato l'effetto "nocebo" legato alla terapia con statine dove, al contrario del placebo, si attribuisce al farmaco un effetto avverso o dannoso (come le mialgie) quando questo è eccessivamente "atteso" (negli studi randomizzati controllati i pazienti erano maggiormente predisposti a riportare effetti avversi anche durante la terapia con placebo rispetto a quando non assumevano alcuna terapia) (31, 32).

Se da un lato questi aspetti risultano importanti, dall'altro sono in grado di giustificare solo una parte della distanza tra linee guida e pratica clinica. Infatti, le percentuali di raggiungimento dei *target* restano troppo basse anche se si selezionano popolazioni con alta aderenza al trattamento (18). Ad esempio, nel nostro recente studio, con

dati aggiornati a fine 2018 e basato su una ampia *survey* (oltre 37.000 soggetti di cui 10.000 con diabete) di soggetti in trattamento con statine e che ritiravano regolarmente il farmaco dalla farmacia (ossia con "proportion-of-days-covered" $\geq 80\%$ su un periodo di 6 mesi precedenti al controllo del profilo lipidico), solo il 65% dei soggetti in prevenzione secondaria raggiungeva i *target* delle linee guida 2016 (e solo il 10% quelle del 2019) (18). In tal senso, l'inadeguato raggiungimento dei *target* terapeutici anche nelle popolazioni con alta aderenza suggerisce problematiche anche sul versante della prescrizione terapeutica da parte del medico.

Se da un lato la difficoltà di prescrivere farmaci più efficaci potrebbe essere "strutturale" (es costi e accesso alla rimborsabilità), dall'altra alcuni studi stanno facendo luce su alcuni *pattern* di prescrizione che richiedono anch'essi di essere migliorati (12). Diversi studi, ad esempio, mostrano come in alcuni gruppi di pazienti ci sia ancora una probabile sottovalutazione del rischio cardiovascolare, che porta ad un sotto-trattamento delle donne o dei soggetti con elevati valori di colesterolo-HDL (17, 18, 24). Inoltre, come mostrato nella nostra recente *survey*, è possibile che molti medici seguano ancora il concetto di raggiungimento del valore *target* assoluto senza combinarlo alle raccomandazioni anche sulla riduzione relativa del colesterolo LDL (esempio riduzione del 50%, indipendentemente dai valori di LDL-c di partenza, raccomandato nei gruppi a rischio CVD elevato o molto elevato). Altri studi sono in corso e serviranno per fare luce su questi elementi. Nel frattempo, alcuni studi di intervento mostrano che incentivare la corretta prescrizione da parte dei medici (seguendo modelli "pay for performance") è in grado di migliorare il profilo lipidico dei pazienti (33).

Prospettive future: usare test genetici per migliorare l'identificazione dei soggetti ad alto rischio cardiovascolare e con maggior beneficio dai trattamenti intensivi

Il quadro fin qui delineato mostra chiaramente, come l'attuazione delle linee guida e l'utilizzo dell'armamentario terapeutico attualmente a nostra disposizione sarebbe in grado di migliorare notevolmente la prevenzione cardiovascolare nella popolazione con e senza diabete. Tuttavia, ulteriori strategie terapeutiche sono necessarie per ridurre il rischio relativo nei soggetti con diabete. Tra queste, una delle più promettenti si basa sull'applicazione della "medicina di precisione", ossia attraverso una più precisa identificazione dei soggetti che potrebbero trarre il massimo beneficio da determinati trattamenti o da quelli più intensivi. Una delle strategie studiate nell'ambito della medicina di precisione si basa sull'applicazione di test genetici in grado di

migliorare gli *score* predittivi di rischio cardiovascolare (34). Infatti, se da un lato è vero che sulla base degli attuali *score* o tabelle di rischio cardiovascolare la maggior parte dei pazienti con diabete visti nella pratica ambulatoriale specialistica hanno un rischio elevato o molto-elevato, dall'altro, identificare con maggior precisione quei pazienti a rischio particolarmente elevato permetterebbe di ottimizzare la gestione della dislipidemia e dei trattamenti proposti (esempio riducendone il NNT) (35-38).

Negli ultimi anni si è sempre di più consolidata, sia nei soggetti con che senza diabete, la potenziale utilità clinica degli di *score* di rischio genetico (o Genetic Risk Score – GRS) basati su un numero sempre maggiore di varianti genetiche associate a rischio cardiovascolare aumentato (polygenic-risk-score o genome-wide genetic risk score) (34, 39-45). Infatti, come riassunto in figura 3, l'aggiunta progressiva di varianti genetiche indipendentemente associate a CAD è in grado di migliorare progressivamente la performance dei GRS (34). Inol-

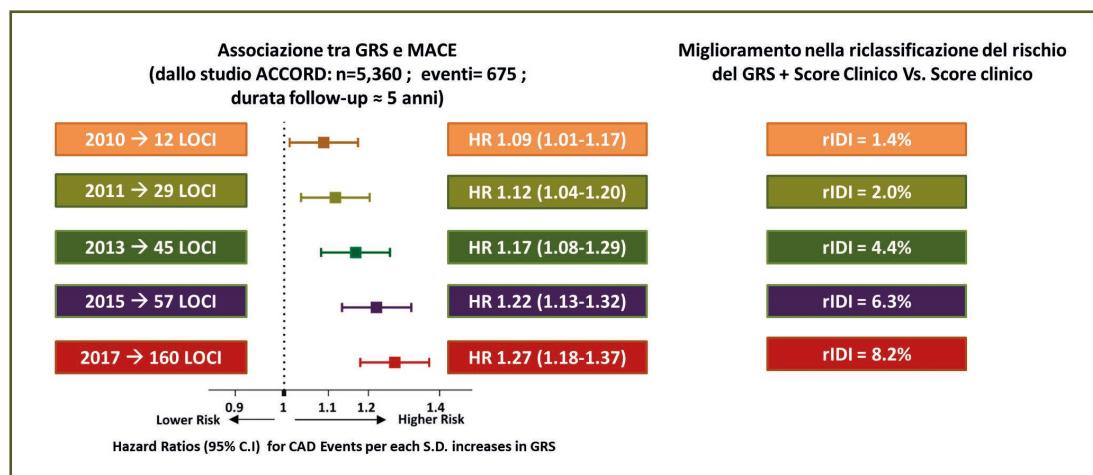


Figura 3 - L'aggiunta progressiva di un numero crescente di varianti genetiche fortemente e indipendentemente associate a malattia coronarica permette di migliorare la capacità predittiva dei Genetic Risk Score (GRS) per eventi cardiovascolari futuri. Note: rIDI= relative integrated Discrimination improvement (generalmente considerato >6% per valutare l'utilità di un nuovo biomarcatore). (Adattato da Morieri et al, Diabetes Care 2018).

tre, come mostrato in questo lavoro condotto dal nostro gruppo e nella popolazione di soggetti diabetici ad alto rischio cardiovascolare arruolati negli studi ACCORD e ORIGIN, l'aggiunta di nuove varianti allo *score* permette di migliorare la capacità di questi GRS di riclassificare i soggetti a rischio CVD più elevato quando il GRS viene aggiunto ai classici *score* di rischio cardiovascolare usati nella pratica clinica. Questo miglioramento della performance dei GRS ha quindi portato ad ipotizzare l'utilizzo dei GRS per identificare i soggetti con maggior beneficio dai trattamenti con terapie ipolipemizzanti.

Un esempio concreto di questa strategia è fornito da due recenti studi post-hoc di *trial* clinici sugli inibitori del PCSK9 (36, 37). I PCSK9i sono farmaci molto efficaci

nel ridurre il colesterolo LDL, generalmente ben tollerati e con dimostrata efficacia di prevenzione cardiovascolare (46, 47), tuttavia sono farmaci ad alto costo e di non facile accessibilità o rimborsabilità da parte dei sistemi sanitari (12, 15, 17). Una delle strategie perseguitibili per ottimizzarne l'utilizzo è quindi quella di migliorare l'identificazione dei soggetti che potrebbero trarne massimo beneficio. In tale senso questi lavori recenti, condotti su popolazione in prevenzione secondaria degli studi Fourier e Odissey, mostrano entrambi come utilizzare i GRS sia una strategia molto promettente in tal senso. Entrambi gli studi mostrano infatti come soggetti con GRS più elevato, pur avendo caratteristiche cliniche sovrapponibili a quelli con GRS più basso, hanno una riduzione del rischio relativo e assoluto

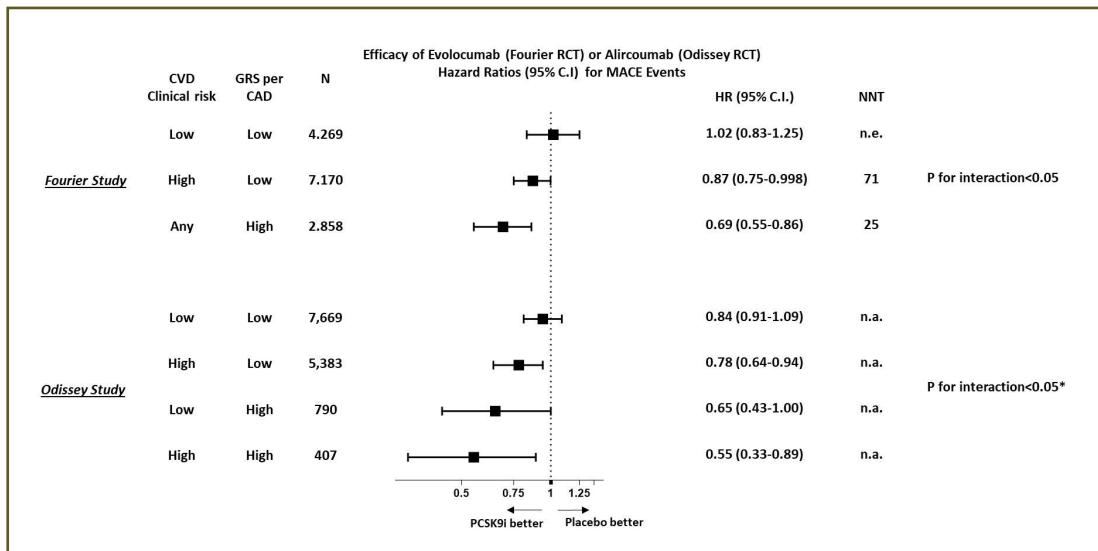


Figura 4 - Efficacia degli inibitori del PCSK9 evolocumab e alirocumab negli studi Foureier e Odissey (pazienti in prevenzione cardiovascolare secondaria) stratificata con la combinazione di informazioni cliniche e genetiche di rischio cardiovascolare CVD. Note: nello studio Fourier lo score clinico di rischio è basato sulla presenza di multipli fattori di rischio, mentre nello studio Odissey esclusivamente sulla base dei valori di colesterolo LDL > 100 mg/dl . NNT=Number Needed to Treat, nel periodo di osservazione degli studi (Fourier 2.3 anni) per prevenire 1 evento MACE. Nello studio Odissey solo la *p* di interazione GRS x trattamento è stata riportata come significativa, l'effetto tra efficacia di alirocumab nel gruppo a basso rischio genetico e clinico è significativamente minore rispetto a quello del gruppo con rischio genetico e clinico elevato. (Adattato da Damask et al, Circulation 2020 e Marston et al Circulation 2020).

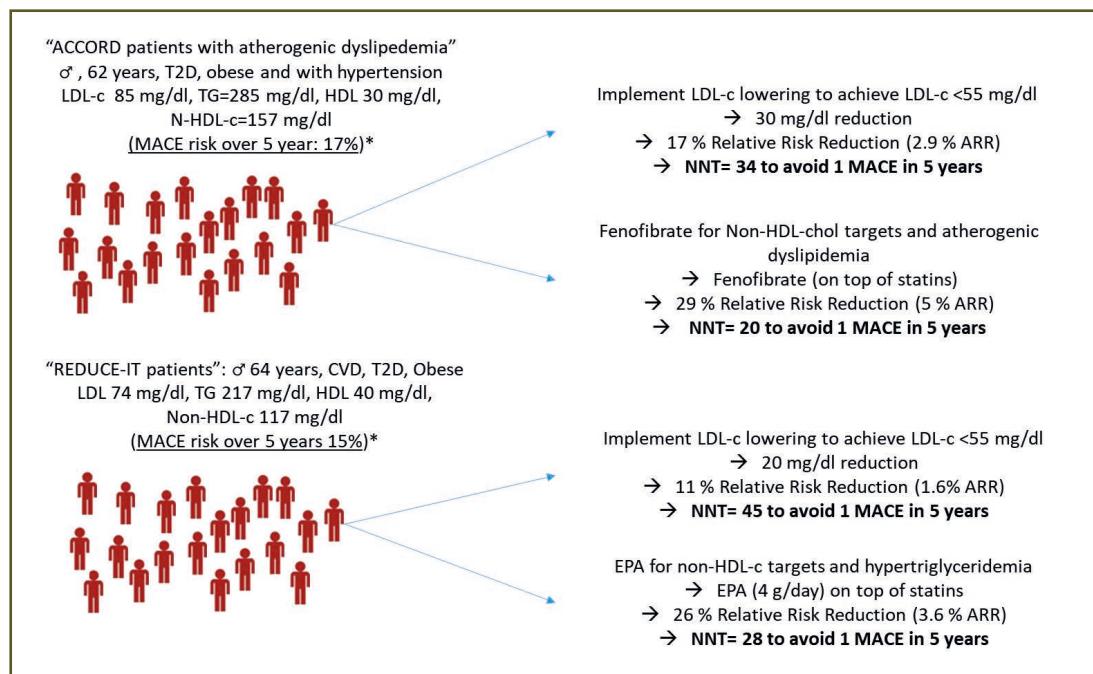


Figura 5 - Stima del beneficio clinico raggiungibile dall'ottimizzazione terapeutica nei pazienti a rischio cardiovascolare molto elevato inclusi nello studio ACCORD e REDUCE-IT (espresso con Number Needed to Treat [NNT] per prevenire 1 evento cardiovascolare maggiore (MACE) in 5 anni]. Note * il rischio di MACE nei 5 anni è derivato dalla popolazione placebo dei 2 studi. (Analisi effettuata sui dati degli studi. Ginsberg et al NEJM 2010, e Bhatt et al, NEJM 2019).

di sviluppare CVD con il trattamento con PCSK9i che è molto maggiore dei soggetti con GRS più basso. Pur con differenze metodologiche, come mostrato in *figura 5*, entrambi gli studi mostrano come la combinazione di informazioni cliniche e genetiche permette di distinguere molto bene i soggetti in cui l'inibitore del PCSK9 fornisce un beneficio limitato o assente (almeno nella breve durata di 2-3 anni degli studi) rispetto a quei soggetti che trarrebbero un elevato beneficio (36, 37). Va sottolineato che i GRS per rischio cardiovascolare usati in questi studi erano diversi tra loro (basati su 27-SNPs associati a CAD nello studio Fourier e su 6 milioni di varianti [genome-wide polygenic risk score] nello studio Odissey), ma entrambi caratterizzati da una significativa interazione con il trattamento con PCSK9i. Questi studi sono stati condotti in popolazioni miste con soggetti diabetici e non, e andranno validati e replicati in studi ad-hoc nei soggetti con diabete; tuttavia, mostrano chiaramente la potenziale utilità clinica di questo approccio.

mento con PCSK9i. Questi studi sono stati condotti in popolazioni miste con soggetti diabetici e non, e andranno validati e replicati in studi ad-hoc nei soggetti con diabete; tuttavia, mostrano chiaramente la potenziale utilità clinica di questo approccio.

Prospettive future: medicina di precisione e terapie ipo-trigliceridemizzanti nel diabète.

Nel controllo delle dislipidemie dei soggetti diabetici è essenziale parlare anche di ipertrigliceridemia e della "dislipidemia aterogena" (caratterizzata da bassi valori di HDL, alti valori di trigliceridi e LDL piccole dense, e quindi più aterogene) (48, 49). Tale condizione è importante per diversi aspetti:

- 1) È più frequente nei soggetti con diabete rispetto alla popolazione generale.
- 2) Predisponde ad un più alto rischio cardiovascolare indipendentemente dai valori di colesterolo LDL (50).
- 3) Permette di identificare i soggetti con beneficio dalle terapie con fibrati (in particolare fenofibrato) e omega-3 (es. acido eicosapentenoico) (7, 48, 51-55).

Questo terzo punto merita una specifica attenzione, infatti se da un lato è assodato che la riduzione degli elevati valori di colesterolo LDL comporta un beneficio cardiovascolare in tutti i pazienti (pur con alcune piccole differenze sulla base delle caratteristiche cliniche e genetiche), le terapie ipo-trigliceridemizzanti sono efficaci solo in alcuni sottogruppi della popolazione. Infatti, se da un lato le meta-analisi sui fibrati e omega-3 mostrano un *trend* per un beneficio nella popolazione “non-stratificata” (riduzione del RR di MACE, intorno al 10%) (51, 56), tale effetto è trainato dagli effetti dei soggetti con dislipidemia aterogenica dove, ad esempio, in maniera consistente e ripetuta in diversi trial clinici i fibrati mostrano una riduzione del rischio di MACE intorno al 35% (51-54). Un dato osservato anche nell'ACCORD che ha testato il fenofibrato in aggiunta alla statina, e in recenti studi *real-world* che hanno adeguatamente valutato l'efficacia del fenofibrato con tecniche di *propensity score matching* (57, 58). In maniera analoga gli studi sugli omega-3, e in particolare sull'acido eicosapentenoico, nelle popolazioni adeguatamente selezionate per avere ipertrigliceridemia hanno confermato la maggior efficacia di prevenzione cardiovascolare in questi sottogruppi (55). L'impatto clinico potenziale del corretto utilizzo di questi farmaci in questo gruppo di soggetti è riassunto in Figura 5. Qui si può vedere come, partendo da una popolazione come quella arruolata negli studi ACCORD o nel più

recente REDUCE-IT, il numero di soggetti da trattare con fenofibrato o EPA per ridurre 1 evento cardiovascolare è per lo meno simile (se non superiore) a quello che si otterrebbe riducendo il colesterolo LDL a valori *target* in queste popolazioni. Pertanto, fermo restando l'importanza di portare i valori di colesterolo LDL al *target* previsto dalle linee guida, identificare sulla base della dislipidemia aterogenica i pazienti con diabete da trattare con questi farmaci potrebbe ridurre significativamente il rischio cardiovascolare in questi soggetti. Inoltre, i nuovi farmaci potenzialmente in arrivo, come il pemaftirato (un modulatore selettivo del peroxisome proliferator-activated receptor-alpha PPAR-alpha) o gli inibitori dell'ANGPTL3 o dell'APOC3 (50), potrebbero portare benefici in questa popolazione.

Approccio farmacogenetico per massimizzare i benefici della terapia con il fenofibrato.

Come descritto precedentemente, la presenza di dislipidemia aterogenica permette quindi di identificare quei soggetti che potrebbero trarre un beneficio importante dalla terapia con fenofibrato, e per cui è al momento suggerito dalle linee guida di considerare la terapia con fenofibrato (7, 48). Tuttavia, come rappresentato in *figura 6*, meno del 20% della popolazione diabetica ha queste caratteristiche e, recentemente, attraverso uno studio di farmacogenetica il nostro gruppo ha identificato una variante comune nella regione di PPARA (il gene codificante per PPAR-alpha, ossia il *target* di fenofibrato) in grado di stratificare ulteriormente i soggetti senza dislipidemia aterogenica, che potrebbero comunque trarre un beneficio cardiovascolare da questa terapia (59). In breve, dall'analisi di oltre 3,500 soggetti inclusi nello studio AC-

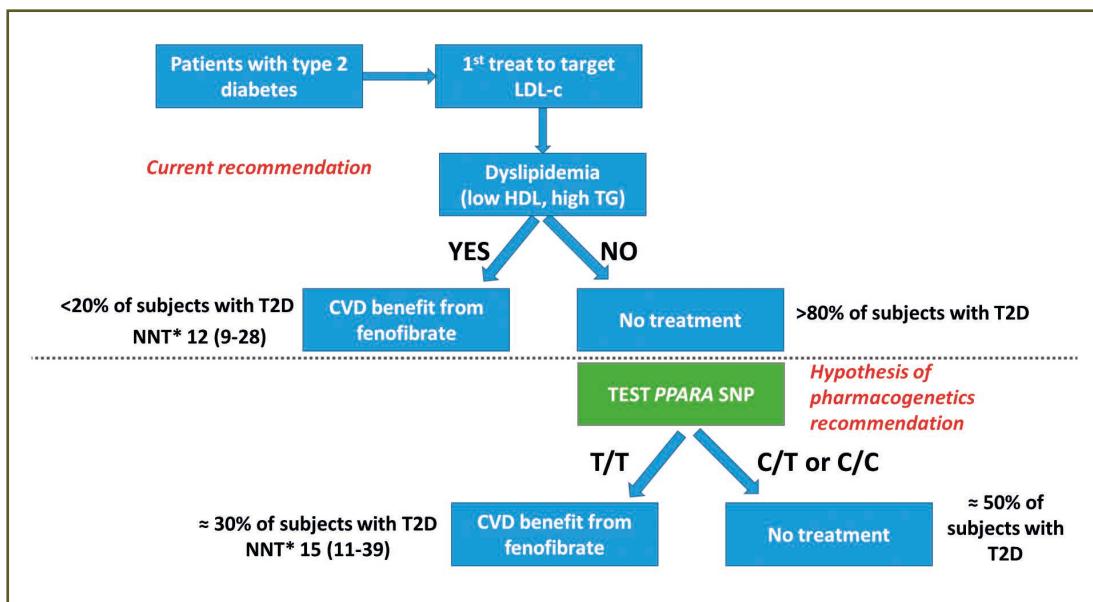


Figura 6 - rappresentazione grafica di un possibile approccio di medicina di precisione per identificare i pazienti con beneficio cardiovascolare dal trattamento con fenofibrato. Number Needed to Treat (NNT) per prevenire 1 evento cardiovascolare maggiore stimato sulla base della popolazione studiata nell'ACCORD di origine ancestrale europea e con informazioni genetiche disponibili. (Adattato da Morieri et al, Diabetes 2020).

CORD-Lipid è stato possibile identificare questa variante (rs6008845) per cui i soggetti omozigoti per l'allele T (circa un terzo dell'intera popolazione), avevano una riduzione del rischio di sviluppare MACE del 49% (HR 0.51, 95% C.I. 0.34-0.72) se randomizzati a fenofibrato+statina rispetto a statina+placebo. Al contrario, i soggetti portatori degli altri genotipi non traevano alcun beneficio dal trattamento (interazione p=0.0004). Il dato è stato poi replicato nella popolazione dei soggetti di origine afroamericana dello studio ACCORD-Lipid e in altre casistiche derivate da studi osservazionali prospettici (studi ACCORD-BP, ORIGIN e TRIUMPH) (59). Il dato clinicamente più rilevante è tuttavia rappresentato dalla scoperta che l'effetto protettivo del fenofibrato nel gruppo T/T era presente anche in assenza di dislipidemia (HR 0.51; 95% C.I. 0.33-0.79, con significativa intera-

zione rs6008845 per fenofibrato anche in questo sottogruppo, p=0.003). Pertanto, come mostrato nella figura 6, questi dati permettono di ipotizzare un approccio combinato tra informazioni cliniche e genetiche, per cui uno possa prima selezionare i pazienti da trattare con fenofibrato in base alla presenza di dislipidemia aterogenea e, se questa fosse assente, sulla base della genotipizzazione di rs6008845. Al momento i meccanismi dietro tale effetto cardiovascolare non sembrano dipendere dagli effetti del fenofibrato sul profilo lipidico e ulteriori studi sono in corso, sia all'Università di Padova e al Joslin Diabetes Center, per fare luce su essi. Tuttavia, anche in assenza di una chiara spiegazione sul meccanismo di azione e, fermo restando la necessità di ulteriori validazioni e studi ad-hoc prima di una possibile raccomandazione nella pratica clinica di routine,

questo approccio farmacogenetico potrebbe avere un impatto clinico rilevante. Infatti, come riportato in *figura 6*, prendendo come riferimento la popolazione di soggetti di origine ancestrale europea dello studio ACCORD, si può osservare che i soggetti senza dislipidemia e genotipo rs6008845 T/T (circa il 28% della popolazione totale) hanno un beneficio clinico (NNT) dal trattamento con fenofibrato del tutto simile a quello dei soggetti con dislipidemia (circa il 20% della popolazione totale). In altre parole, combinando queste informazioni si potrebbero raddoppiare i soggetti che potrebbero trarre beneficio da questa terapia.

Conclusioni e prospettive future

Gli studi *Real-World* condotti in Italia evidenziano come i soggetti con diabete, nonostante l'elevato rischio cardiovascola-

re, abbiano valori di colesterolo LDL e terapie ipolipemizzanti inadeguate rispetto alle raccomandazioni delle attuali linee guida. Migliorare l'utilizzo di queste terapie e raggiungere i *target* di colesterolo LDL permetterebbe di ridurre considerevolmente l'impatto della malattia cardiovascolare nei soggetti diabetici, e rappresenta pertanto uno degli obiettivi clinici principali da prefissarsi nella gestione del paziente con diabete. Inoltre, studi recenti di farmacogenetica stanno dimostrando in maniera sempre più convincente come la combinazione di informazioni cliniche e genetiche permetterebbe di identificare con maggiore precisione i soggetti in grado di trarre i maggiori benefici dalle terapie più intensive (es. iPCSK9) o più specifiche (es. fenofibrato). È quindi lecito attendersi, in un futuro prossimo, una gestione delle dislipidemie nel paziente diabetico sempre più basata sulla medicina di precisione.

RIASSUNTO

Il ruolo causale del colesterolo LDL nell'aterogenesi e nelle malattie cardiovascolari è stato chiarito negli ultimi decenni sia nei soggetti con che senza diabete. In linea con questo, e con la disponibilità di farmaci ad alta intensità che abbassano l'LDL-c (es. inibitori di PCSK9, combinazione di statine ad alta intensità ed ezetimibe), le strategie di prevenzione cardiovascolare hanno raccomandato il raggiungimento di obiettivi di LDL-c progressivamente più bassi nel corso degli anni. In questa rassegna dimostriamo che, come riportato nella popolazione generale, anche tra i soggetti con diabete queste raccomandazioni sono scarsamente implementate nel contesto del "mondo reale". Tale distanza tra la pratica clinica quotidiana e la raccomandazione delle linee guida ha un grave peso in termine di salute pubblica. Nei prossimi dieci anni, se invariata, potrebbe essere responsabile di migliaia di eventi cardiovascolari evitabili tra i soggetti con diabete in Italia. Sebbene ciò rappresenti una delle più importanti esigenze cliniche insoddisfatte per la prevenzione cardiovascolare nel diabete, nuovi studi stanno aprendo la strada a un approccio di "medicina di precisione" per affrontare le esigenze future nel trattamento della dislipidemia. Lo studio genetico ed epidemiologico ha rinvigorito l'importanza di abbassare le lipoproteine ricche di trigliceridi e ha dimostrato che i trattamenti ipotrigliceridemizzanti (ad esempio fenofibrato o acidi grassi omega-3) potrebbero essere efficaci nella prevenzione cardiovascolare se utilizzati in una popolazione ben selezionata. Questa revisione è quindi focalizzata anche su nuovi approcci terapeutici, che combinando informazioni cliniche e genetiche consentiranno di migliorare la valutazione del rischio cardiovascolare e di identificare i soggetti con una migliore risposta a trattamenti intensivi o specifici (es. studi farmacogenetici su PCSK9i e fenofibrato), rappresentando quindi la direzione futura per migliorare le strategie di prevenzione cardiovascolare nei pazienti con diabete.

Parole chiave: Farmacogenetica, diabete, dislipidemia, aterogenesi, malattia cardiovascolare, Studi real world.

Bibliografia

1. Rawshani A, Rawshani A, Franzen S et al. Mortality and Cardiovascular Disease in Type 1 and Type 2 Diabetes. *The New England journal of medicine.* 2017; 376: 1407-1418.
2. Pearson-Stuttard J, Bennett J, Cheng YJ et al. Trends in predominant causes of death in individuals with and without diabetes in England from 2001 to 2018: an epidemiological analysis of linked primary care records. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2021; 9: 165-173.
3. Cholesterol Treatment Trialists Collaboration, Baigent C, Blackwell L et al. Efficacy and safety of more intensive lowering of LDL cholesterol: a meta-analysis of data from 170,000 participants in 26 randomised trials. *Lancet.* 2010; 376: 1670-1681.
4. Emerging Risk Factors Collaboration, Sarwar N, Gao P et al. Diabetes mellitus, fasting blood glucose concentration, and risk of vascular disease: a collaborative meta-analysis of 102 prospective studies. *Lancet.* 2010; 375: 2215-2222.
5. Cosentino F, Grant PJ, Aboyans V et al. 2019 ESC Guidelines on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases developed in collaboration with the EASD. *Eur Heart J* 2020;41:255-323.
6. Wang L, Li X, Wang Z et al. Trends in Prevalence of Diabetes and Control of Risk Factors in Diabetes Among US Adults, 1999-2018. *JAMA.* 2021.
7. American Diabetes A. 10. Cardiovascular Disease and Risk Management: Standards of Medical Care in Diabetes-2021. *Diabetes Care.* 2021; 44: S125-S150.
8. Mach F, Baigent C, Catapano AL et al. 2019 ESC/EAS guidelines for the management of dyslipidaemias: Lipid modification to reduce cardiovascular risk. *Atherosclerosis.* 2019; 290: 140-205.
9. Ference BA, Ginsberg HN, Graham I et al. Low-density lipoproteins cause atherosclerotic cardiovascular disease. 1. Evidence from genetic, epidemiologic, and clinical studies. A consensus statement from the European Atherosclerosis Society Consensus Panel. *Eur Heart J.* 2017; 38: 2459-2472.
10. Rawshani A, Rawshani A, Franzen S et al. Risk Factors, Mortality, and Cardiovascular Outcomes in Patients with Type 2 Diabetes. *The New England journal of medicine.* 2018; 379: 633-644.
11. Cholesterol Treatment Trialists Collaborators, Kearney PM, Blackwell L et al. Efficacy of cholesterol-lowering therapy in 18,686 people with diabetes in 14 randomised trials of statins: a meta-analysis. *Lancet.* 2008; 371: 117-125.
12. Ray KK, Molemans B, Schoonen WM et al. EU- Wide Cross-Sectional Observational Study of Lipid-Modifying Therapy Use in Secondary and Primary Care: the DA VINCI study. *Eur J Prev Cardiol.* 2020.
13. Yao X, Shah ND, Gersh BJ, Lopez-Jimenez F, Noseworthy PA. Assessment of Trends in Statin Therapy for Secondary Prevention of Atherosclerotic Cardiovascular Disease in US Adults From 2007 to 2016. *JAMA Netw Open.* 2020; 3: e2025505.
14. Bruckert E, Parhofer KG, Gonzalez-Juanatey JR et al. Proportion of High-Risk/Very High-Risk Patients in Europe with Low-Density Lipoprotein Cholesterol at Target According to European Guidelines: A Systematic Review. *Adv Ther.* 2020; 37: 1724-1736.
15. Arca M, Ansell D, Averna M et al. Statin utilization and lipid goal attainment in high or very-high cardiovascular risk patients: Insights from Italian general practice. *Atherosclerosis.* 2018; 271: 120-127.
16. Allahyari A, Jernberg T, Lautsch D et al. LDL-cholesterol target attainment according to the 2011 and 2016 ESC/EAS dyslipidaemia guidelines in patients with a recent myocardial infarction - nationwide cohort study, 2013-2017. *Eur Heart J Qual Care Clin Outcomes.* 2020.
17. Morrieri ML, Avogaro A, Fadini GP. Cholesterol lowering therapies and achievement of targets for primary and secondary cardiovascular prevention in type 2 diabetes: unmet needs in a large population of outpatients at specialist clinics. *Cardiovasc Diabetol.* 2020; 19: 190.
18. Morrieri ML, Perrone V, Veronesi C et al. Improving statin treatment strategies to reduce LDL-cholesterol: factors associated with targets' attainment in subjects with and without type 2 diabetes. *Cardiovasc Diabetol.* 2021; 20: 144.
19. Fadini GP, Zatti G, Consoli A et al. Rationale and design of the DARWIN-T2D (DApagliflozin Real World evIdeNce in Type 2 Diabetes): A multicenter retrospective nationwide Italian study and crowdsourcing opportunity. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2017; 27: 1089-1097.
20. Fadini GP, Solini A, Manca ML et al. Phenotyping normal kidney function in elderly patients with type 2 diabetes: a cross-sectional multicentre study. *Acta Diabetol.* 2018; 55: 1121-1129.
21. Mach F, Baigent C, Catapano AL et al. 2019 ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: lipid modification to reduce cardiovascular risk. *Eur Heart J.* 2019.
22. Kotseva K, De Backer G, De Bacquer D et al. Lifestyle and impact on cardiovascular risk factor control in coronary patients across 27 countries: Results from the European Society of Cardiology

- ESC-EORP EUROASPIRE V registry. Eur J Prev Cardiol. 2019; 26: 824-835.
23. Avogaro A, Guida P, Giorda C et al. The under-use of statin in type 2 diabetic patients attending diabetic clinics in Italy. Nutr Metab Cardiovasc Dis. 2007; 17: 32-40.
 24. Guglielmi V, Bellia A, Pecchioli S et al. Effectiveness of adherence to lipid lowering therapy on LDL-cholesterol in patients with very high cardiovascular risk: A real-world evidence study in primary care. Atherosclerosis. 2017; 263: 36-41.
 25. Karalis DG, Wild RA, Maki KC et al. Gender differences in side effects and attitudes regarding statin use in the Understanding Statin Use in America and Gaps in Patient Education (USAGE) study. J Clin Lipidol. 2016; 10: 833-841.
 26. Alwhaibi M, Altoaimi M, AlRuthia Y et al. Adherence to Statin Therapy and Attainment of LDL Cholesterol Goal Among Patients with Type 2 Diabetes and Dyslipidemia. Patient Prefer Adherence. 2019; 13: 2111-2118.
 27. Chi MD, Vansomphone SS, Liu IL et al. Adherence to statins and LDL-cholesterol goal attainment. Am J Manag Care. 2014; 20: e105-e112.
 28. Stroes ES, Thompson PD, Corsini A et al. Statin-associated muscle symptoms: impact on statin therapy-European Atherosclerosis Society Consensus Panel Statement on Assessment, Aetiology and Management. Eur Heart J. 2015; 36: 1012-1022.
 29. Zhou Z, Albarqouni L, Curtis AJ, Breslin M, Nelson M. The Safety and Tolerability of Statin Therapy in Primary Prevention in Older Adults: A Systematic Review and Meta-analysis. Drugs & aging. 2020; 37: 175-185.
 30. Gupta A, Thompson D, Whitehouse A et al. Adverse events associated with unblinded, but not with blinded, statin therapy in the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial-Lipid-Lowering Arm (ASCOT-LLA): a randomised double-blind placebo-controlled trial and its non-randomised non-blind extension phase. Lancet. 2017; 389: 2473-2481.
 31. Herrett E, Williamson E, Brack K et al. Statin treatment and muscle symptoms: series of randomised, placebo controlled n-of-1 trials. Bmj. 2021; 372: n135.
 32. Barsky AJ, Saintfort R, Rogers MP, Borus JF. Nonspecific medication side effects and the placebo phenomenon. JAMA. 2002; 287: 622-627.
 33. Peterson GG, Pu J, Magid DJ et al. Effect of the Million Hearts Cardiovascular Disease Risk Reduction Model on Initiating and Intensifying Medications: A Prespecified Secondary Analysis of a Randomized Clinical Trial. JAMA Cardiol. 2021; 6: 1050-1059.
 34. Morieri ML, Gao H, Pigeyre M et al. Genetic Tools for Coronary Risk Assessment in Type 2 Diabetes: A Cohort Study From the ACCORD Clinical Trial. Diabetes Care. 2018; 41: 2404-2413.
 35. Mega JL, Stitzel NO, Smith JG et al. Genetic risk, coronary heart disease events, and the clinical benefit of statin therapy: an analysis of primary and secondary prevention trials. Lancet. 2015; 385: 2264-2271.
 36. Marston NA, Kamanu FK, Nordio F et al. Predicting Benefit From Evolocumab Therapy in Patients With Atherosclerotic Disease Using a Genetic Risk Score: Results From the FOURIER Trial. Circulation. 2020; 141: 616-623.
 37. Damask A, Steg PG, Schwartz GG et al. Patients With High Genome-Wide Polygenic Risk Scores for Coronary Artery Disease May Receive Greater Clinical Benefit From Alirocumab Treatment in the ODYSSEY OUTCOMES Trial. Circulation. 2020; 141: 624-636.
 38. Morieri ML, Shah H, Doria A, the Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes Genetic Study G. Variants in ANGPTL4 and the Risk of Coronary Artery Disease. The New England journal of medicine. 2016; 375: 2304-2305.
 39. Kessler T, Vilne B, Schunkert H. The impact of genome-wide association studies on the pathophysiology and therapy of cardiovascular disease. EMBO Mol Med. 2016; 8: 688-701.
 40. Khera AV, Chaffin M, Aragam KG et al. Genome-wide polygenic scores for common diseases identify individuals with risk equivalent to monogenic mutations. Nat Genet. 2018; 50: 1219-1224.
 41. Khera AV, Chaffin M, Zekavat SM et al. Whole-Genome Sequencing to Characterize Monogenic and Polygenic Contributions in Patients Hospitalized With Early-Onset Myocardial Infarction. Circulation. 2019; 139: 1593-1602.
 42. Abraham G, Havulinna AS, Bhalala OG et al. Genomic prediction of coronary heart disease. Eur Heart J. 2016; 37: 3267-3278.
 43. Inouye M, Abraham G, Nelson CP et al. Genomic Risk Prediction of Coronary Artery Disease in 480,000 Adults: Implications for Primary Prevention. J Am Coll Cardiol. 2018; 72: 1883-1893.
 44. Hindy G, Aragam KG, Ng K et al. Genome-Wide Polygenic Score, Clinical Risk Factors, and Long-Term Trajectories of Coronary Artery Disease. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2020; 40: 2738-2746.
 45. Elliott J, Bodinier B, Bond TA et al. Predictive Accuracy of a Polygenic Risk Score-Enhanced Prediction Model vs a Clinical Risk Score for Coronary Artery Disease. JAMA. 2020; 323: 636-645.
 46. Steg PG, Szarek M, Bhatt DL et al. Effect of Aliro-

- cumab on Mortality After Acute Coronary Syndromes. *Circulation.* 2019; 140: 103-112.
47. Schwartz GG, Steg PG, Szarek M et al. Alirocumab and Cardiovascular Outcomes after Acute Coronary Syndrome. *The New England journal of medicine.* 2018; 379: 2097-2107.
48. Ferrari R, Aguiar C, Alegria E et al. Current practice in identifying and treating cardiovascular risk, with a focus on residual risk associated with atherogenic dyslipidaemia. *Eur Heart J Suppl.* 2016; 18: C2-C12.
49. Taskinen MR, Boren J. New insights into the pathophysiology of dyslipidemia in type 2 diabetes. *Atherosclerosis.* 2015; 239: 483-495.
50. Ginsberg HN, Packard CJ, Chapman MJ et al. Triglyceride-rich lipoproteins and their remnants: metabolic insights, role in atherosclerotic cardiovascular disease, and emerging therapeutic strategies-a consensus statement from the European Atherosclerosis Society. *Eur Heart J.* 2021.
51. Jun M, Foote C, Lv J et al. Effects of fibrates on cardiovascular outcomes: a systematic review and meta-analysis. *Lancet.* 2010; 375: 1875-1884.
52. Sacks FM, Carey VJ, Fruchart JC. Combination lipid therapy in type 2 diabetes. *The New England journal of medicine* 2010;363:692-4; author reply. 694-695.
53. Bruckert E, Labreuche J, Deplanque D, Touboul PJ, Amarenco P. Fibrates effect on cardiovascular risk is greater in patients with high triglyceride levels or atherogenic dyslipidemia profile: a systematic review and meta-analysis. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2011; 57: 267-272.
54. Nam Hoon Kim KHH, Jimi Choi, Juneyoung Lee, Sin Gon Kim. Use of fenofibrate on cardiovascular outcomes in statin users with metabolic syndrome: propensity matched cohort study. *Bmj.* 2019; 366.
55. Bhatt DL, Steg PG, Miller M et al. Cardiovascular Risk Reduction with Icosapent Ethyl for Hypertriglyceridemia. *The New England journal of medicine.* 2019; 380: 11-22.
56. Hu Y, Hu FB, Manson JE. Marine Omega-3 Supplementation and Cardiovascular Disease: An Updated Meta-Analysis of 13 Randomized Controlled Trials Involving 127 477 Participants. *J Am Heart Assoc.* 2019; 8: e013543.
57. Kim NH, Han KH, Choi J, Lee J, Kim SG. Use of fenofibrate on cardiovascular outcomes in statin users with metabolic syndrome: propensity matched cohort study. *Bmj.* 2019; 366: l5125.
58. Jo SH, Nam H, Lee J, Park S, Lee J, Kyoung DS. Fenofibrate Use Is Associated With Lower Mortality and Fewer Cardiovascular Events in Patients With Diabetes: Results of 10,114 Patients From the Korean National Health Insurance Service Cohort. *Diabetes Care.* 2021; 44: 1868-1876.
59. Morieri ML, Shah HS, Sjaarda J et al. PPARA Polymorphism Influences the Cardiovascular Benefit of Fenofibrate in Type 2 Diabetes: Findings From ACCORD-Lipid. *Diabetes.* 2020; 69: 771-783.

AFERESI

AFERESI LIPOPROTEICA E PCSK9I: QUALE INTEGRAZIONE?

Lipoprotein Apheresis and PCSK9inhibitors: which integration?

MARIA GRAZIA ZENTI, MD, PHD

UOC Endocrinologia, Diabetologia e Metabolismo, AOUI Verona

SUMMARY

A combination therapy with PCSK9-inhibitors (PCSK9-i) and lipoprotein-apheresis (LA) may have synergistic effects on circulating lipid and lipoprotein levels. In patients with therapy-refractory hypercholesterolemia, coexisting elevated Lp(a) and progressive cardiovascular disease the combination of LA and PCSK9i could provide a strong risk management and attenuate the LDL-C rebound following LA sessions. Data from both randomised controlled trials and real-world cohorts have reported that the combined treatment with PCSK9 monoclonal antibodies and apheresis may be preferable in certain hypercholesterolaemic patients because of the combined benefits of both approaches in lowering LDL-cholesterol, inflammation, hemorheology and Lp(a). Therefore, LA preserve its valuable role also in the new lipid-lowering era.

Key words: *Lipoprotein Apheresis, PCSK9, Lipoprotein (a).*

Introduzione

La dislipidemia, in particolare quando caratterizzata da elevati livelli di colesterolo LDL e/o di Lipoproteina(a), rappresenta il principale fattore causale della malattia cardiovascolare e della sua progressione. L'armamentario farmacologico ipolipemizzante di cui oggi disponiamo (statine, fibrati, ezetimibe, inibitori di PCSK9, lomitapi-

de) ci permette di realizzare un approccio personalizzato in ciascun paziente per ottenere la riduzione delle lipoproteine aterogene e degli eventi cardiovascolari. Tuttavia, in pazienti con forme genetiche di dislipidemia e negli intolleranti alla terapia farmacologica, non sempre si raggiungono i target raccomandati per una efficace prevenzione o arresto della progressione dell'aterosclerosi. In questo contesto, l'aferesi lipoproteica rappresenta ancora una irrinunciabile opzione terapeutica.

Indirizzo per la corrispondenza

Maria Grazia Zenti
UOC Endocrinologia, Diabetologia e
Metabolismo, AOUI Verona.
E-mail: mgzenti@gmail.com

Aferesi Lipoproteica: attuali indicazioni

L'Aferesi Lipoproteica (AL) promuove la rimozione selettiva, da plasma o da sangue intero, delle lipoproteine contenenti

Tabella I - Indicazione all'Aferesi Lipoproteica secondo le Linee Guida ASFA 2019 (I).

Patologia	Indicazione	Tecnica Aferetica	Classe di indicazione	Grado di evidenza
Ipercolesterolemia Familiare	Omozigote	Aferesi Lipoproteica	I	IA
	Eterozigote	Aferesi Lipoproteica	II	IA
	Omozigote/Eterozigote	Scambio plasmatico	II	IB
Lp(a)iperlipoproteinemia	Malattia Aterosclerotica Cardiovascolare Progressiva	Aferesi Lipoproteica	II	IB

apoB100 [VLDL, IDL, LDL, Lp(a)] con metodiche chimico-fisiche o immunologiche. Le più recenti Linee Guida della Società Americana di Aferesi Terapeutica (ASFA 2019) (1) considerano l'aferesi lipoproteica una terapia appropriata per il trattamento dell'ipercolesterolemia familiare con diverso grado di raccomandazione secondo la forma genetica (*Tabella 1*).

Un singolo trattamento aferetico determina una riduzione di oltre il 50% delle lipoproteine aterogene, tuttavia già nelle 24-48 ore successive all'aferesi si assiste ad un graduale innalzamento della colesterolemia che raggiunge valori prossimi a quelli pre-aferesi dopo 10-13 giorni: ciò è dovuto sia alla mobilizzazione del colesterolo dai depositi periferici, sia alla sintesi epatica di nuovo colesterolo. La terapia di combinazione dell'aferesi con statine e altri farmaci ipolipemizzanti ne aumenta l'efficacia terapeutica permettendo di rallentare la risalita della colesterolemia nei giorni successivi al trattamento. Con l'introduzione nella pratica clinica di nuove classi di farmaci ipolipemizzanti (in particolare gli inibitori di PCSK9 e lomitapide), un gran numero di pazienti con ipercolesterolemie familiari ha potuto ridurre la frequenza dei trattamenti aferetici e in alcuni casi sospenderli.

Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin 9 (PCSK9)

PCSK9 (*proprotein convertase subtilisin/kexin 9*) è una proteina di 692 aminoaci-

di appartenente alla famiglia delle proteine convertasi che è in grado di legare il recettore LDL (LDLR) sia a livello intracellulare, sia sulla superficie della membrana plasmatica degli epatociti. Attraverso questo meccanismo, PCSK9 favorisce la degradazione di LDLR in epatociti, fibroblasti e macrofagi. Mutazioni del gene PCSK9 che ne aumentano l'attività (*gain of function*, GOF) sono state riscontrate in pazienti con ipercolesterolemia autosomica dominante, mentre mutazioni con perdita di funzione sono state associate a bassi livelli di colesterolo LDL (LDL-C) e ridotto rischio cardiovascolare (CV), rivelando un ruolo importante di PCSK9 nella regolazione dei livelli di LDL-C (2-3). Queste osservazioni hanno stimolato un'intensa attività di ricerca su PCSK9, rendendo questa proteina un *target* per lo sviluppo di nuove terapie per il trattamento dell'ipercolesterolemia.

Gli approcci terapeutici approvati o in sviluppo clinico per l'inibizione della proteina sono attualmente due: gli *short interfering RNA* (siRNA) per PCSK9 che agiscono a livello intracellulare riducendo la sintesi di PCSK9 (inclisiran) (4), e gli anticorpi monoclonali anti-PCSK9 (5-6).

Tra i diversi anticorpi monoclonali diretti contro PCSK9, Alirocumab ed Evolocumab, approvati a fine 2015 dall'Agenzia Europea del farmaco, hanno dimostrato la loro efficacia nel ridurre in modo massivo i livelli di LDL-C e il rischio CV nei pazienti con ipercolesterolemia familiare (HeFH), ad

alto rischio cardiovascolare o intolleranti alle statine (7-8).

Esperienze di integrazione dell'Aferesi Lipoproteica con gli inibitori di PCSK9i (PCSK9i)

L'introduzione nella pratica clinica dei PCSK9i ha prospettato la possibilità di una nuova gestione terapeutica dei pazienti con forme genetiche di ipercolesterolemia in trattamento cronico con AL. Per questo, alcuni studi clinici randomizzati controllati sono stati disegnati per valutare l'effetto di questa classe di farmaci sulla gestione della terapia aferetica in termini di variazioni della frequenza di trattamento e possibilità di sospensione.

Lo studio ODISSEY ESCAPE (9) ha randomizzato 62 pazienti HeFH, in regolare trattamento aferetico, a ricevere Alirocumab 150 mg sc ogni 2 settimane o placebo, per 18 settimane. A partire dalla VII settimana la frequenza del trattamento aferetico poteva essere modulata in base ai livelli di LDL-C, e veniva sospesa quando la riduzione di LDL-C risultava > del 30% rispetto ai valori basali (pre-aferesi). Nel braccio di trattamento con alirocumab, l'AL è stata sospesa nel 63,4% dei pazienti e la frequenza di trattamento è stata almeno dimezzata nel 93% dei soggetti.

Evolocumab è stato valutato nello studio multicentrico DE LAVAL (10) che ha coinvolto 15 centri in Australia, Europa e Stati Uniti, con lo scopo di valutarne l'effetto sulla possibilità di ridurre/sospendere i trattamenti aferetici in pazienti in trattamento cronico con AL. Sono stati arruolati 39 pazienti trattati stabilmente con AL, randomizzati a proseguire il trattamento aferetico (n=20) o a sospendere l'AL e avviare terapia con evolocumab 140 mg sc ogni 2 settimane (n=19), per 6 settimane. Dopo 6 settimane tutti i pazienti sono stati trattati con evolocumab *open-label* per altre 18 settimane. L'end-

point primario era la sospensione dell'AL sulla base del raggiungimento di valori pre-aferesi di LDL-C <2.6 mmol/L ottenuti alla IV settimana. Al termine delle 6 settimane l'84% dei pazienti in trattamento con evolocumab ha potuto sospendere l'aferesi, e alla fine dello studio (24 settimane) l'aferesi è stata sospesa in 30 pazienti (77%).

Anche nella nostra esperienza clinica l'introduzione dei PCSK9i ha permesso di sospendere l'AL mantenendo un adeguato controllo dei livelli di LDL-C (11), tuttavia il nostro studio ha anche messo in evidenza come l'aferesi sia più efficace dei PCSK9i nel ridurre i livelli di Lp(a) (-69% vs -12%) e i livelli di PCR (-60,1% vs +36,4%).

Un altro ambito di interesse clinico è rappresentato dal trattamento di pazienti intolleranti alle statine che risultano "poor-responder" o "non-responder" ai PCSK9i.

Nello studio di Sbrana et al (12) su 18 pazienti HeFH intolleranti alle statine, l'aggiunta in terapia degli anticorpi monoclonali anti PCSK9 (15 evolocumab e 3 alirocumab) ha ottenuto valori di LDL-C <70 mg/dl solo in 5 pazienti su 18 (28%), mentre in 7 pazienti (39%) i valori di LDL-C erano compresi fra 71 e 100 mg/dl, e in 6 pazienti (33%) i valori di LDL-C risultavano >100 mg/dl. Pertanto in questi pazienti, che sono a rischio CV molto alto, l'AL rimane una irrinunciabile opzione terapeutica e la strategia di associazione con i PCSK9i offre il vantaggio di un significativo effetto sinergico nella riduzione del LDL-C (13).

L'utilità della terapia di combinazione AL + PCSK9i è stata confermata in un ampio studio osservazionale "real world" che ha raccolto l'esperienza di 10 centri di aferesi in Germania (14). In 110 pazienti HeFH o con Lp(a)iperlipoproteinemia e malattia aterosclerotica-CV la terapia ipolipemizzante è stata progressivamente intensificata con l'uso sia dei PCSK9i che dell'AL. In questo contesto, il 55,5% dei pazienti ha

mantenuto la terapia di combinazione di AL + PCSK9i; il 15.5% dei pazienti ha potuto sospendere l'aferesi e proseguire con i PCSK9i, mentre nei 32 pazienti (29.1%) che hanno sospeso i PCSK9i per effetti collaterali (22.7%) o perché non responder (6.4%) si è mantenuto solo il trattamento con AL.

Nell'esperienza di Tselmin et al (15) su 40 pazienti in terapia aferetica in cui è stata avviato anche il trattamento con PCSK9i, in 10 pazienti (25%) è stato possibile sospendere l'aferesi, 4 pazienti hanno sospeso il PCSK9i per effetti avversi, e pertanto hanno proseguito con l'AL, mentre la maggior parte dei pazienti (65%) ha mantenuto la terapia di combinazione,

Nell'insieme i dati di "real world" mostrano come nei pazienti con forme genetiche di ipercolesterolemia e malattia aterosclerotica CV, l'aferesi rappresenta un indi-

spensabile strumento per il raggiungimento dei target raccomandati di LDL-C.

L'Aferesi Lipoproteica e PCSK9i nel trattamento della Lipoproteina(a) iperlipoproteinemia

Studi clinici randomizzati (6-7) e studi di coorte "real world" hanno dimostrato che il trattamento con PCSK9i può determinare una riduzione di Lp(a) del 20-25%, con una risposta terapeutica variabile e apparentemente in relazione ai livelli basali di Lp(a) (12, 16).

In una sottoanalisi dello studio FOURIER (17) è stata evidenziata una riduzione di Lp(a) del 16% nei pazienti che presentavano valori basali di Lp(a) > a 66 mg/dL.

Nell'analisi *post hoc* dello studio ODYSSEY OUTCOMES (18), alirocumab determinava una riduzione assoluta di Lp(a) pro-

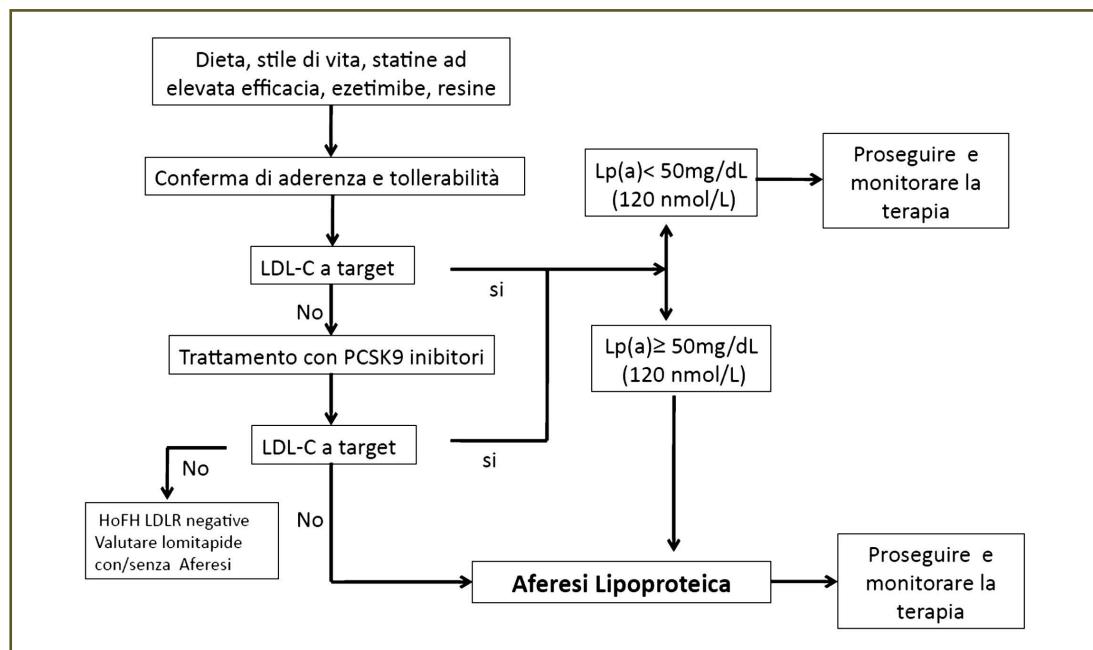


Figura 1 - (Adattata da Stefanutti, Zenti. Current Pharmaceutical Design 2018; 24: 1-4.).

Algoritmo di trattamento nei pazienti a rischio cardiovascolare alto e molto alto. Il dosaggio di Lp(a) risulta cruciale per l'indicazione al trattamento aferetico. L'effetto sinergico dell'aferesi con le nuove classi di farmaci ipopolipemizzanti (Lomitapide o PCSK9i) permette di raggiungere i target raccomandati e può consentire di ridurre la frequenza dei trattamenti aferetici (dal trattamento settimanale al trattamento ogni 2 settimane).

gressivamente maggiore nei 4 quartili di Lp(a) basale (-5.1 mg/dL per il secondo quartile, -9.9 mg/dL per il terzo quartile e -20.2 per il quarto quartile) e ogni riduzione di 5 mg/dL di Lp(a) prediceva una riduzione relativa del 2.5% degli eventi CV. Gli autori concludevano che la riduzione di Lp(a) contribuisce indipendentemente alla riduzione degli eventi CV, supportando il concetto che Lp(a) rappresenta un *target* di intervento nei pazienti dopo Sindrome Coronarica Acuta.

Queste conclusioni sono una conferma che i rischi associati a LDL-C e a Lp(a) sono indipendenti e che, quando il rischio associato al colesterolo LDL viene controllato dalla terapia con statine e altri agenti ipolipemizzanti, il rischio residuo associato a Lp(a) diviene cruciale (19).

Pertanto per i pazienti con malattia aterosclerotica CV progressiva ed elevati livelli di Lp(a) è necessario ricorrere a strategie di intervento di dimostrata efficacia. Attualmente l'AL rappresenta ancora l'unica terapia per i pazienti con iperLp(a) e cardiopatia ischemica come dimostrato anche nell'esperienza italiana del GILA (Gruppo Interdisciplinare aferesi LipoproteicA) (20). In attesa che nuove strategie farmacologiche specifiche per la riduzione di Lp(a) divengano disponibili, l'associazione dell'AL con i PCSK9i risulta una strategia efficace

che consente di ridurre la frequenza dei trattamenti aferetici migliorando la qualità di vita dei pazienti (21).

Pertanto il dosaggio dei livelli di Lp(a), che è raccomandato in tutti i soggetti ad alto rischio cardiovascolare, diviene uno strumento per personalizzare la strategia di cura integrando l'AL con i farmaci attualmente disponibili secondo un algoritmo proposto nella *figura 1* (22).

Conclusioni

Le attuali linee guida EAS/ESC (23), per le categorie di soggetti a rischio CV molto alto raccomandano la terapia con statina ad elevata efficacia in associazione con ezetimibe e, se il target di LDL-C (<55 mg/dL) non viene raggiunto, è prevista la terapia con PCSK9i. Per i pazienti con Lp(a) iperlipoproteinemia e malattia aterosclerotica CV progressiva e per i pazienti ad alto rischio che sono intolleranti alle statine e/o "non-responder" ai PCSK9i, l'AL mantiene il ruolo di prezioso strumento terapeutico.

L'indubbio ulteriore vantaggio dell'AL è il costante controllo medico: la frequentazione periodica e regolare di un centro di terapia aferetica costituisce una solida "alleanza" medico-paziente che può rappresentare un plus da non sottovalutare in particolari condizioni.

RIASSUNTO

La terapia di combinazione dei PCSK9 inibitori con l'aferesi lipoproteica (LA) può avere un effetto sinergico nel ridurre i lipidi circolanti. In pazienti ipercolesterolemici, refrattari al trattamento ipolipemizzante e in presenza di elevati livelli di Lp(a) e di malattia CV progressiva, la combinazione dell'aferesi con i PCSK9i può attenuare il rebound del colesterolo-LDL al termine della sessione aferetica con un migliore impatto nella gestione del rischio.

Studi clinici controllati e studi di coorte *real world* hanno dimostrato che l'associazione dei PCSK9i con l'aferesi può essere preferibile in alcuni *setting* clinici per l'effetto combinato di riduzione del colesterolo LDL, dei livelli di Lp(a), dell'infiammazione e miglioramento dell'emoreologia. Pertanto, l'AL mantiene il suo prezioso ruolo anche nell'era dei nuovi farmaci ipolipemizzanti.

Parole chiave: Aferesi Lipoproteica, PCSK9, Lipoproteina(a).

Bibliografia

1. Padmanabhan A, Connely-Smith L, Aqui N, et al. Guidelines on the Use of Therapeutic Apheresis in Clinical Practice-Evidence-based Approach from the Writing Committee of America Society for Apheresis: The Eight Special Issue. *J Clin Apher.* 2019; 34: 171-354.
2. Cohen JC, Boerwinkle E, Mosley TH, Jr., et al. Sequence variations in PCSK9, low LDL, and protection against coronary heart disease. *N Engl J Med.* 2006; 354: 1264-1272.
3. Kathiresan S. A PCSK9 missense variant associated with a reduced risk of early-onset myocardial infarction. *N Engl J Med.* 2008; 358: 2299-2300.
4. Ray KK, Phil M, Scott Wright R, Kallend D, et al. Two Phase 3 Trials of Inclisiran in Patients with Elevated LDL Cholesterol. *N Engl J Med.* 2020; 382: 1507-1519.
5. Robinson JG, Farnier M, Krempf M, et al. Efficacy and safety of alirocumab in reducing lipids and cardiovascular events. *N Engl J Med.* 2015; 372: 1489-1499.
6. Sabatine MS, Giugliano RP, Wiviott SD, et al. Efficacy and safety of evolocumab in reducing lipids and cardiovascular events. *N Engl J Med.* 2015; 372: 1500-1509.
7. Sabatine MS, Giugliano RP, Keech AC, et al. Evolocumab and clinical outcomes in patients with cardiovascular disease. *Engl J Med.* 2017; 376: 1713-1722.
8. Schwartz GG, Steg PG, Szarek M, et al. Alirocumab and cardiovascular outcomes after acute coronary syndrome. *N Engl J Med.* 2018; 379: 2097-2107.
9. Moriarty PM, Pahofer KG, Babirak SP et al. Alirocumab in patients with heterozygous familial hypercholesterolemia undergoing lipoprotein apheresis: the ODYSEY ESCAPE trial. *Eur Heart J.* 2016; 37: 3588-3595
10. Baum SJ, Sampietro T, Datta D et al. Effect of Evolocumab on lipoprotein apheresis requirement and lipid levels: Results of the randomized, controlled, open-label DE LAVAL study. *Journal of Clinical Lipidology.* 2019; 13: 901-909.
11. Zenti MG, Altomari A, Lupo MG et al. From lipoprotein apheresis to proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 inhibitors: impact on low-density lipoprotein cholesterol and C reactive protein levels in cardiovascular disease patients. *European J of Preventive Cardiology.* 2018; 25: 1843-1851.
12. Sbrana F, Dal Pino B, Bigazzi F et al. Statin intolerance in heterozygous familial hypercholesterolemia with cardiovascular disease: After PCSK9 antibodies what else? *European Journal of Preventive Cardiology.* 2017; 24: 1528-1531.
13. Zenti MG, Stefanutti C, Sanga V et al. Evolocumab and lipoprotein apheresis combination therapy may have a synergic effect to reduce low-density lipoprotein cholesterol levels in heterozygous familial hypercholesterolemia: A case report. *J Clin Apher.* 2018; 33: 546-550.
14. Spithöver R, Röseler T, Julius U et al. Real-world study: Escalating targeted lipid-lowering treatment with PCSK9-inhibitors and lipoprotein apheresis. *J Clin Apher.* 2019; 34: 423-433.
15. Tselmin S, Julius U, Weinert N et al. Experience with proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 inhibitors (PCSK9i) in patients undergoing lipoprotein apheresis. *Atherosclerosis Supplements* 40. 2019; 38e-43e.
16. Kaufman TM, Warden BA, Minnier J, et al. Application of PCSK9 inhibitors in practice. *Circ Res.* 2019; 124: 32-37.
17. O'Donoghue ML, Fazio S, Giugliano RP, et al. Lipoprotein(a), PCSK9 inhibition and cardiovascular risk: insights from the FOURIER Trial. *Circulation.* Epub ahead of print 30 November 2018. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.118.037184.
18. Bittner V, Szarek M, Aylward PE, et al. Lp(a) and cardiovascular outcomes: an analysis from the ODYSSEY OUTCOMES Trial. *Arterioscler Suppl.* 2018; 32: 24.
19. Watts GF and Boffa MB. Lipoprotein(a): lodestar for future clinical trials. *Lancet.* 2018; 392: 1281-1282.
20. Bigazzi F, Sbrana F, Berretti D et al. Reduced incidence of cardiovascular events in hyper-Lp(a) patients on lipoprotein apheresis. The G.I.L.A. (gruppo Interdisciplinare Aferesi Lipoproteica) pilot study. *Transfusion and Apheresis Science* 2018. doi: 10.1016/j.transci.2018.07.015.
21. Ruscica M, Watts GF, and Sirtori C. PCSK9 monoclonal antibodies and lipoprotein apheresis for lowering lipoprotein(a): making choice in an era of RNA-based Therapies. *European Journal of Preventive Cardiology.* 2019; 26: 998-1000.
22. Stefanutti C and Zenti MG. Lipoprotein Apheresis and PCSK9-Inhibitors. Impact on atherogenic lipoproteins and anti-inflammatory mediators in Familial Hypercholesterolemia. *Current Pharmaceutical Design.* 2018; 24: 1-4.
23. 2019 ESC/EAS guidelines for the management of dyslipidaemias: Lipid modification to reduce cardiovascular risk. *Atherosclerosis.* 2019; 290: 140-205.

MEDICINA SCIENZA E SOCIETÀ

LEGGE 180 QUARANT'ANNI DOPO. UN CAMBIAMENTO SENZA FINE¹

Law 180 forty years later. An endless change

PEPPE DELL'ACQUA

*Psichiatra, già direttore del Dsm di Trieste, direttore della Collana 180,
Archivio critico della salute mentale*

Basaglia diventa direttore del manicomio di Gorizia nel novembre 1961. È un giovane medico, non ancora quarantenne. Proviene dall'Università di Padova, dove libero docente, è il responsabile del *repartino* psichiatrico presso la clinica neurologica (1) a Gorizia, non vede solo la violenza delle porte chiuse e delle contenzioni, vede una violenza più grande: gli uomini e le donne non ci sono più. Avverte la vertigine del vuoto, la solitudine dell'assenza. Deve interrogarsi su cosa è la psichiatria, sui suoi presunti fondamenti scientifico/biologici, riconoscere la presenza immutata del paradigma medico, della cultura figlia del positivismo scientifico che costringe ogni respiro a oggetto (2). Era la malattia che nascondeva ogni cosa. I nomi e le passioni, le storie e i

sentimenti, i bisogni e le emozioni non potevano abitare quel luogo. Così, messa tra parentesi la malattia, fu possibile vedere il malato, le storie singolari e non le diagnosi (3, 4). Siamo nella seconda metà degli anni '60, si respira un'aria di cambiamento. Lo stato avverte l'arretratezza più che drammatica degli istituti psichiatrici esistenti, non soltanto in Italia. Cominciava ad affermarsi timidamente, in una lettura puntuale dell'art. 32 della Costituzione, una visione del diritto alla salute prevalente su ogni interesse di ordine pubblico.

Il 13 maggio 1978, pochi giorni prima era stato ritrovato il corpo senza vita di Aldo Moro ucciso dalle Brigate Rosse, il Parlamento giunge a varare la legge n. 180 pur in una fase così drammatica della vita del nostro Paese.

La legge, "Accertamenti e trattamenti sanitari volontari e obbligatori" rimarrà in vigore pochi mesi, diventerà parte della legge n. 833 del 23 dicembre 1978 che istitui-

Indirizzo per la corrispondenza

Peppe Dell'Acqua
Dipartimento di Salute Mentale di Trieste
E-mail: peppedellacquats@gmail.com

1. Parte di questo articolo fa riferimento a una lunga conversazione con Angelo Venchiarutti, costituzionalista professore associato, Diritto Privato Facoltà di Economia, Università di Trieste; pubblicata su "Responsabilità medica" 2019.

va il Servizio Sanitario Nazionale. Il manicomio riceve una condanna senza appello, si avvia il superamento delle concezioni e delle pratiche custodialistiche nell'approccio alla malattia mentale, si cancella del tutto la presunzione di pericolosità sociale del malato di mente. Il tema del diritto alla salute diviene prevalente. Il principio della volontarietà, come regola e dell'eccezionalità dell'intervento d'autorità (trattamento sanitario obbligatorio) trova la sua forza ispiratrice nel 2° comma dell'art. 32 della Costituzione, alla cui redazione aveva contribuito lo stesso Aldo Moro in sede di Assemblea Costituente (5). Con la legge 180 non è più lo Stato che interna, che interdice per salvaguardare l'ordine e la morale; non vi è più il malato di mente “pericoloso per sé e per gli altri e di pubblico scandalo”, ma una persona bisognosa di cure. Un cittadino cui lo stato deve garantire, negoziare e rendere esigibile il diritto alla cura e alla salute. Da quel momento il campo del lavoro terapeutico dovrà cambiare radicalmente.

La legge, malgrado resistenze ostinate e un percorso in molte regioni lento e faticoso, ha dimostrato che è possibile cambiare e in tanti luoghi si sono realizzate profonde trasformazioni e radicate buone pratiche. La riforma, tuttavia, non dappertutto ha avuto applicazione omogenea. Anzi, in molte regioni, la realizzazione è stata frenata. Molto è dipeso dalla maggiore o minore attenzione delle amministrazioni regionali, dalle resistenze ai cambiamenti degli ambienti accademici alle nuove teorie e pratiche di cura, dalla mancanza di un'adeguata formazione degli operatori. In questo quadro non sono mancate azioni di contrasto di gruppi politici e professionali fino alla presentazione, nel corso degli anni '80, di ben cinquanta proposte di legge per l'abolizione “della 180”. Benché la legge di riforma abbia aperto impensabili possibilità di cura e grandi spinte all'integrazione sociale, e il

tema dell'inclusione sociale sia una priorità per tutti i paesi europei, hanno continuato a persistere cattive pratiche, frammentaria realizzazione dei servizi territoriali, scandalosi abbandoni, inspiegabili violenze, sottrazioni, abusi (6).

Quarant'anni dopo l'approvazione della legge, pur se sono state introdotte esperienze, competenze e risorse, il problema rimane: che cosa si fa per permettere alle persone di vivere completamente le possibilità che ora sono alla loro portata? Si fa ancora poco. Le persone rischiano di nuovo di essere rinchiuse dentro mura ancora più spesse di quelle del manicomio. Sono le mura costruite dalla forza del modello medico e dal ritorno prepotente di una psichiatria che vede solo malattia, che fonda la sua credibilità sulla promessa della sicurezza e dell'ordine, sull'industria del farmaco, su fondamenti disciplinari quanto mai incerti e controversi. Mi riferisco ai servizi psichiatrici di diagnosi e cura ospedalieri blindati, alle affollate e immobili strutture residenziali, alle comunità senza tempo che si dicono terapeutiche e che si situano fuori dal mondo delle relazioni, ai Centri di salute mentale vuoti e ridotti a miseri ambulatori. Domina la “psichiatria” con la falsa promessa della medicina, alleata delle psicologie più svariate, con la rinnovata chimera del farmaco e in alcune parti d'Italia, pochissime per fortuna, con l'utilizzo dell'eletroshock (si contano circa 1.000 interventi in Italia ogni anno: un numero peraltro molto contenuto, inconfondibile rispetto a tutti gli altri paesi europei). Preoccupano le culture e le pratiche che derivano da questi modelli, psicologici o biologici che siano. I farmaci, per esempio, leniscono il dolore, attenuano i sintomi, aiutano a stare nelle relazioni, sostengono percorsi di ripresa. Ma quando il “modello medico-biologico” pretende di spiegare le emozioni, la creatività, i sentimenti, le passioni, le paure, sottrae si-

gnificato, riduce, medicalizza la vita. Come viene evidenziato nella stessa relazione finale sull'attività della commissione parlamentare d'inchiesta (7) presieduta dal sen. Ignazio Marino sull'efficacia e l'efficienza del Servizio Sanitario Nazionale, i servizi psichiatrici rimangono, per la maggior parte, luoghi chiusi, ove sono ancora largamente diffuse pratiche di contenzione spesso poco o niente affatto comunicanti con la fragile rete dei servizi territoriali. I Servizi di diagnosi e cura, che sono (o dovrebbero essere) parte integrante della rete del territorio, quasi ovunque vengono invece inquadrati come reparti/divisioni ospedaliere, sono diventati "reparti di psichiatria". I nomi sono conseguenza delle cose!

Nei Dipartimenti di Salute Mentale, dove i servizi ospedalieri di diagnosi e cura lavorano a porte chiuse e i servizi territoriali risultano carenti e aperti per fasce orarie insufficienti, cresce la domanda di residenze dove collocare i "cronici". La persistenza del modello medico che vede da una parte la "crisi" e dall'altra la "cronicità", ha condizionato la crescita dei servizi di salute mentale, delle comunità terapeutiche, delle cooperative sociali. La crisi si colloca in ospedale, nei Servizi Psichiatrici di Diagnosi e Cura o, come in alcune regioni, in cliniche private. La cronicità sedimenta nelle strutture residenziali, negli istituti pubblici e religiosi, nei centri diurni infantilizzanti, nelle pratiche assistenzialiste di fragili cooperative sociali. Tra crisi e cronicità si crea un vuoto, un abisso. Come se la vita delle persone non potesse esistere al di fuori di queste definizioni. I Centri di Salute Mentale, come in FVG, pensati come luoghi privilegiati della presa in carico territoriale della crisi e a sostegno di una "buona vita" delle persone anche con l'esperienza di disturbi mentali severi, restano invece fragili e vuoti, le comunità residenziali diventano i terminali del fallimen-

to terapeutico. Nell'evidente "povertà dei mezzi" e nella frammentazione dei servizi, il ricorso alla contenzione accade a copertura dell'esiguità del numero degli operatori e delle cattive pratiche. Sul piano terapeutico poi la contenzione appare ancora più inaccettabile, anche in ragione dei rischi gravi che essa comporta sul piano fisico e psicologico per chi la subisce col doloroso senso di umiliazione e di paura, di rancore, di cupezza, di rabbia. Solo negli ultimi 10 anni, in Italia, si sono verificati nei Servizi Psichiatrici di Diagnosi e Cura "incidenti" gravi a seguito della contenzione e molti gli eventi mortali (8).

Nonostante la persistenza di culture e di pratiche di cui ho appena riferito, va evidenziato che la riforma del 1978 ha fatto il suo corso e ha generato i suoi "frutti": i Dipartimenti e le strutture per la salute mentale sono diffusi in tutte le regioni, sono presenti circa 300 servizi ospedalieri per acuti (SPDC) con più di 3.000 posti letto; e soprattutto circa 1500 servizi sul territorio, anche con le carenze e le notevoli differenze già accennate. L'assetto attuale della rete dei Dipartimenti di salute mentale e delle articolazioni che li compongono, che si basa sostanzialmente su quanto previsto dal Progetto Obiettivo *"Tutela della salute mentale 1998-2000"*, è oggi molto a rischio per una cronica disattenzione del governo centrale, per politiche restrittive delle Regioni, per una riduzione sempre più manifesta delle risorse economiche. Il nostro paese utilizza per la salute mentale poco meno del 3% della spesa sanitaria nazionale e si colloca al terz'ultimo posto tra i paesi europei. Malgrado tutto, si direbbe, con la legge 31 maggio 2015, n. 81, si è realizzata (finalmente) la chiusura degli Ospedali psichiatrici giudiziari (Opg) e disegnato un nuovo sistema di trattamento per gli autori di reati ritenuti "incapaci di intendere e volere". Chiusi i 6 Opg si sono attivati in ogni regio-

ne residenze per l'esecuzione delle misure di sicurezza (Rems) e programmi di cura e riabilitazione articolati con il lavoro di territorio. La chiusura degli OPG costituisce dunque una tappa rilevante nel processo di deistituzionalizzazione delle persone con malattie mentali (9).

A 40 anni dalla legge è del tutto evidente che oggi niente è più come prima. Le persone con disturbo mentale sono cittadini e possono faticosamente affermare la loro cittadinanza. Il tempo non è passato invano, servizi e politiche per la salute mentale sono presenti bene o male, spesso malissimo, in ogni regione e "la malattia mentale" può essere narrata in tutt'altro modo. Storie di persone, sempre più numerose, che nonostante la severità della loro malattia mai hanno subito restrizioni e mortificazioni. Hanno potuto attraversare Centri di salute mentale orientati alla guarigione, capaci di accoglierle e accompagnarle nel percorso di ripresa fino a quando abbiano trovato una propria strada.

Quando è possibile privilegiare la scelta del territorio (le reti, la prossimità, la domiciliarità) essa contrasta di fatto il modello medico. Il Centro di salute mentale aperto, ben radicato nella comunità - non già l'ospedale e le residenze - diventa la modalità organizzativa forte che orienta la domanda e sostiene il lavoro terapeutico-riabilitativo a fianco della vita reale delle persone. Le esperienze di questi anni hanno mostrato quanto la malattia, la clinica in una parola, si mette alla prova proprio nella dimensione territoriale. Il lavoro che bisogna fare per incontrare le persone si situa proprio in quello spazio aspro e tesissimo tra la clinica e il territorio, i luoghi delle persone, i contesti, le relazioni. Quanto più si riconosce il territorio come luogo del lavoro terapeutico riabilitativo, quanto più si colloca in questa dimensione la clinica, la malattia assume una diversa visibilità. Si scopre il

bisogno di inventare "istituzioni" capaci di garantire la permanenza delle persone nel contratto sociale e fronteggiare il rischio di marginalizzazione. Possono crescere sistemi di servizi e dislocazioni di risorse in grado di reggere alle nuove scommesse: la "presa in carico", la continuità delle cure, il sostegno alla famiglia, i percorsi di formazione e di inserimento lavorativo, la cooperazione sociale, il sostegno a tutte le forme dell'abitare. I percorsi di guarigione, infine.

In chiusura, a conferma dell'impostazione ispiratrice della legge 180 e delle buone pratiche che si sono realizzate, vorrei aggiungere questa annotazione: nell'introduzione del recente documento della *World Psychiatry Association "On the Future of Psychiatry"* (Lancet Psychiatry Commission, 2017) si può leggere la seguente considerazione in apertura: "*The dramatic neuroscience research advances in psychiatry of the second half of the 20th century have not yet led to substantial advances in patient care. In spite of this, patient care has been transformed by a number of other influences. The increasing recognition of social determinants of health has clearly led to increased appreciation of demographic, economic, and sociocultural aspects of risk for development of psychiatric disorders, patient acceptance of treatment, and design and implementation of systems of care*".

Bibliografia

1. A. Slavich. All'ombra dei ciliegi giapponesi. Gorizia 1961, Collana 180, Archivio critico della salute mentale. AB Verlag, Merano, 2018.
2. F. Basaglia (a cura di) Che cos'è la psichiatria? Baldini e Castoldi ed. ristampa. Milano, 1997.
3. F. Rotelli (a cura di) L'istituzione inventata. Almanacco, Trieste 1971-2010, Collana 180, Archivio critico della salute mentale. AB Verlag, Merano, 2018.
4. E. Minkosky Il tempo vissuto. Fenomenologia e psicopatologia. Feltrinelli, Torino, 2004.

5. D. Piccione Il pensiero lungo. Franco Basaglia e la Costituzione. Collana 180, Archivio critico della salute mentale. AB Verlag, Merano, 2014.
6. WHO, European ministerial conference on Mental health, Mental Health Declaration for Europe Helsinki, Facing the Challenges, Building Solutions. Helsinki, 12-15 gennaio 2005.
7. Relazione finale sull'attività della Commissione parlamentare di inchiesta sull'efficacia e l'efficienza del Servizio sanitario nazionale. Senato della Repubblica, 2013.
8. G. Del Giudice, ...e tu slegalo subito. Sulla contenzione in psichiatria. Collana 180, Archivio critico della salute mentale. AB Verlag, Merano, 2018.
9. Pietro Pellegrini (a cura di) Liberarsi dalla necessità degli ospedali psichiatrici giudiziari. Quasi un manuale. Collana 180, Archivio critico della salute mentale. AB Verlag, Merano, 2018.

NOTIZIE DA CONGRESSI INTERNAZIONALI**ESC 2021****MANUELA CASULA**

SEFAP - Servizio di Epidemiologia e Farmacologia Preventiva,
Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano

Nei giorni dal 27 al 30 agosto 2021 si è tenuto il meeting annuale dell'European Society of Cardiology (ESC), in versione completamente digitale. Tra gli argomenti discussi durante il congresso, alcune recenti linee guida pubblicate dalla società, riguardanti la gestione dello scompenso cardiaco, la prevenzione delle malattie cardiovascolari (CV), la terapia di resincronizzazione cardiaca, il trattamento delle malattie valvolari cardiache e gli ultimi risultati dai trial clinici.

Empaglifloxin nei pazienti con insufficienza cardiaca con frazione di eiezione preservata: il trial EMPEROR

I risultati principali dallo studio EMPEROR-Preserved su quasi 6000 pazienti costituiscono la prima dimostrazione inequivocabile che un farmaco, empagliflozin, può ridurre significativamente il tasso di morte cardiovascolare e il ricovero per scompenso cardiaco in pazienti con insufficienza cardiaca con frazione di eiezione preservata (HFpEF, con una frazione di eiezione del ventricolo sinistro superiore

al 40%). Tuttavia, allo stesso tempo, altre analisi del trial meritano attenzione.

Forse l'evidenza più sorprendente e complessa da interpretare riguarda gli esiti renali. L'outcome primario dello studio era il tasso combinato di morte cardiovascolare o ospedalizzazione per insufficienza cardiaca (HHF) e i risultati hanno mostrato che il trattamento con empagliflozin per 26 mesi (mediana), in aggiunta al trattamento standard, in pazienti con HFpEF ha portato a una significativa riduzione del rischio relativo del 21% rispetto ai pazienti trattati con placebo. Lo studio ha avuto due outcome secondari prespecificati: il numero totale di HHF, che è diminuito del 27% rispetto al placebo, e la variazione media della penedenza della velocità di filtrazione glomerulare stimata (eGFR) su base annua, per cui il regime con empagliflozin ha ridotto il deficit annuale cumulativo, rispetto al placebo, in media di 1,36 ml/min per 1,73 m².

Indirizzo per la corrispondenza

Manuela Casula
SEFAP, Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano
Via Balzaretti, 9 - 20133 Milano
E-mail: manuela.casula@unimi.it

Questa conservazione della funzione renale era coerente con i risultati di molti studi precedenti con empagliflozin e tutti gli altri agenti approvati dagli Stati Uniti nella classe degli inibitori del cotrasportatore sodio-glucosio 2 (SGLT2). La conservazione della funzionalità renale e la riduzione degli eventi renali è diventata una proprietà caratteristica di tutti gli agenti della classe degli inibitori SGLT2, sia nei pazienti con diabete di tipo 2, sia in quelli senza diabete ma con insufficienza cardiaca con frazione di eiezione ridotta (HFrEF) o con malattia renale cronica. In EMPEROR-Preserved, un *outcome* predefinito dello studio - un esito renale composito definito come il tempo alla prima necessità di dialisi cronica, trapianto renale, riduzione sostenuta di almeno il 40% di eGFR o calo sostenuto di eGFR superiore a 10 o 15 ml/min per 1,73 m² dal basale – ha prodotto un risultato neutro inaspettato, differente da quello osservato in tutti gli altri studi sugli inibitori SGLT2, ma anche in contrasto con la significativa conservazione osservata della funzione renale, abbastanza sostanziale da produrre un beneficio clinicamente rilevante. In una lettera, i ricercatori del *trial* hanno segnalato che l'analisi della pendenza dell'eGFR ha dei limiti come surrogato per prevedere l'effetto dei farmaci sugli esiti renali nei pazienti con insufficienza cardiaca.

Ciò ha portato i coordinatori dello studio a rianalizzare gli esiti renali utilizzando una definizione diversa. Il nuovo approccio ha ridotto quasi della metà il numero totale di eventi renali conteggiati nello studio e ha mostrato un calo più robusto degli eventi renali con il trattamento con empagliflozin rispetto all'analisi iniziale, sebbene il calo sia rimasto non significativo. L'analisi rivista ha anche mostrato che la riduzione relativa complessiva e non significativa del 22% degli eventi renali nei pazienti trattati con empagliflozin, rispet-

to al placebo, è diminuita fino a diventare completamente inesistente nel terzile dei pazienti con una frazione di eiezione ventricolare sinistra del 60% o superiore. In questo terzile, l'*hazard ratio* ha effettivamente mostrato una stima puntuale non significativa di aumento del tasso di eventi renali del 24% con empagliflozin, con l'avvertenza che questo sottogruppo ora includeva un totale di soli 40 eventi totali tra i due bracci di trattamento. L'effetto maggiore sulla riduzione degli eventi renali è stato riscontrato nel terzile dei pazienti con una frazione di eiezione del 41%-49%, in cui il trattamento con empagliflozin è stato associato a una riduzione degli eventi renali del 59%, rispetto al placebo. L'analisi ha anche mostrato una eterogeneità significativa tra questo sottogruppo e gli altri due terzili che avevano frazioni di eiezione più elevate. Questa apparente attenuazione di un effetto renale, nonostante la conservazione della funzione renale, sembrava imitare l'attenuazione dell'effetto sull'esito cardiovascolare primario che si è manifestato anche nei pazienti con frazione di eiezione del 60% -65% o superiore.

Un altro *report* degli investigatori EMPEROR-Preserved ha descritto diverse analisi prespecificate che prevedevano l'aggiunta di ulteriori *endpoint* di malattie cardiovascolari ai conteggi principali di morte cardiovascolare o HHF - come eventi emergenti, urgenti e ambulatoriali che riflettevano un peggioramento dell'insufficienza cardiaca - e includevano anche informazioni sull'uso di diuretici e vasopressori a causa del peggioramento dell'insufficienza cardiaca. È stato perciò possibile osservare una riduzione del 29% della necessità di ricovero in un'unità di cardiologia o in un'unità di terapia intensiva durante un HHF, una riduzione non significativa del 33% della necessità di farmaci vasopressori per via endovenosa o farmaci inotropi positivi du-

rante l'HHF, un tasso aumentato di pazienti che raggiungono una classe funzionale NYHA più alta.

Infine, un *report* aggiuntivo si è concentrato sul confronto incrociato post hoc dei risultati di EMPEROR-Preserved e di PARAGON-HF, un altro recente studio che ha valutato sacubitril/valsartan, terapia già dimostrata efficace in pazienti con HFrEF, in pazienti con HFpEF. L'*outcome* primario di PARAGON-HF era la riduzione della morte cardiovascolare e delle HHF totali. Queste ultime sono diminuite del 13%, rispetto al placebo, durante una media di 35 mesi, con una differenza tra i gruppi che di poco non ha raggiunto la significatività statistica.

L'analisi comparativa sembra suggerire un effetto maggiore di empagliflozin rispetto a sacubitril/valsartan sulle HHF, sebbene vadano considerati i limiti nel confrontare trial condotti su popolazioni con caratteristiche diverse.

I vantaggi delle polipillole: lo studio QUARTET e una metanalisi dei trial TIPS-3, HOPE-3 e PolyIran

Una "quadpill" contenente quarti di dose di quattro farmaci per abbassare la pressione sanguigna (PA) è risultata più efficace della monoterapia per il trattamento iniziale dell'ipertensione, con una tollerabilità simile, nello studio randomizzato di fase 3 con controllo attivo QUARTET, della durata di 1 anno. L'*outcome* primario, la PA media in ambulatorio a 12 settimane, è scesa da 142/86 mmHg a 120/71 mmHg nei pazienti che hanno ricevuto la *quadpill* giornaliera - una capsula contenente irbesartan, amlodipina, indapamide e bisoprololo – e da 140/83 mmHg a 127/79 mmHg in pazienti che hanno ricevuto una dose giornaliera completa di irbesartan. Questo

calo di 6,9 mm Hg della pressione sistolica a 12 mesi è clinicamente rilevante: se mantenuto, potrebbe ridurre del 15%-20% il rischio di malattie cardiache, ictus e insufficienza cardiaca. È anche importante notare che il controllo della pressione arteriosa è stato raggiunto più rapidamente nei pazienti che hanno ricevuto la *quadpill* rispetto alla monoterapia. La strategia di dosaggio *quadpill* si allinea con le ultime linee guida 2018 ESC/European Society of Hypertension, che raccomandano di iniziare il trattamento antipertensivo con più di un farmaco.

Il concetto di polipillola come combinazione a dose fissa di farmaci generici cardiovascolari (CV) è forse il più controverso nell'ambito del dibattito sulla prevenzione primaria. Tuttavia, una nuova analisi di tre grandi studi randomizzati sembra rafforzare l'idea a livello di popolazione, almeno per gli anziani con fattori di rischio CV. La metanalisi su dati individuali ha coinvolto più di 18.000 partecipanti agli studi TIPS-3, HOPE-3 e PolyIran. Nel loro insieme, gli studi mostrano un calo altamente significativo del 38% del rischio per l'*endpoint* primario della metanalisi, un composito di morte CV, infarto miocardico (IM), ictus o rivascolarizzazione arteriosa, nei partecipanti ai regimi a dose fissa, con un numero necessario di pazienti da trattare per evitare un evento (NNT) pari a 52. Inoltre, gli effetti maggiori sono stati osservati con strategie di combinazione a dose fissa che includevano l'aspirina, con un calo del 47% nell'*endpoint* primario e un NNT di 37.

Antiplastrinici e anticoagulanti dopo intervento coronarico percutaneo (PCI): il trial MASTER DAPT

Nello studio MASTER DAPT, che ha coinvolto pazienti ad alto rischio di san-

guinamento sottoposti a impianto di uno stent a rilascio di sirolimus a polimero biodegradabile, il passaggio dalla doppia terapia antipiastrina (DAPT) alla terapia antiaggregante singola 34 giorni (mediana) dopo PCI non è stato inferiore alla continuazione del trattamento con DAPT per una durata di 193 giorni (mediana) per quanto riguarda l'incidenza di eventi avversi cardiaci o cerebrali maggiori, ed è stato associato a una minore incidenza di sanguinamenti maggiori o clinicamente rilevanti.

I risultati sono stati analizzati anche separatamente per pazienti che assumevano anticoagulanti orali, che costituivano il 36% della popolazione dello studio, e quelli che non assumevano anticoagulanti orali, mostrando che è sicuro e vantaggioso interrompere la DAPT dopo 1 mese in entrambi i gruppi.

COVID-19 e gestione dei pazienti con patologie cardiovascolari

Sebbene la riorganizzazione dei servizi di angioplastica in risposta al COVID-19 non abbia portato a un peggioramento degli esiti, la pandemia ha sottolineato gli scarsi esiti di sopravvivenza dei pazienti con ischemia critica degli arti (CLI) trattati in ospedale.

In uno studio su quasi 200 pazienti sottoposti a rivascolarizzazione endovascolare per malattia arteriosa periferica sintomatica degli arti inferiori tra il 2018 e il 2021 nel Regno Unito, dividendo i pazienti del periodo pre-COVID e COVID, si è scoperto che la percentuale di pazienti trattati come casi diurni è aumentata del 32% e l'intervallo di tempo tra il ricovero e l'angioplastica è diminuito in media di 8 giorni. Tuttavia, i pazienti ospedalizzati hanno avuto una sopravvivenza significativamente più breve rispetto a quelli trattati come casi giornalieri in entrambi i periodi,

a poco più di 5 mesi rispetto a più di un anno.

Un altro impatto della pandemia è stato osservato su oltre 1200 pazienti con cardiomiopatia nella popolazione del Regno Unito. È emerso che i pazienti con cardiomiopatia hanno maggiori probabilità di essere ricoverati in ospedale e hanno una salute fisica peggiore a causa del COVID-19 rispetto alla popolazione generale. Circa un terzo dei pazienti con cardiomiopatia ha anche riferito di non aver effettuato indagini cliniche o appuntamenti clinici, mentre due quinti hanno affermato che le proprie esigenze non sono state soddisfatte dalla telemedicina.

Finerenone riduce il rischio CV in pazienti con diabète e malattia renale grave: il trial FIDELITY

Nuovi dati sull'uso dell'antagonista del recettore dei mineralcorticoidi non steroidi (MRA) finerenone per il trattamento di pazienti con diabete di tipo 2 e malattia renale cronica hanno confermato l'efficacia di questo nuovo farmaco in questi pazienti per rallentare la progressione verso la malattia renale allo stadio terminale e ridurre i ricoveri ospedalieri per insufficienza cardiaca. Ha inoltre supportato la raccomandazione che i medici siano molto più proattivi nella raccolta di campioni di urina da pazienti con diabete di tipo 2 (T2D) per trovare quelli con albuminuria la cui funzione renale non è ancora scesa al di sotto di 60 ml/min per 1,73 m², una popolazione che può trarre beneficio dal trattamento con finerenone.

L'analisi FIDELITY ha combinato i dati di due studi registrativi correlati sul finerenone, per un totale di oltre 13.000 pazienti con diabete di tipo 2 e malattia renale cronica (CKD). Ciascuno di questi due studi, FIDELIO-DKD e FIGARO-DKD, ha arruol-

lato pazienti con una velocità di filtrazione glomerulare stimata (eGFR) di 25-90 mL/min per 1,73 m² e un rapporto albumina-creatinina urinaria (UACR) di 30-299, o un eGFR di 25-75 mL/min per 1,73 m² e un UACR di 300-5.000. Il risultato è stato che il 40% dei pazienti arruolati aveva un eGFR di almeno 60, livelli considerati normali, ma aveva anche un livello di albuminuria che li definiva come affetti da CKD.

I risultati hanno mostrato che durante un *follow-up* di 36 mesi (mediana), i pazienti con normale eGFR e albuminuria avevano un'incidenza combinata di malattie cardiovascolari (morte cardiovascolare, infarto miocardico, ictus o ospedalizzazione per insufficienza cardiaca) ridotta all'incirca della stessa quantità di quanto osservato in pazienti con livelli più bassi di eGFR e funzionalità renale, un risultato che ripropone il modo in cui i medici devono sottoporre a screening di routine per CKD i pazienti con T2D.

L'analisi combinata FIDELITY ha mostrato un taglio complessivo significativo nell'*outcome* composito di malattia cardiovascolare del 14% rispetto al placebo, che rifletteva una riduzione assoluta dell'1,7% degli eventi tra i due bracci durante i 3 anni di trattamento. Il principale fattore di questo beneficio è stato il significativo calo dei ricoveri per insufficienza cardiaca con finerenone rispetto al placebo, che è diminuito del 22% relativo e del 1,1% assoluto.

L'abbassamento della pressione arteriosa al di sotto di 130 mm Hg mostra un beneficio CV; lo studio STEP

Un altro ampio studio clinico ha approvato l'approccio dell'abbassamento intensivo della pressione sanguigna, rafforzando i vantaggi di questo approccio già visti nello studio SPRINT.

Lo studio STEP è stato condotto in Cina e ha coinvolto pazienti di età superiore ai 60 anni con ipertensione. Il trattamento intensivo con un obiettivo di pressione arteriosa sistolica da 110 a <130 mm Hg ha prodotto una minore incidenza di eventi cardiovascolari rispetto al trattamento standard con un obiettivo da 130 a <150 mm Hg. Il gruppo con approccio intensivo ha mostrato una riduzione del 26% degli eventi cardiovascolari, del 33% dell'ictus, del 33% della sindrome coronarica acuta (ACS) e del 73% dell'insufficienza cardiaca acuta.

Il vaccino per l'influenza stagionale riduce la mortalità post-infarto: il trial IAMI

Il vaccino contro l'influenza stagionale potrebbe essere una delle migliori misure di prevenzione secondaria ospedaliera, come suggerisce il trial randomizzato IAMI, in cui la vaccinazione ha portato a un numero notevolmente inferiore di morti e ha ridotto il rischio di alcuni eventi cardiaci non fatali.

Nello studio con più di 2500 pazienti ricoverati per infarto miocardico acuto (IM) o - in meno dell'1% dei casi - malattia coronarica stabile ad alto rischio, metà è stata randomizzata al vaccino antinfluenzale standard dell'anno e l'altra metà a una soluzione fisiologica placebo entro 72 ore dal ricovero o da una procedura di rivascolarizzazione. I pazienti vaccinati hanno sperimentato una diminuzione del rischio del 28% per l'*outcome* primario di morte, infarto miocardico non fatale o trombosi dello *stent* nell'anno successivo, rispetto al gruppo di controllo. La mortalità per tutte le cause è scesa del 41%, così come la mortalità cardiovascolare. Il rischio di IM, tuttavia, non era significativamente diverso da quello della coorte di controllo; i tassi erano entrambi inferiori al 3%.

Nonostante l'ampia letteratura di supporto, IAMI non può però essere considerato definitivo. Lo studio è stato interrotto nell'aprile 2020 con poco più della metà del suo arruolamento *target* di 4400 pazienti. Il comitato per la sicurezza e il monitoraggio dei dati aveva stabilito che “*non sarebbe stato fattibile per lo studio continuare il reclutamento, poiché si prevedeva che la trasmissione dell'influenza diminuisse*” durante l'emergente pandemia di COVID-19. A causa della ridotta potenza statistica, quindi, si dovrebbe usare cautela nell'interpretazione dello studio.

Aggiornate le linee guida sullo scompenso cardiaco e la prevenzione delle malattie cardiovascolari

La nuova linea guida sulla gestione dello scompenso cardiaco (HF) offre poche novità in campo di HFpEF. Tuttavia, anche se già ci si attende un aggiornamento che includa nuove raccomandazioni sull'uso di empagliflozin, sulla scorta di quanto emerso dai recenti risultati del *trial* EMPEROR-Preserved, il documento riflette una serie di concetti cardine con profonde implicazioni terapeutiche. Tra questi vi sono l'ultimo paradigma per la terapia medica dell'HFrEF e la divisione sempre più accettata dell'HFpEF tradizionale in due entità: HF con frazione di eiezione leggermente ridotta (HFmrEF) e HFpEF con soglia della frazione di eiezione ventricolare sinistra (LVEF) aumentata al 50%. In effetti, l'HFmrEF nel nuovo documento è un'indicazione alla terapia farmacologica che esisteva a malapena pochi anni fa, ma è cresciuta di rilievo dopo i risultati secondari di studi come TOPCAT per lo spironolattone e PARAGON-HF per sacubitril-valsartan, un inibitore del recettore dell'angiotensina e della neprilisina (ARNI). Tuttavia, le

raccomandazioni HFmrEF vengono fornite con diverse designazioni di classe e livello di evidenza.

Una delle raccomandazioni centrali del documento specifica quali classi di farmaci attualmente disponibili dovrebbero essere avviate e quando nei pazienti con HFrEF. Un ACE-inibitore o un ARNI, un beta-bloccante, un antagonista del recettore dei mineralcorticoidi (MRA) e un inibitore SGLT2 hanno collettivamente guadagnato una raccomandazione di classe I, data l'importanza di queste terapie chiave per l'HFrEF, alcune delle quali hanno dimostrato di migliorare i risultati entro un mese dall'avvio del trattamento. Un agente di ciascuna delle quattro classi deve essere iniziato e titolato nel modo più rapido e sicuro possibile, utilizzando la dose efficace più bassa di un diuretico dell'ansa.

Il farmaco orale vericiguat, stimolatore del recettore della guanilato-ciclasici, che nello studio VICTORIA ha recentemente mostrato un modesto successo nei pazienti con HFrEF e un precedente ricovero per HF, ha ottenuto una raccomandazione di classe IIb. L'algoritmo semplificato del documento per la gestione complessiva di tali pazienti e l'avvento degli inibitori SGLT2 sono le novità nelle linee guida ESC per l'insufficienza cardiaca. Tuttavia, il modo in cui le quattro classi di farmaci vengono avviate nei pazienti è fondamentale e potrebbe volerci del tempo perché queste raccomandazioni diventino prassi nella pratica clinica.

Per quanto riguarda le nuove linee guida di prevenzione cardiovascolare, la stima del rischio cardiovascolare di ciascun paziente rimane un punto centrale. Di conseguenza, obiettivo del documento è quello di fornire delle indicazioni il più possibile personalizzate. È posta anche maggiore attenzione alla prevenzione delle malattie cardiovascolari nelle persone anziane.

Le linee guida sono divise in due sezioni. Una sezione tratta la prevenzione delle malattie cardiovascolari a livello individuale in persone apparentemente sane, in pazienti con malattie cardiovascolari accertate e in quelli con diabete, ipercolesterolemia familiare o malattia renale cronica. L'altra sezione riguarda la prevenzione delle malattie cardiovascolari a livello di popolazione, tra cui le politiche di salute pubblica, compresa l'adozione di misure per ridurre l'inquinamento atmosferico, l'uso di combustibili fossili e le emissioni di anidride carbonica.

Gli obiettivi per il controllo dei lipidi nel sangue, della pressione sanguigna e della glicemia rimangono in linea con le recenti linee guida ESC. Tuttavia, le linee guida introducono un nuovo approccio graduale all'intensificazione del trattamento per raggiungere questi obiettivi, tenendo conto del rischio cardiovascolare, del beneficio del trattamento dei fattori di rischio, dei modificatori del rischio, delle comorbidità e delle preferenze del paziente.

Le linee guida per la prevenzione delle malattie cardiovascolari del 2021 includono anche gli algoritmi Systemic Coronary Risk Estimation 2 (SCORE2) e Systemic Coronary Risk Estimation 2-Older Persons (SCORE2-OP) pubblicati recentemente.

Per la prima volta, le linee guida raccomandano di smettere di fumare indipendentemente dal fatto che l'interruzione comporti un aumento di peso, poiché questo non riduce i benefici della cessazione. Per quanto riguarda l'esercizio fisico, gli adulti di tutte le età dovrebbero mirare ad almeno 150-300 minuti a settimana di attività fisica moderata, o da 75 a 150 minuti a settimana di attività fisica vigorosa e aerobica. Le linee guida raccomandano di ridurre il tempo sedentario e di impegnarsi in almeno un'attività leggera durante il giorno. Per quanto riguarda l'alimentazio-

ne, le linee guida consigliano di adottare una dieta mediterranea o similare, limitare l'assunzione di alcol a un massimo di 100 g a settimana, mangiare pesce almeno una volta alla settimana e limitare il consumo di carne, in particolare di carne lavorata. Inoltre, per la prima volta, le linee guida affermano che la chirurgia bariatrica dovrebbe essere presa in considerazione per gli individui obesi ad elevato rischio di CVD, quando una dieta sana e l'esercizio fisico non riescono a portare a una perdita di peso mantenuta nel tempo.

Nuove evidenze su alimentazione e rischio cardiovascolare

Tra le persone di mezza età senza malattie cardiache, bere fino a 3 tazze di caffè al giorno è stato associato a un minor rischio di ictus o morte nel successivo decennio, insieme a una migliore struttura e funzione del cuore, in un ampio studio osservazionale condotto sui dati della UK Biobank, che ha reclutato 500.000 persone di età compresa tra 40 e 69 anni nel 2006-2010 da tutto il mondo. In particolare, il consumo di caffè da leggero a moderato, definito da 0,5 a 3 tazze al giorno, è stato associato a un rischio inferiore del 21% di ictus, un rischio inferiore del 17% di morte per malattie cardiovascolari e un rischio inferiore del 12% di morte per tutte le cause, oltre a risultati di risonanza magnetica cardiaca più favorevoli, rispetto ai non bevitori (<0,5 tazze al giorno) in un follow-up medio di 11 anni. I forti bevitori di caffè, definiti come coloro che consumano più di 3 tazze al giorno, d'altra parte, hanno mostrato risultati di risonanza magnetica cardiaca più favorevoli, ma con tassi simili (non inferiori) di ictus e CVD o mortalità per tutte le cause rispetto ai non bevitori.

Un'altra evidenza discussa durante il congresso ha riguardato il passaggio dal

sale normale a un sostituto del sale a basso contenuto di sodio, che in un recente *trial* ha mostrato importanti benefici per la salute pubblica. Il Salt Substitute and Stroke Study (SSaSS), un *trial* in aperto, randomizzato a *cluster*, è stato condotto su 21.000 persone con una storia di ictus o ipertensione nella Cina rurale, metà delle quali utilizzava un sostituto del sale a basso contenuto di sodio invece del sale normale. I risultati hanno mostrato che dopo 5 anni, coloro che usavano il sostituto del sale hanno avuto una riduzione del 14% dell'ictus, una riduzione del 13% degli eventi cardiovascolari maggiori e una riduzione del 12% della morte. Questi benefici sono stati ottenuti senza effetti negativi apparenti.

Un altro studio ha mostrato che le persone che consumano acidi grassi saturi (SFA) dalla carne potrebbero essere ad aumentato rischio di malattie cardiovascolari (CVD), mentre coloro che seguono una dieta basata su fonti lattiero-casearie o passano a cereali e frutta e verdura potrebbero essere protetti. Esaminando le registrazioni di oltre 114.000 persone inserite nella *UK biobank* che hanno completato le valutazioni dietetiche, i ricercatori hanno esaminato lo sviluppo della CVD in oltre 8 anni di *follow-up*. Sebbene non vi fosse alcuna associazione tra l'assunzione complessiva di SFA e il rischio cardiova-

scolare, il rischio di CVD totale risultava aumentato del 19% per ogni aumento del 5% del consumo di energia da SFA di carne, mentre quello per la cardiopatia ischemica era aumentato del 21%. Al contrario, il rischio di cardiopatia ischemica sembrava essere ridotto dal consumo di SFA da fonti lattiero-casearie, scendendo dell'11% per ogni 5% di aumento dell'assunzione. Lo studio ha anche mostrato che la sostituzione dell'apporto energetico degli SFA dalla carne con cereali o frutta e verdura ha ridotto il rischio di ictus del 14%. D'altra parte, è emerso che le associazioni di grassi saturi con CVD variano in base alla loro fonte. Questo può spiegare la generale mancanza di associazione tra il consumo totale di SFA e le CVD in questo e in precedenti studi osservazionali.

Infine, un'analisi dei dati su oltre 1600 partecipanti allo studio Avon Longitudinal Study of Parents and Children (ALSPAC), ha mostrato che gli adolescenti e i giovani adulti che fumano e consumano alcol hanno un aumento accelerato della rigidità arteriosa, che potrebbe metterli a maggior rischio di malattie cardiovascolari. Notando che non vi era alcuna differenza nella rigidità arteriosa tra gli ex-fumatori e quelli che non avevano mai fumato, gli autori hanno segnalato che questi effetti avversi possono essere reversibili con l'interruzione del fumo.

35° CONGRESSO NAZIONALE **SISA**



VIRTUAL EDITION
LIVE STREAMING
28-30 NOVEMBRE 2021
ON DEMAND
28 NOVEMBRE 2021
28 FEBBRAIO 2022



SOCIETÀ ITALIANA
PER LO STUDIO
DELL'ATEROSCLEROSI

RIASSUNTO DELLE COMUNICAZIONI PRESENTATE AL 35° CONGRESSO NAZIONALE S.I.S.A.

IN VITRO STUDIES ON THE MECHANISMS UNDERLYING THE EFFECTS ON CHOLESTEROL HOMEOSTASIS EXERTED BY A MIXTURE OF LACTOBACILLUS PLANTARUM ALONE OR IN COMBINATION WITH BERBERINE AND FERMENTED RED RICE

L. Arnaboldi¹, S. Mazza¹, E. Frisa¹, A. Granata¹, F. Bordonaro¹, F. Di Vincenzo², P. Sperandeo², A. Polissi², A. Corsini¹

¹Lab. di Farmacologia Cellulare dell'Aterosclerosi, DISFeB,
Università degli Studi di Milano; ²Lab. di Microbiologia
Molecolare, DISFeB, Università degli Studi di Milano
E-mail: lorenzo.arnaboldi@unimi.it

In order to reduce mild-moderate cholesterolemia, even in statin-intolerant patients, beyond already utilized nutraceuticals (e.g fermented red rice, phytosterols, artichoke and bergamot extracts, etc.) recently a new therapeutical possibility emerged. *Lactobacillus plantarum* (LP), a strain of *Lactobacilli* commonly present in human intestine, possesses cholesterol-lowering properties both in animal and human studies. The aim of the present work is to demonstrate the mechanism(s) underlying this effect on cholesterol homeostasis exerted by a LP fixed formula. In some experiments, this mix has also been associated with berberine and fermented red rice. LP mix demonstrated to be effective on at least three investigated parameters:

- a) Removal of cholesterol from culture medium. Growing or heat-inactivated LP are able to remove up to 50-60% of free cholesterol (diluted in ethanol; final medium concentrations 20-200 µg/ml), after 20 hours of incubation (experiments conducted with gas-chromatographic techniques). In our experimental conditions, this effect is neither saturable nor specific for cholesterol. Addition of betasitosterol or stigmasterol exerts the same effect.
- b) Bile Salt Hydrolase (BSH) activity. LP's BSH, by hydrolyzing conjugated intestinal bile salts, prevents free cholesterol reabsorption, thus contributing to lowering its plasma concentrations. As shown both by semiquantitative TLC and quantitative colorimetric analysis, BSH activity is only present in living LP, after incubation with taurocholic- and glycocholic acids for 20 hours (0.3% in culture medium).
- c) Cholesterol biosynthesis inhibition. 15% conditioned medium from living LP added for 20 hours to the culture medium of human hepatocarcinoma HuH-7 cells reduces cholesterol biosynthesis by 15-20%. The association with berberine (15 µg/ml) and fermented red rice (titrated by HPLC at 0.1-1 µM in monacoline K) additionally reduces cholesterol biosynthesis (up to 70%). In summary, these in vitro effects corroborate the data on the clinical efficacy of LP strains, and also suggest their use in a possible therapeutical association in the case of more sustained cholesterolemia.

THE ACHILLES TENDON ULTRASONOGRAPHY IN FAMILIAL HYPERCHOLESTEROLEMIA: RESULTS FROM A SUB-STUDY OF THE LIPID TRANSPORT DISORDERS ITALIAN GENETIC NETWORK (LIPIGEN)

A. Baragetti¹, M. Casula², P. Scarinzi³, F. Ristè⁴, R. Scicali⁵, M. Biolo⁶, S. Lugari⁷, M. Dall'Agata⁸, M. Gazzotti⁹, E. Olmastroni², Asiati Alieva⁹, F. Nascimbeni⁷

¹Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari,
Università degli Studi di Milano; ²Epidemiology and Preventive
Pharmacology Service (SEFAP), Dipartimento di Scienze
Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano;

³U.O.C. Clinica Medica 1, Dipartimento di Medicina DIMED,
Università di Padova; ⁴U.O. Medicina Interna Universitaria,
Dipartimento di Medicina Interna, Università di Ferrara;

⁵Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Medicina
Internna, Università di Catania; ⁶U.O.C. Clinica Medica 1,
Dipartimento di Medicina DIMED, Università di Padova;

⁷Unità di Medicina Interna e Medicina Metabolica, Ospedale Civile
di Baggiovara, Università di Modena, Reggio Emilia, Modena;

⁸U.O. Medicina Interna Universitaria, Dipartimento di Medicina
Internna, Università di Ferrara; ⁹Almazov National Medical
Research Centre, Saint Petersburg, Russia
E-mail: andrea.baragetti@unimi.it

Introduction. The detection of Achilles tendon xanthomas during physical examination contributes the score for the detection of Familial Hypercholesterolemia (FH), included in the Dutch Lipid Clinic Network score (DLCN). We aimed to evaluate whether the ultrasound-based identification of Achilles tendon xanthomata improved the identification of subjects with FH.

Methods. The ACTUS-FH (AChilles Tendon UltraSonography in Familial Hypercholesterolemia) is a multicentre observational study developed within the Lipid transPort disorders Italian GEnetic Network (LIPIGEN). Clinical, biochemical and genetic parameters were collected. The presence of ultrasound-based Achilles tendon xanthomata was recorded.

Results. In 769 subjects with clinically diagnosis of FH, ultrasonography improved xanthomata detection to 33.2% vs 9.8% at physical examination. By adding the ultrasound evidence in the DLCN score, the proportion of subjects classified as definite FH according to DLCN increased from 32.5% to 43.2%. Subjects with xanthomata detected only by ultrasound were more likely to have a positive genetic diagnosis of FH (FH/M+) (94.4%) as compared to subjects without Achilles tendon xanthomas (65.4%, p<.0001).

Conclusions. Ultrasonography identifies patients with tendon xanthomata that cannot be detected by physical examination, improving the number of patients correctly identified as definite FH according to DLCN score and those with proven genetic mutations.

PROC3 DERIVED SCORES FOR FIBROSIS PREDICT CARDIOVASCULAR EVENTS IN NAFLD PATIENTS

F. Baratta¹, D. Pastori¹, G. Tozzi², A. Colantoni³, N. Cocomello¹, S. Cecchi⁴, M. Coronati¹, F. Angelico⁵, M. Del Ben¹

¹Department of Clinical Internal, Anesthesiological and Cardiovascular Sciences, Sapienza - University of Rome;

²Division of Metabolism and Research Unit of Metabolic Biochemistry, Department of Pediatrics, IRCCS Bambino Gesù Children's Hospital; ³Department of Anatomical, Histological, Forensic Medicine and Orthopedic Sciences, Sapienza - University of Rome; ⁴Hepatology, Gastroenterology and Nutrition Unit, IRCCS "Bambino Gesù" Children's Hospital; ⁵Department of Public Health and Infectious Diseases, Sapienza - University of Rome
E-mail: francesco.baratta@uniroma1.it

Introduction. Cardiovascular diseases are the most common cause of death in NAFLD patients and accounts for twice the deaths in comparison to liver-related ones. Recently, a growing body of evidence showed that liver fibrosis is associated with poor survival in NAFLD patients. Despite this, liver fibrosis is underdiagnosed due to the high invasiveness, cost and interobserver variability of liver biopsy. Several clinical/biochemical scores were proposed in the last years to non-invasively diagnose the presence and the severity of liver fibrosis. Serum levels of PRO-C3 have been shown to have a good correlation with biopsy-proven liver fibrosis. PRO-C3 has been also included in some risk scores, namely ADAPT, FIB-C3 and ABC3D to predict liver fibrosis. Aim of the study was to investigate the association between serum PRO-C3 levels, scores including PRO-C3, and cardiovascular events (CVEs) incidence in the large cohort of NAFLD patients enrolled in the prospective Plinio Study.

Methods. The present study is a post hoc analysis of Plinio Study (Progression of Liver Damage and Cardiometabolic Disorders in Non-alcoholic Fatty Liver Disease: an Observational Cohort study. ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04036357). In this analysis were included only patients with US evidence of liver steatosis who consent the blood sampling, with no data missing for the analysis and who complete at least 6 months of follow-up. PRO-C3 assay and PROC-C3 derived score calculation: PRO-C3 was dosed using a commercial elisa kit. Age, Diabetes, PRO-C3 and platelets panel (ADAPT), FIBC3 panel and Age, body mass index (BMI), PRO-C3 and Diabetes panel (ABC3D) were calculated as previously described. Follow up: Data on CVEs were prospectively collected during follow-up. After enrolment, patients underwent periodical phone calls (every six months) and visits (every 12 months) in the outpatient clinic. Only the first CVE registered during follow-up was used in the analysis. The type of CVE was confirmed by medical records (imaging or discharge letter). In case of a fatal event, information was obtained from relatives or general practitioners.

Results. Plinio patients included in the analysis were 663. Mean age was 55.4±12.0 years and 38.6% were female. Median BMI of 30.2±4.9 kg/m², 59.7% and 29.9% of the patients had metabolic and type 2 diabetes mellitus, respectively. Median follow up length was 47.8 [25.3-72.8] months yielding 2786.5 person-years of observation. During the follow-up, 41 patients (1.5% year) experienced CVEs. Patients who experienced CVEs were more frequently male ($p=0.010$) and had higher prevalence of type 2 diabetes ($p=0.006$), metabolic syndrome ($p=0.002$) and of prior CVEs ($p<0.001$). There was no difference in median PROC-C3 according to CVEs. Instead, we found a higher prevalence of impaired ADAPT ($p=0.038$), FIBC3 ($p=0.015$) and ABC3D ($p<0.001$) in patients with CVEs. At multivariate cox regression analysis, CVEs were associated with

ABC3D>3 (HR: 2.29, $p<0.05$) in the whole population and with FIBC3 (HR: 1.40, $p<0.05$) and ABCD3 (HR: 1.40, $p<0.05$) in patients in primary prevention. The AUROC for the prediction of CVEs was 0.65 [0.56-0.73] for both FIBC3 and ADAPT scores and 0.63 [0.54-0.73] for ABC3D.

Conclusions. PROC3 levels didn't predict CVEs incidence, differently from PROC3 derived scores. ADAPT, FIB-C3 and ABC3D include cardiovascular risk estimators as variables to calculate the scoring. As previously supposed, these scores both detect advanced liver fibrosis and predict CVEs including shared risk factors in the algorithm. In conclusion, these scores detect patients at high risk for both liver and cardiovascular complications, identifying a sub-group of NAFLD patients who needs a multidisciplinary management.

LYSOSOMAL ACID LIPASE (LAL) INHIBITION AFFECTS DENDRITIC CELLS MATURATION

R. Bellini¹, F. Bonacina¹, M. Gomaraschi², G.D. Norata³

¹Department of Pharmacological and Biomolecular Sciences, University of Milan; ²Centro Grossi Paoletti, Department of Pharmacological and Biomolecular Sciences, University of Milan;

³Department of Pharmacological and Biomolecular Sciences, University of Milan; Center for the Study of Atherosclerosis, E. Bassini Hospital, Cinisello Balsamo (MI)
E-mail: rossella.bellini@unimi.it

Background. Lysosomal acid lipase (LAL) hydrolyzes apoB-carried cholesterol esters and triglycerides in the lysosome providing free cholesterol and fatty acids, which can be directed to several cellular pathways and used for cellular metabolism. In humans, severe LAL deficiency results in Wolman Disease with extensive accumulation of lipids within the lysosome, while mutations resulting in a partly dysfunctional LAL (Cholesteryl Ester Storage Disease-CESD). As LAL plays a key role not only in hepatocytes but also in immune cells, including macrophages and T lymphocytes, the aim of this project was to investigate the role of LAL during the development and maturation of dendritic cells (DCs).

Methods. Dendritic cells (DCs) were differentiated from PB-MC-derived monocytes of healthy donors or bone marrow cells of WT mice, following the treatment with GM-CSF and IL-4 for 6 days. Cells were then incubated with LPS to induce DCs maturation, in the presence or absence of Lalstat, a selective LAL inhibitor. Flow cytometry immunophenotyping paralleled by the evaluation of LAL activity during DCs maturation were performed to profile DCs characteristics.

Results. LAL activity increases in both human and mouse DCs during differentiation (-70%, $p<0.01$) and is reduced during LPS-induced DCs maturation (-26%). LAL inhibition promotes the reduction of the expression of the costimulatory receptor CD80 (an index of DCs maturation) in maturing DCs (-58%, $p<0.05$).

Conclusions. Lysosomal acid lipase, a checkpoint protein in lysosomal lipid homeostasis, bridges lipid metabolism and immuno-metabolic reprogramming during DCs differentiation and maturation. Ongoing studies are now aimed at elucidating the immuno-metabolic effects of targeting LAL during DCs maturation.

LOW BRACHIAL ARTERY FLOW-MEDIATED DILATION PREDICTS WORSE PROGNOSIS IN HOSPITALIZED PATIENTS WITH COVID-19

V. Bianconi¹, M.R. Mannarino¹, F. Figorilli², E. Schiaroli², E. Cosentini¹, G. Batori¹, E. Marini¹, A. Sahebkar⁴, F. Grignani¹, A. Gidari³, D. Francisci³, M. Pirro²

¹Unit of Internal Medicine, Department of Medicine, University of Perugia; ²Unit of Internal Medicine, Department of Medicine, University of Perugia; ³Unit of Infectious Diseases, Department of Medicine, University of Perugia; ⁴Biotechnology Research Center, Pharmaceutical Technology Institute, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran, Neurogenic Inflammation Research Center, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran, School of Pharmacy, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran
E-mail: v.bianconi.vb@gmail.com

Introduction. Endothelial injury can be induced by coronavirus disease 2019 (COVID-19) and seems to exert a crucial pathogenic role in its most severe clinical manifestations. We aimed to investigate the association between brachial artery flow-mediated dilation (bFMD), as a clinical and non-invasive measure of endothelial function, and in-hospital prognosis of COVID-19 patients.

Methods. Brachial artery flow-mediated dilation was assessed in hospitalized COVID-19 patients within 48 hours since hospital admission. The association between bFMD and either intensive care unit (ICU) admission or in-hospital death was explored using univariable and multivariable analyses.

Results. Four hundred and eight patients were enrolled. Significantly lower bFMD values emerged in COVID-19 patients with either radiographic signs of pneumonia, respiratory distress, or the need for non-invasive ventilation, as compared to those without ($p<0.001$, $p=0.001$, and $p<0.001$, respectively). Forty-two (10%) patients were admitted to ICU, 76 (19%) patients died, and 118 (29%) patients met the composite endpoint of ICU admission/in-hospital death. At unadjusted Cox regression analysis patients with bFMD <4.4% (the median value) had a significantly higher risk for the composite endpoint of ICU admission/in-hospital death as compared to those with bFMD $\geq 4.4\%$ (HR 1.675, 95% CI 1.155-2.428, $p=0.007$). At multi-adjusted Cox regression analyses low bFMD was independently associated with a 1.519-to-1.654-fold increased risk for the composite endpoint of ICU admission/in-hospital death.

Conclusions. Low brachial artery flow-mediated dilation can predict an unfavorable in-hospital prognosis in COVID-19 patients. Measurement of bFMD may be clinically useful in the prognostic stratification of COVID-19 patients upon hospital admission.

ANGPTL3 FIBRINOGEN-LIKE DOMAIN FACILITATES LIPOLYSIS IN 3T3-L1 CELLS COMMITTED TO ADIPOCYTES ACTIVATING THE INTRACELLULAR ERK PATHWAY

S. Bini, V. Pecce, A. Di Costanzo, I. Minicocci, A. Ghadiri, L. Polito, M. Arca, L. D'Erasmo

Department of Translational and Precision Medicine, Sapienza University of Rome, Policlinico Umberto I
E-mail: simone.bini@uniroma1.it

Background. Angiopoietin-like protein 3 (ANGPTL3) is proved to stimulate lipolysis in adipocytes, moreover its C-terminal fibrinogen-like domain (ANGPTL3-fld) was found to interact with the cellular integrin receptor $\alpha 3\beta 1$, possibly transmitting intracellular signaling. Here we investigate the possible intracellular pathway by which ANGPTL3-fld stimulates lipolysis in 3T3-L1 cells.

Material and Methods. Murine 3T3-L1 cells were differentiated to adipocytes. Lipolysis was analyzed in basal conditions and after treatment with ANGPTL3, Isoproterenol or ANGPTL3 pretreatment + isoproterenol. Intracellular kinases were investigated via western blotting or a proteome profiler. In order to investigate the ERK signaling, 3T3-L1 cells were also treated with Vemurafenib or DMSO for 48h in the 4 experimental conditions

Results. ANGPTL3-fld alone is not able to activate lipolysis in 3T3-L1 cells committed to adipocytes; however, ANGPTL3-fld pre-treatment determines FFA medium enrichment by two-fold when compared to isoproterenol treatment alone. Western blotting highlighted a similar activation of ERK in the three examined conditions if compared to untreated control. Hormone-sensitive lipase (HSL) phosphorylation was investigated: pSer565-HSL was activated in ANGPTL3-fld, whereas pSer660-HSL was predominant in the other conditions. Vemurafenib-mediated ERK pathway inhibition resulted in the inactivation of several MAPKs, untreated cells and isoproterenol-treated cells. Differently, in the ANGPTL3-fld treatment, upregulation of p38, PLC-gamma and PDGFR phosphorylation is evident and in the case of double treatment, the intracellular signaling completely shifts on Akt.

Discussion. ANGPTL3-fld activates intracellular AMPK and the ERK-pathway, whereas isoproterenol stimulation activates PKA signaling and ERK as well. The phosphokinase profile under Vemurafenib treatment suggests that while under isoproterenol treatment the metabolic change depends greatly on ERK1/2 activation, the ANGPTL3-fld treatment results in several intracellular signals upregulated under ERK-pathway inhibition that might be involved in different cellular activities. In conclusion, ANGPTL3 stimulation enhances β -adrenergic lipolysis through multiple intracellular pathways involved in the ERK signal.

NEW ERA IN HYPERCHOLESTEROLEMIA TREATMENT, INCLISIRAN: EARLY AND SUSTAINED LOW DENSITY LIPOPROTEIN-CHOLESTEROL REDUCTION WITH A TWICE PER YEAR ADMINISTRATION

A. Brambilla, S. Venezia, M. Latella, A. Garavaglia, E. Grillo
*Medical department, cardio-renal-metabolic area,
Novartis Farma S.p.A*
E-mail: andrea.brambilla@novartis.com

Inclisiran, small-interfering RNA (siRNA), works with the RNA interference (RNAi) mechanism which regulates proteins expression. Inclisiran binds PCSK9 mRNA, leads to its degradation thus decreasing PCSK9 protein expression and lowering LDL-C level. High cholesterol levels and prolonged time of exposure enhance risk of CV events, therefore also timing became crucial for atherosclerotic cardiovascular disease (ASCVD) patients. The early and effective LDL-C lowering action of inclisiran, together with the life-long LDL-C reduction, are positively correlated with CV risk reduction. The siRNA is conjugated with a triantennary GalNAC leading to specific hepatic delivery, therefore the compound is undetectable in plasma after 24-48 h from the injection. The LDL-C level drop is already significant at 14 days, and by day 30 the mean reduction is about 50% (ORION-1 trial). Chemical modifications at the siRNA back-bone level, protect inclisiran from degradation by liver nucleases. In the cytoplasm, RNAi mechanism occurs by the siRNA - RISC protein complex coupling. Physiologically, this bond last for long and the inclisiran modifications further enhance the complex stability. Therefore, one siRNA-RISC complex has an effect on multiple PCSK9 mRNAs, allowing inclisiran administration twice per year (after initial dose at baseline and 3 months), with an early, sustained and effective LDL-C level reduction. A pooled analysis of the 3 phase III trials (ORION-9/10/11) shows a time averaged (18 months) LDL-C reduction of 50.5% on top of therapy with statins+ezetimibe. Inclisiran provides effective evidence-based results on lowering LDL-C levels in different high CV risk populations (HeFH-established ASCVD/ASCVD-risk equivalent), which is demonstrated to be crucial for CV risk reduction. Furthermore, twice per year administration may positively improve adherence, thereby simplifying patient management and follow-up control. Based on these findings, we are stepping into a new era of biological therapeutics, where inclisiran represents the new, effective and safe therapeutic candidate for lowering LDL-C levels.

INCLISIRAN REDUCES LOW DENSITY LIPOPROTEIN-CHOLESTEROL INDEPENDENT OF GENOTYPE IN SUBJECTS WITH HETEROZYGOUS FAMILIAL HYPERCHOLESTEROLAEMIA

F.J. Raal¹, D. Kallend², K.K. Ray³, T. Turner⁴, W. Koenig⁵, R.S. Wright⁶, P.L.J. Wijngaard⁷, D. Curcio⁷, M.J. Jaros⁸, L.A. Leiter⁹, J.J.P. Kastelein¹⁰

¹*Faculty of Health Sciences, University of the Witwatersrand, Johannesburg, South Africa; ²DalCor Pharmaceuticals, Montreal, Quebec, Canada; ³the Imperial Centre for Cardiovascular Disease Prevention, Department of Primary Care and Public Health, Imperial College, London, UK; ⁴Medpace Reference Laboratories, Cincinnati, USA; ⁵Deutsches Herzzentrum München, Technische Universität München, and German Center for Cardiovascular Research, Munich Heart Alliance, Munich, and the Institute of Epidemiology and Medical Biometry, University of Ulm, Ulm, Germany; ⁶The Division of Preventive Cardiology and the Department of Cardiology, Mayo Clinic, Rochester, MN, USA; ⁷The Medicines Company, Parsippany, NJ, USA; ⁸Summit Analytical, Denver, USA; ⁹Li Ka Shing Knowledge Institute, St. Michael's Hospital, University of Toronto, Toronto, Canada; ¹⁰The Department of Vascular Medicine, Academic Medical Center, University of Amsterdam, Amsterdam, Netherlands*
E-mail: andrea.brambilla@novartis.com

Introduction. HeFH disease severity is linked to the causative mutation type and inclisiran was previously shown to reduce LDL-C in these patients. Important mutations in HeFH include those with two variants; double heterozygous (DH) and compound heterozygous (CH), which are phenotypically similar to HoFH; and functional mutations in LDLR (negative, defective and unknown). This analysis explored the efficacy of inclisiran on these genotypes relative to the genotypes examined previously.

Methods. ORION-9 randomized 482 patients with HeFH 1:1, to receive inclisiran 284 mg or placebo. Randomization was based on mutations in LDLR and APOB, PCSK9, LDLRAP1 genes. End-points included percent and absolute change in LDL-C and PCSK9 from baseline at Day 510 across the genetic variants.

Results. Compared with other variants, a greater proportion of patients with DH (33.9%) and LDLR negative (35.6%) had ASCVD. Higher baseline LDL-C was seen in CH, LDLR negative and pathogenic patients. The absolute and percent LDL-C reduction from baseline with inclisiran ranged from 1.4-2.1 mmol/L and 37-56% respectively across genotypes, with lower values corresponding to patients with CH. Reductions in LDL-C across severe genotypes, including DH, LDLR negative and pathogenic, were comparable to less severe genotypes. The degree of LDL-C reduction across the genotypes was unrelated to absolute and percent reduction in PCSK9.

Conclusion. While potential bias from sample size variability between subgroups cannot be excluded, the robust LDL-C reductions provided by inclisiran across a range of HeFH genotypes suggests that preventing PCSK9 synthesis provides therapeutic benefit independent of causative mutation.

NEXT GENERATION SEQUENCING IN SEVERE HYPERTRIGLICERIDEMIA: IDENTIFICATION OF A NOVEL NONSENSE MUTATION OF CREB3L3 GENE

F. Brucato¹, R. Scicali², C. Scrimalli¹, M. Gueli Alletti¹, R. Spina¹, V. Ingrassia¹, G.I. Altieri¹, D. Noto¹, G. Misiano¹, A. Giannamico¹, C.M. Barbagallo¹, A. Ganci¹, A.B. Cefalù¹, F. Purrello², M.R. Averna¹

¹Dipartimento di Promozione della Salute, Materno-Infantile, di Medicina Interna e Specialistica di Eccellenza "G. D'Alessandro" (PROMISE), Università degli Studi di Palermo; ²Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Università degli Studi di Catania

E-mail: federicabrucato21@gmail.com

Introduction. Hypertriglyceridemia (HTG) is a common form of dyslipidemia associated with an increased risk of cardiovascular disease and pancreatitis. The severe forms are characterized by very high plasma levels of triglycerides (TG) (>1000 mg/dL -11.2 mmol/l). Monogenic autosomal recessive forms are characterized by homozygous or compound heterozygous loss-of-function mutations of genes involved in the intravascular lipolysis of the triglyceride-rich lipoproteins, namely lipoprotein lipase (LPL), apolipoprotein C2 (APOC2), apolipoprotein A5 (APOA5), glycoprophosphatidylinositol (GPI)-anchored high-density lipoprotein-binding protein 1 (GPIHBP1), lipase maturation factor 1 (LMF1), and glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 (GPD1). Mutations in CRE-binding protein 3-like 3 (CREB3L3) and glucokinase regulator (GCKR) have been associated to dominant familial hypertriglyceridemia.

Materials and Methods. We performed a Next Generation Sequencing (NGS) analysis to study the coding exons and intron/exon boundaries of genes affecting the main pathways of triglyceride synthesis and metabolism in outpatients with severe hypertriglyceridemia.

Results and Conclusion. In the majority of subjects no functionally relevant mutations in the LPL, APOC2, APOA5, GPIHBP1, and LMF1 genes were detected. Two patients were found to be carriers of mutations in CREB3L3 gene. A 54 years old woman with very high TG levels (up to 1900 mg/dL) was found to be carrier of a novel nonsense heterozygous mutation (c.610C>T p.Arg204Ter) while a 51 years old woman with TG levels up to 1000 mg/dL was heterozygous for an already known pathogenic mutation (c.718G>A p.Glu240Lys). The p.Arg204Ter variant is predicted to result in the formation of a premature stop codon and synthesis of a truncated protein devoid of function. NGS is a powerful tool for the genetic diagnosis of HTG and mutations of CREB3L3 gene may be associated with severe forms of hypertriglyceridemia.

METABOLIC CHANGES IN SARS-COV-2 INFECTION: CLINICAL DATA ON ALTERATIONS OF LIPID PROFILE IN COVID-19 PATIENTS

D. D'Ardes^{#*1,5}, I. Rossi^{#*1}, B. Bucciarelli¹, M. Allegra¹, M. Gentile¹, F. Troiano¹, P. Vizzarri¹, F. Bianco², B. Sinjari³, M. Marchionni⁴, M. Di Nicola⁴, F. Santilli^{1,5}, M.T. Guagnano^{*1,5}, F. Cipollone^{*1,5}, M. Bucci^{*1,5}

¹Clinica Medica Institute, Department of "Medicine and Science of Aging", "G. d'Annunzio" University, Chieti; ²Pediatric Cardiology and Adult Congenital Heart Disease, Azienda Ospedaliero-Universitaria "Ospedali Riuniti" of Ancona; ³Department of Innovative Technologies in Medicine and Dentistry, "G. d'Annunzio" University, Chieti-Pescara; ⁴Laboratory of Biostatistics, Department of "Medical, Oral and Biotechnological Sciences", "G. d'Annunzio" University, Chieti-Pescara, Chieti;

⁵Azienda Sanitaria Locale n. 2 Abruzzo Lanciano-Vasto-Chieti
[#]These authors share first authorship
^{*}These authors share senior authorship
^{*Corresponding Authors: Damiano D'Ardes and Ilaria Rossi}

E-mail: mbucci@unich.it

It seems that during SARS-CoV-2 infection total cholesterol, LDL-C, HDL-C values decrease and lipids could play a fundamental role in viral replication. We performed a retrospective analysis of 118 hospitalized patients with COVID-19, comparing pre-infection lipid profile (53 patients) to those measured on admission, with the aim of evaluating whether SARS-CoV-2 infection could be involved in lipid profile alterations and to study possible correlations with disease severity and clinical outcome. Median baseline values at the admission time were: total cholesterol 136.89 ± 42.73 mg/dl, LDL-C 81.53 ± 30.35 mg/dl, HDL-C 32.36 ± 15.13 mg/dl, triglycerides 115.00 ± 40.45 mg/dl, non-HDL-C 104.53 ± 32.63 mg/dl. Median values of pre-infection total cholesterol and HDL-C were significantly higher than those measured at the admission time (p value <0.05). C-reactive protein (CRP) negatively correlated with LDL-C (p=0.013) and HDL-C (p=0.05). Our data suggest a possible relation between COVID-19 and lipid profile with a negative correlation between CRP and LDL-C and HDL-C values, proposing the hypothesis that lipid lowering could follow the rising of COVID-19 inflammatory state.

THE CHALLENGE OF LIPID-MODIFYING THERAPIES IN THE ACHIEVEMENT OF OPTIMAL LDL-C LEVELS IN HIGH AND VERY HIGH CV RISK PATIENTS: STILL AN OPEN QUESTION, WAITING FOR BEMPEDOIC ACID

B. Bucciarelli^{#*1}, F. Bianco^{#*2}, D. D'Ardes^{1,3}, I. Rossi^{1,3}, F. Troiano¹, P. Vizzarri¹, M. Caporale¹, F. Cipollone^{1,3}, M. Bucci^{1,3}

¹"Clinica Medica" Institute, Department of "Medicine and Science of Aging", "G. d'Annunzio" University, Chieti; ²Pediatric Cardiology and Adult Congenital Heart Disease, Azienda Ospedaliero-Universitaria "Ospedali Riuniti" of Ancona; ³Azienda Sanitaria Locale n. 2 Abruzzo Lanciano-Vasto-Chieti

E-mail: mbucci@unich.it

Background. Hypercholesterolemia is one of the main modifiable atherosclerotic cardiovascular disease (ASCVD) risk factors. Thus, optimal treatment is essential, namely in patients with high or very high CV risk, in order to achieve the LDL-C levels recommended by European Society of Cardiology/European Atherosclerosis Society (ESC/EAS) guidelines. Our purpose was to evaluate the efficacy of lipid-modifying therapies (LMT) and the achievement of treatment goals in a cohort of patients at high and very high CV risk, followed for 8±2 months. All patients were enrolled at our Lipid Clinic to evaluate the actual efficacy of the currently available LMT for these patients.

Methods. We enrolled 27 consecutive patients, referred to our Lipid Clinic Center in Chieti between November 2020 and January 2021. Inclusion criteria were: age over 18 and high or very high CV risk, estimated with ESC-SCORE (Systematic Coronary Risk Estimation) charts. The follow-up ended in September 2021. Five patients were excluded due to missing laboratory data during follow-up; 23 patients (mean age 60±13 years old, 74% of males) constituted the final sample of the present analysis.

Results. The majority of patients (n=17/23, 74%) were treated with Ezetimibe, while Rosuvastatin was the most utilized statin (n=10/23, 43%); 9 subjects were treated with both. At the follow-up, the entire population experienced a significant reduction of total cholesterol and LDL-C ($p=0.014$ and $p=0.011$, respectively), with a change from the baseline of -28 [-103, 13 (Q1, Q3)] and -34 [-92, 11 (Q1, Q3)] mg/dL. According to the ESC/EAS recommendations, n=11/23 (50%) participants achieved the treatment goal. At the multivariable analysis, the adding of PCSK9i (more frequently Evolocumab) was the main LMT that lead to the achievement of treatment goal [(OR 2.42, 95% CI: 0.26, 5.12 ($p=0.043$)].

Conclusions. In our cohort of high and very high CV risk patients, the adding of PCSK9i shows to be the most effective LMT to achieve the therapeutic target. Future studies will able to evaluate the role of bempedoic acid, a promising, less expensive LMT, in this clinical scenario.

THE COMPLICATED RELATIONSHIP BETWEEN FAMILIAL HYPER-CHOLESTEROLEMIA AND STATINS IN THE ERA OF BIOLOGICAL DRUGS

M. Caporale^{*1}, F. Troiano^{*1}, P. Vizzarri¹, I. Rossi^{1,2}, D. D'Ardes^{#1,2}, F. Cipollone^{1,2}, M. Bucci^{1,2}

¹"Clinica Medica" Institute, Department of "Medicine and Science of Aging", "G. d'Annunzio" University, Chieti;

²Azienda Sanitaria Locale n. 2 Abruzzo Lanciano-Vasto-Chieti;

[#]These authors share first authorship;

^{*}These authors share senior authorship

E-mail: mbucci@unich.it

Familial Hypercholesterolemia (FH) is the most common lipidic disorder inducing early cardiovascular disease (CV). It is a hereditary disease with predominantly autosomal dominant transmission, but new mutations have been recently identified resulting in a lower liver sensitivity to LDL, as well as a lower response to treatment with statins. After the arrival of the PCSK9is, the need to identify which of the mutations associated with FH are more or less correlated with a reduction in cardiovascular risk and which of them is more or less responsive to traditional drugs or to innovative ones is growing. In this context, the aim of our study was to evaluate the therapeutic efficacy of statins/ezetimibe alone and in association with PCSK9i, by measuring and comparing LDL values in different genetic polymorphisms. Starting from our database of LIPIGEN study, we included 10 patients, 4 women, 6 men, (mean age 48,6 yo). All participants belong to a restricted territorial cluster (Sulmona, AQ) in which 3 patients are carriers of the FH mutation and poor responders to statins, 7 have FH mutation alone but with evident resistance to statin therapy. The study was conducted at our Lipid Clinic of Chieti University by carrying out a blood sample for the genetic study of any mutations and serial checks of LDL levels. The results have shown a poorer control of LDL values during treatment with statin/ezetimibe used alone with an average of 224,1 mg/dL; meanwhile, a marked improvement in lipid profile control (average =50,3 mg/dL) has been noted in all patients after the adding of PCSK9i. Moreover, the treatment with PCSK9i was associated with relevant reduction of LDL values (median 72%); this trend was not affected by the presence of the gene mutation associated to poor response to statins. Particularly, in 2 patients of the same family, with the same mutation, the response to PCSK9i in terms of reduction of LDL was comparable, even if one of the patients carried the mutation of statin intolerance and the other one didn't have it.

In conclusion, the simultaneous use of both drugs could be associated with better control of LDL levels and consequently with a lower risk of cardiovascular events independently from mutations, especially in those patients with FH mutation and poor response to statin treatment. This preliminary report could represent a start point that anyway needs further investigation to confirm our emerging data.

HIGHER ORAL PORPHYROMONAS GINGIVALIS (PG) ABUNDANCE IS ASSOCIATED WITH PREVIOUS ATHEROSCLEROTIC CARDIOVASCULAR DISEASE IN HIGH-RISK PATIENTS AND IN PATIENTS WITH HETEROZYGOUS FAMILIAL HYPERCHOLESTEROLEMIA

P. Magni^{*1,2}, P. Pignatelli^{*3}, D. D'Ardes^{#4}, L. Scorpiglione⁴, F. Cipollone⁴, A.L. Catapano^{1,2}, A. Piattelli³, M.C. Curia^{*1}, M. Bucci^{*4}

^{*}Equally contributed; [#]Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano;

¹IRCCS MultiMedica, Sesto S. Giovanni, Milan; ²Department of Medical, Oral and Biotechnological Sciences, Università degli Studi "Gabriele d'Annunzio" di Chieti-Pescara, Chieti; ³Regional Center for the Study of Atherosclerosis, Hypertension and Dyslipidemia, "S.S. Annunziata" Hospital - ASL Chieti; Ce.S.I.-Met, Università degli Studi "Gabriele d'Annunzio" di Chieti-Pescara, Chieti;

^{*}These authors share first authorship;

[#]These authors share senior authorship

E-mail: mbucci@unich.it

Introduction. Low-grade chronic inflammation, promoted by dysbiosis of gut and oral microbiota, is a risk factor for atherosclerotic cardiovascular disease (ASCVD). It may play a role in the individual susceptibility to ASCVD observed in the general population and in heterozygous familial hypercholesterolemia (FH). High Porphyromonas gingivalis (PG) concentrations have been associated with clinical and experimental atherosclerosis. PG induces HDL-C oxidation and stimulates atherosclerosis-related gene expression in macrophages and foam cells in the presence of oxLDL.

Aim. We assessed oral PG abundance in very high-risk patients with FH (with/without previous ASCVD) and in patients in secondary ASCVD prevention. Methods: In this cross-sectional study, 21 patients with genetically proven FH (7/21 with previous ASCVD, 20 non-FH patients in secondary ASCVD prevention and 20 healthy controls, were selected from the patients cohort enrolled by Lipid Clinic of Chieti in the LIPIGEN study to quantify oral PG abundance through qPCR and assess the oral health status.

Results. The 3 groups did not differ for gender distribution, BMI, smoking, alcohol intake, gingival index. Non-FH patients were older than FH patients (mean difference: -12.4 years) and controls (11.3). TG, TC, HDL-C were similar between FH and non-FH groups. LDL-C was higher in FH patients ($p=0.002$). There was a trend to a higher plaque index ($p=0.075$), a reduced number of teeth ($p=0.116$) and a greater use of mobile prostheses ($p=0.101$) in non-FH patients vs FH patients. Oral PG abundance was higher in non-FH vs FH ($p=0.084$) and in non-FH vs controls ($p=0.021$) (Kruskal-Wallis Test with DSCF pairwise comparisons). PG was higher among FH patients with previous ASCVD events ($p=0.040$, Mann-Whitney test). Oral PG quantity and TG levels were positively correlated ($p=0.079$; rho=0.391), while PG and HDL-C were inversely correlated ($p=0.139$; rho=-0.326) in the FH group.

Conclusions. Higher oral PG abundance is present in high-risk patients, with or without FH, and may be related ASCVD events. Whether this finding relates to an increased risk of ASCVD events in FH patients remains to be addressed.

EFFECTIVENESS OF THE DUTCH LIPID CLINIC NETWORK SCORE (MODIFIED FOR ITALY) IN A CASE OF SUBJECTS OF AGE >18 YEARS AND COMPARISON WITH THE SUBPOPULATION BETWEEN 18 AND 45 YEARS OF AGE

P. Vizzarri^{#*1}, D. D'Ardes^{#*12}, I. Rossi^{1,2}, F. Troiano¹, M. Caporale¹, F. Cipollone^{1,2}, M. Bucci^{1,2}

¹Clinica Medica" Institute, Department of "Medicine and Science of Aging", "G. d'Annunzio" University, Chieti;

²Azienda Sanitaria Locale n. 2 Abruzzo Lanciano-Vasto-Chieti;

^{*}These authors share first authorship;

[#]These authors share senior authorship

E-mail: mbucci@unich.it

Background. Familial hypercholesterolemia (FH) is the most frequent genetic disorder among family dyslipidemias. Therefore, an early diagnosis and the development of clinical tools such as the Dutch Lipid Clinic Network Score (DLCNS) (1) are essential for identifying FH subjects as soon as possible and to avoid the onset of acute cardiovascular (CV) events. Our aim was to evaluate the performance of the DLCNS modified for Italy (DLCNS-I) (2) in identifying patients with genetically defined FH, particularly in the subgroup of patients <45 years.

Methods. The DLCNS-I and the result of genetic analysis were assessed retrospectively on a group of patients followed at the Chieti Lipid Clinic and already enrolled in the LIPIGEN project.

Results. The DLCNS-I was calculated on a population of 96 subjects >18 years old (average =49.04 years). Within the subcategory with clinically defined FH (score >8), 80.95% of patients presented a positive genetic analysis for FH or other variants of uncertain clinical significance (VUS). In the subgroup 18-45 years (n=34, mean age= 34), among patients with clinically defined FH, 93.3% presented a positive genetic analysis for FH or VUS. Compared to the total population, among 18-45 years old patients, those with missing data for the calculation of DLCNS-I were less numerous (22.9% vs 35.3% had no missing criteria; 30.2% vs 38.2% had 1 missing criterion); whereas patients with 2, 3 or 4 missing criteria (respectively 24.0% vs 23.5%; 13.5% vs 0%; 9.4% vs 2.9%) were more numerous in the sub-population >45 years. If we have no more than one missing diagnostic criterion (as observed in subjects 18-45 yo), despite lower average of LDL-C levels and less frequent CV events, DLCNS-I proved to be more effective thanks to a more complete anamnestic collection and a better physical examination.

Conclusions. The DLCNS-I has confirmed its usefulness in the diagnosis of FH, but it is certainly complex as regards a complete and effective compilation. Positive predictive value of DLCN-I is higher if performed by expert doctors.

References

- Nordestgaard BG et al. Eur Heart J. 2013; 34: 3478-90a.
- Casula M et al. Atherosclerosis. 2018; 277: 413-418.

STATIN USE IN ITALIAN CHILDREN: A RETROSPECTIVE AUDIT OF A SINGLE PEDIATRIC HOSPITAL

P.S. Buonuomo, I. Rana, M.V. Gonfiantini, M. Macchiaiolo,
D. Vecchio, A. Coretti, A. Bartuli
Bambino Gesù Children's Hospital, Rome;
E-mail: psabrina.buonuomo@opbg.net

Background. The leading cause of mortality worldwide is atherosclerotic cardiovascular disease (ASCVD). Atherosclerotic lesions begin during childhood and can place individuals at greater risk for ASCVD. There is increasing evidence that the administration of statins early in life is beneficial in preventing or reducing atherosclerosis. Anyway, guidelines for the use of statins in children are currently only in place for FH and are fairly universal. According to local policy, atorvastatin is approved for use in children with heterozygous FH from the age of 10, with only pravastatin approved in children from the age of 8. Simvastatin is suggested in BNF for children from the age of 5 and rosuvastatin for children aged 6 years or older but these indications are not always received from local authorities. This study aimed to perform an audit of the use of statins in Italian children.

Methods. A retrospective audit of patients prescribed statins in a single children's hospital (Bambino Gesù Children's Hospital, Rome, Italy) was performed. Patients were identified through hospital patient records. Statin use (dose, type), as well as medical history and side effects, were recorded.

Results. A total of 256 patients (126 females, 130 males) under the age of 18 were included in the audit. The most common reasons for being prescribed a statin included a diagnosis of familial hypercholesterolemia (FH) (94%) or history of renal disease (Chronic kidney disease or Nephrotic syndrome, 4%) and diabetes (2%). Four statins were prescribed: atorvastatin (n=158), pravastatin (n=80), rosuvastatin (n=15), simvastatin (n=3). Interestingly, 29/80 pts (35%) initially treated with pravastatin were shifted to atorvastatin at the age of 10 due to low response to treatment. In a little percentage of patients (4%), statins were used in very young children (1-7 years old).

Conclusions. This retrospective hospital audit shows that statins, without a uniform choice of type, are prescribed to hypercholesterolemic children other than FH, as well as very young children, only in a small number of patients. Since pediatricians may play an active and determinant role in preventing the progression of risk factors and future ASCVD events, actions are needed to increase the number of treated children and at an earlier age.

DIETARY CHOLINE CONTENT AND HDL LEVELS CONTRIBUTE TO A PRO-ATHEROGENIC PLASMA METABOLOMIC PROFILE IN MICE

M. Busnelli¹, E. Franchi¹, S. Manzini¹, A. Colombo¹,
M.A. García-Rivera², J. Kirwan², X. Zhang³, P. Gérard³, G. Chiesa¹

¹Department of Pharmacological and Biomolecular Sciences - Università degli Studi di Milano;

²Max Delbrück Center for Molecular Medicine, Berlin, Germany;

³Micalis Institute - INRAE, Jouy-en-Josas, France

E-mail: marco.busnelli@gmail.com

Gut microbiota can influence atherosclerosis development by metabolizing dietary choline: experimental and observational studies have highlighted a positive correlation between increased plasma choline-derived TMAO concentrations and adverse cardiovascular events. This study was aimed at investigating how the plasma metabolome of mice prone to atherosclerosis development was modulated by HDL levels and the dietary intake of choline. Low-fat, no cholesterol diets with different choline content (0.09% or 1.2%) were administered for 16 weeks to two groups of atherosclerosis-prone female mice:

- 1) extremely low-HDL mice, deficient for both murine apoA-I and apoE (DKO);
- 2) high-HDL mice, deficient for both apoA-I/apoE, but overexpressing human apoA-I (DKO/hA-I).

At sacrifice, atherosclerosis was evaluated, and a targeted metabolomics of plasma was performed. As expected, atherosclerosis, evaluated at the aortic sinus, was strongly increased in DKO vs DKO/hA-I mice. Surprisingly, although the high-choline diet resulted into elevated plasma TMAO levels in both genotypes, choline supplementation significantly worsened plaque development only in DKO/hA-I mice. Noteworthy, high-choline diet led to an increased concentration of plasma lipids only in DKO/hA-I mice: mainly triglycerides and hexosylceramides, but also ceramides and sphingomyelins. Several markers of increased cardiovascular disease risk and compromised renal function such as asymmetric dimethylarginine, symmetric dimethylarginine, inoxyl sulfate, creatinine and the microbiota-derived metabolite phenylacetylglutamine were increased only in high-choline-fed DKO/hA-I mice. Interestingly, the antioxidant histidine-containing dipeptide carnosine and its methylated form anserine were also increased by high-choline diet in DKO/hA-I.

In conclusion, our results indicate that dietary choline supplementation worsens atherosclerosis development only in the presence of HDL. Plasma metabolomics clearly indicated that choline supplementation increases the concentration of different lipid classes as well as of different metabolites indicative of augmented cardiovascular risk and impaired kidney function. Further studies are under way to assess the impact of the gut microbiota composition in regulating the biosynthesis of these molecules.

PROPROTEIN CONVERTASE SUBILISIN-KEXIN TYPE 9 INHIBITORS REDUCE PLATELET ACTIVATION MODULATING OX-LDL PATHWAYS

V. Cammisotto¹, F. Barattà², V. Castellani³, S. Bartimoccia³, C. Nocella², L. D'Erasmo⁴, N. Cocomello², C. Barale⁵, R. Scicali⁶, A. Di Pino⁶, S. Piro⁶, M. Del Ben⁷, I. Russo⁸, F. Purrello⁹, M. Arca¹⁰, R. Carnevale¹¹, F. Violà¹², D. Pastori¹³, P. Pignatelli¹⁴
¹Department of General Surgery and Surgical Speciality "Paride Stefanini" Sapienza University of Rome; ²Department of Clinical, Internal Medicine, Anesthesiological and Cardiovascular Sciences, Sapienza University of Rome; ³Department of Medical-Surgical Sciences and Biotechnologies, Sapienza University of Rome; ⁴Department of Translational and Precision Medicine, Sapienza University of Rome; ⁵Department of Clinical and Biological Sciences, University of Turin; ⁶Department of Clinical and Experimental Medicine, Internal Medicine, University of Catania; ⁷Department of Clinical, Internal Medicine, Anesthesiological and Cardiovascular Sciences, Sapienza University of Rome; ⁸Department of Clinical and Biological Sciences, University of Turin; ⁹Department of Clinical and Experimental Medicine, Internal Medicine, University of Catania; ¹⁰Department of Translational and Precision Medicine, Sapienza University of Rome; ¹¹Department of Medical-Surgical Sciences and Biotechnologies, Sapienza University of Rome, Rome, Italy; Mediterranea Cardiocentro, Napoli; ¹²Mediterranea Cardiocentro, Napoli; ¹³Department of Clinical Internal, Anesthesiological and Cardiovascular Sciences, Sapienza University of Rome; ¹⁴Department of Clinical Internal, Anesthesiological and Cardiovascular Sciences, Sapienza University of Rome, Mediterranea Cardiocentro, Napoli
E-mail: vittoria.cammisotto@uniroma1.it

Background. Proprotein convertase subtilisin kexin type 9 inhibitors (PCSK9i) lower LDL-cholesterol, slow atherosclerosis preventing cardiovascular events. While it is known that circulating PCSK9 enhances platelet activation (PA) and that PCSK9i reduce it, the underlying mechanism is not still clarified.

Methods. In a multicenter before-after study in 80 heterozygous familial hypercholesterolemia (HeFH) patients on treatment with maximum tolerated statin dose + ezetimibe, PA, soluble-NOX2-derived peptide (sNOX2-dp) and oxidized-LDL (ox-LDL) were measured before and after 6 months of PCSK9i treatment. In vitro study investigates the effects of plasma from HeFH patients before and after PCK9i on PA in washed platelets (wPLTs) from healthy subjects.

Results. Compared to baseline, PCSK9i reduced the serum levels of LDL-c, ox-LDL, Thromboxane (Tx) B2, sNOX2-dp and PCSK9 ($p<0.001$). The decrease of TxB2 correlates with that of ox-LDL while ox-LDL reduction correlated with PCSK9 and sNOX2-dp delta. In vitro study demonstrated that wPLTs resuspended in plasma from HeFH after PCSK9i treatment induced lower PA and sNOX2-dp release than those obtained using plasma before PCSK9i treatment. This reduction was vanished by adding ox-LDL. ox-LDL-induced PA was blunted by CD36, LOX1 and NOX2 inhibition.

Conclusions. PCSK9i treatment reduces PA modulating NOX2 activity and in turn ox-LDL formation in HeFH patients.

EFFECTS OF ANTI-PCSK9 MONOCLONAL ANTIBODIES ON PROPROTEIN CONVERTASE SUBILISIN-KEXIN TYPE 9 ASSOCIATION TO LOW-DENSITY LIPOPROTEINS

L. Canclini¹, A. Baragetti¹, N. Jabnati², A.M. Malvandi³, L. Grigore⁴, A.L. Catapano¹

¹IRCCS MultiMedica, Milan, Department of Pharmacological and Biomolecular Sciences, University of Milan; ²Department of Pharmacological and Biomolecular Sciences, University of Milan; ³IRCCS MultiMedica, Milan; ⁴IRCCS MultiMedica, Milan, Center for the Study of Atherosclerosis, Bassini Hospital, Cinisello Balsamo (MI)

E-mail: laura.canclini@unimi.it

Background and Aim. Proprotein convertase subtilisin-kexin type 9 (PCSK9) promotes the intracellular degradation of the hepatic low-density lipoprotein receptor (LDLR), thus increasing LDL-C plasmatic levels. PCSK9 inhibition using monoclonal antibodies (mAbs) produces a large drop in LDL-C levels, with a consequent reduction in cardiovascular events. Our previous studies showed the existence of PCSK9-LDL complexes in plasma. Prompted by this observation, we aimed at establishing whether if anti-PCSK9 mAbs administration could modify the PCSK9-LDL association.

Material and Methods. We enrolled patients treated with Alirocumab 75 mg (n=3)/150 mg (n=2) or Evolocumab 140 mg (n=12). We isolated their lipoproteins (LPs) with Iodixanol-gradient ultracentrifugation before the first mAbs administration (T0, n=17) and 1 (T1, n=14), 3 (T3, n=15) and 6 (T6, n=12) months after therapy. The PCSK9 content of the LP fractions obtained was quantified by ELISA (R&D Systems); cholesterol and triglycerides were measured using colorimetric assays.

Results and Conclusions. LDL-C levels, 143.8 ± 71.3 mg/dL at T0, decreased to 59.7 ± 36.8 mg/dL at T1, 62.3 ± 52.6 mg/dL at T3, 49.4 ± 24.7 mg/dL at T6. PCSK9 levels in plasma increased from 416.9 ± 133.9 ng/mL at T0 to 3758.4 ± 1175.3 ng/mL at T1, 3970.5 ± 975.8 ng/mL at T3 and 4039 ± 1118.7 ng/mL at T6. At baseline (T0), $10 \pm 4.6\%$ of total recovered PCSK9 was in the LDL fraction. $6.5 \pm 3.4\%$ (T1), $5.7 \pm 3.7\%$ (T3) and $5 \pm 3.7\%$ (T6) of PCSK9 was found in the LDL fraction after treatment, indicating that the PCSK9-LDL association remains despite the dramatic reduction of LDL-C due to the mAbs therapy. PCSK9 was recovered in a specific LDL sub-fraction both before and after mAbs administration. The absolute amount of PCSK9 LDL-bound increases more than 10 fold after therapy. Further studies are required to define the reason of this increased affinity and the possible biological consequences of the PCSK9-LDL association.

NEXT-GENERATION SEQUENCING HIGHLIGHTS NEW APOB VARIANTS AS A POTENTIAL CAUSE OF FAMILIAL HYPERCHOLESTEROLEMIA

G. Cardiero¹, D. Palma¹, U. Galicia-Garcia², A. Larrea-Sebal², M.D. Di Taranto¹, C. Martin², G. Fortunato¹

¹Dipartimento di Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche, Università degli Studi di Napoli Federico II, Napoli;

²CEINGE S.C.a r.l. Biotecnologie Avanzate, Napoli;

²Fundación Biofisika Bizkaia, Leioa, Spagna

E-mail: cardiero@ceinge.unina.it

Aim. APOB mutations are a rare cause of familial hypercholesterolemia (FH). The introduction of next-generation sequencing (NGS) has revealed the presence of new variants in regions of the gene that were not analyzed by direct sequencing. Most of APOB variants remain of uncertain significance (VUS) for the absence of functional studies. The aim of study is to highlight the frequency of APOB rare variants and the crucial role of functional characterization in pathogenicity assessment.

Materials and Methods. Eighty patients with clinical suspicion of FH, previously analyzed with direct sequencing for the FH causative genes, were screened by NGS. In vitro characterization of five VUS found in APOB gene was performed by different approaches: proliferation assay of U937 cells, evaluation of LDL uptake in hepatoma cells labelling the patient's LDL with FITC and affinity assay of the patient's LDL for LDLR measuring the EC50 by solid-phase immunoassay.

Results. NGS analysis revealed the presence at heterozygous state of 36 VUS in the APOB gene. The U937 proliferation assay performed for only five APOB variants (p.Thr3785Ile, p.Ala2790Thr, p.Ser3801Thr, p.Asn4107Ser and p.Thr4179Ser) revealed a decreased cell growth (less than 75% of wild-type) for cells incubated with patient LDL carrying. This results were confirmed by decreased uptake of patient's LDL (less than 50% for p.Thr3785Ile, p.Ala2790Thr and p.Ser3801Thr; less than 70% for p.Asn4107Ser and p.Thr4179Ser). Finally, the affinity of the patient's LDL for LDLR was lower (with an EC50 approximately double than wild-type for most variants).

Conclusions. All the five rare variants in the APOB gene were shown to affect protein function, even though to a different degree. The functional data allows to attribute an important pathogenicity criteria that change the VUS into a likely pathogenic variant. These characterizations improve the genetic diagnosis of FH.

SERUM PCSK9 LEVELS AND VASCULAR DISEASE IN TYPE 2 DIABETIC PATIENTS

G. Armentaro¹, V. Cassano¹, E. Clausi¹, G. Mannino¹, T.V. Fiorentino¹, M. Perticone¹, E. Succurro¹, F. Andreozzi¹, F. Carbone², F. Montecucco², G. Sestì³, A. Sciacqua¹

¹Department of Medical and Surgical Sciences, University Magna Graecia of Catanzaro; ²Department of Internal Medicine and medical specialties, University of Genova; ³Department of Clinical and Molecular Medicine, University of Rome-Sapienza, Rome

E-mail: velia.cassano@libero.it

Background. Recent studies proposed Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin type 9 (PCSK9) as a new biomarker for atherosclerosis, due to its role in the degradation of low-density lipoprotein receptor (LDL-R). An over expression of the PCSK9 gene is related with increased of LDL cholesterol (LDL-C) plasma concentration and cardiovascular (CV) risk. Moreover, PCSK9 is related with arterial stiffness. The aim of the present study was to investigate the correlation between circulating levels PCSK9 serum and arterial stiffness in a large cohort of Caucasian patients affected by type 2 diabetes mellitus (T2DM), with no previous CV events.

Methods. We enrolled 401 T2DM, hypertensive, Caucasian patients. All patients presented normal renal function (GF>60 ml/min/1.73 m²). PCSK9 was measured by colorimetric Elisa test. Arterial stiffness as the measurement of the carotid-femoral pulse wave velocity (PWV).

Results. Patients were divided in three tertiles according to increasing level of circulating PCSK9. From the I to the III tertiles, there was a statistically significant increase of high sensitivity C-reactive Protein (hs-CRP), fibrinogen and White Blood Cells (WBC) and a reduction of Estimated Glomerular Filtration Rate (eGFR). Patients with higher levels of PCSK9 presented increased systolic blood pressure (SBP) ($p<0.0001$), diastolic blood pressure (DBP) ($p<0.0001$) and PWV ($p<0.0001$). PWV was significantly and directly correlated with fibrinogen ($p<0.0001$), WBC ($p<0.0001$), age ($p=0.024$), PCSK9's levels ($p=0.003$), and indirectly correlated with body mass index (BMI) ($p=0.001$), diuretic therapy ($p=0.001$). PCSK9 was the major predictor of PWV, justifying 16.9% of its variation.

Conclusion. For the first time, our study demonstrated a close association between circulating levels of PCSK9 and PWV, in T2DM, hypertensive, Caucasian subjects without previous CV events. In conclusion, PCSK9 could be a biomarker for CV risk stratification in diabetic subjects.

OXIDATIVE STRESS AND LEFT VENTRICULAR PERFORMANCE IN PATIENTS ACCORDING TO DIFFERENT GLYCOMETABOLIC PHENOTYPES

V. Cassano¹, S. Miceli¹, G. Armentaro¹, K. Barbara¹, D. Crescibene¹, V. Condoleo¹, G. Severini¹, V. Monaco¹, M. Perticone¹, F. Andreozzi¹, G. Sesti², A. Sciacqua¹

¹Department of Medical and Surgical Sciences, University Magna Graecia of Catanzaro; ²Department of Clinical and Molecular Medicine, University of Rome-Sapienza, Rome
E-mail: velia.cassano@libero.it

Background. Recent studies demonstrated that in normoglycose-tolerant subjects (NGT), 1-h post load plasma glucose value ≥ 155 mg/dl, during oral glucose tolerance test (OGTT), identifies a worse cardio-metabolic risk profile and with increased risk for Type 2 Diabetes Mellitus (T2DM). T2DM patients present increased oxidative stress, due to high blood glucose levels, which plays a central role in the development of CV complication. The global longitudinal strain (GLS) is able to identify early alterations in the subendocardial longitudinal fibres, highlighting left ventricular systolic dysfunction long before the alteration of ejection fraction (EF). The aim of the present study was to evaluate the correlation between oxidative stress and subclinical myocardial damage, assessed with speckle tracking echocardiography, in normal glucose tolerant patients with 1-hour plasma glucose values ≥ 155 mg/dl (NGT ≥ 155), comparing them to NGT < 155 , impaired glucose tolerance (IGT) and type 2 diabetes mellitus (T2DM) newly diagnosed patients.

Methods. We enrolled 100 Caucasian patients. All subjects underwent OGTT. The serum values of the markers of oxidative stress (8-isoprostan and Nox-2) were assessed with ELISA test. Echocardiographic recordings were performed using an E-95 Pro ultrasound system.

Results. We observed significant differences, among the four groups, for fasting plasma glucose ($p < 0.0001$), 1-h post load ($p < 0.0001$), and 2-h post load plasma glucose levels ($p < 0.0001$), fasting insulin ($p < 0.0001$), 1-h insulin ($p = 0.029$) and 2-h insulin values ($p < 0.0001$) during OGTT. As compared with NGT < 155 , NGT ≥ 155 exhibited significantly higher 1-h ($p < 0.0001$), 2-h post load plasma glucose levels ($p = 0.045$). No significant differences were observed between NGT ≥ 155 and IGT patients. A significant increase of 8-isoprostan ($p < 0.0001$) and Nox-2 ($p < 0.0001$) was observed from the first to fourth group, indicating an increase in oxidative stress with the worsening of the metabolic status. Serum levels of 8-isoprostan and Nox-2 were significantly increased in NGT ≥ 155 compared to NGT < 155 group, but similar to IGT. The Global Longitudinal Strain (GLS), appeared progressively lower proceeding from NGT < 155 group to T2DM group ($p < 0.0001$). For similar values of ejection fraction (EF), NGT ≥ 155 presented reduced GLS compared to NGT < 155 ($p = 0.001$), but similar to IGT patients.

Conclusions. Our study demonstrated that NGT ≥ 155 subjects present functional alterations of myocardial contractile fibers, and these alterations are correlated with increased oxidative stress.

A SUBGROUP ANALYSIS OF THE ODYSSEY APPRISE STUDY: SAFETY AND EFFICACY OF ALIROCUMAB IN THE ITALIAN COHORT

A.B. Cefalu¹, R. Garbellotto², G. Mombelli³, M. Pirro⁴, P. Rubba⁵, M. Arca⁶, C. Borghi⁷, A. Guerrasio⁸, R. Nuti⁹, K. Massaroni¹⁰, G. Tirone¹⁰, M. Averna¹

¹Department of Health Promotion Sciences, Maternal and Infant Care, Internal Medicine and Medical Specialties, University of Palermo; ²Unit of General Medicine, Presidio Ospedaliero di Vittorio Veneto; ³Centro Dislipidemie, ASST Grande Ospedale Metropolitano Niguarda, Milan; ⁴Unit of Internal Medicine, Angiology and Arteriosclerosis Diseases Department of Medicine and Surgery University of Perugia; ⁵Dipartimento di Medicina Clinica e Chirurgia, Università "Federico II" di Napoli;

⁶Department of Translational and Precision Medicine "Sapienza" University of Rome; ⁷Medical and Surgical Sciences Dept., Alma Mater Studiorum University of Bologna; ⁸Department of Clinical and Biological Sciences, University of Turin, Regione Gonzole 10, Orbassano; ⁹Department of Medicine, Surgery and Neuroscience, Policlinico Le Scotte, University of Siena; ¹⁰Sanofi, Milano
E-mail: abaldassare.cefalu@unipa.it

Background and Aims. ODYSSEY APPRISE trial evaluated efficacy and safety of alirocumab in 994 patients with hypercholesterolemia and high CV risk in a real-life setting. The aim of the present report is to detail on the Italian cohort enrolled and treated in the trial.

Methods and Results. The methodology of the of the multinational, single-arm, Phase 3b open-label ODYSSEY APPRISE (Clinicaltrials.gov: NCT00730236) has been previously reported. 255 Italian patients were enrolled and treated according to the trial protocol. Overall mean exposure to alirocumab was 83.3 \pm 27.7 weeks. At week 12, LDL-C decreased by 51.3 \pm 23.1% and this reduction was overall maintained for the duration of the study. A similar reduction was observed in patients with and without heterozygous familial hypercholesterolemia (HeFH 50.7% \pm 23.9 vs. non-FH, 53.6% \pm 19.6). LDL-C was reduced below 1.8 mmol/L and/or by $\geq 50\%$ reduction from baseline in 62% of patients overall (61 % in HeFH and 67 % in non-FH). Alirocumab was similarly well tolerated in the Italian cohort as in the entire study population and the more common treatment emergent adverse events (TEAEs) were influenza, myalgia and nasopharyngitis. The incidence LDL-C levels < 25 mg/dl and < 15 mg/dl, was 8.2% and 2.9% respectively.

Conclusion. The efficacy and safety of alirocumab in a real-life setting, in the Italian subgroup of patients are consistent with findings in the entire study population and confirm that alirocumab is a beneficial approach to further reduce LDL-C levels in patients at high CV risk on maximally tolerated conventional lipid lowering treatment.

LOMITAPIDE REDUCES TRIGLYCERIDE (TG) LEVELS IN FAMILIAL CHYLOMICRONEMIA SYNDROME (FCS)

A.B. Cefalu¹, L. D'Erasmo², A. Giannanco¹, A. Montali², G. Iannuzzo³, A. Zambon⁴, F. Forte⁵, D. Noto¹, P. Supressa⁵, C.M. Barbagallo¹, S. Giannini⁶, M. Arca², M. Averna¹

¹University of Palermo; ²"Sapienza" University of Rome;

³Federico II" University of Naples; ⁴University of Padua;

⁵University of Bari; ⁶Careggi Hospital, Florence

E-mail: abaldassare.cefalu@unipa.it

Background. FCS is a rare autosomal recessive disorder caused by impaired lipoprotein lipase (LPL) function, resulting in elevated TG levels, intense abdominal pain, hepatosplenomegaly and recurrent episodes of acute pancreatitis. Treatment requires a strict, extremely low-fat diet (<10% fat/day) to control TG levels <750-1000 mg/dL, which does not fully control the disease. Lomitapide is a microsomal triglyceride transfer protein (MTP) inhibitor that prevents assembly of triglycerides (TGs) into chylomicrons, in addition to very low-density lipoproteins and thereby reduces circulating levels of TGs.

Methods. This open-label, single arm 'LOCHNES' study of lomitapide in FCS, enrolled adult patients ≥18 years with genetically confirmed FCS, elevated fasting TG≥750 mg/dL and a history of pancreatitis, across 3 Italian centres. Patients were administered escalating-doses of lomitapide to maximum tolerated dose (MTD) for 26 weeks. The primary endpoint was the percent change in TGs from baseline to Week 26, with lomitapide in combination with other lipid lowering therapy

Results. Eighteen patients were enrolled in the study (mean ±SD: age 46.6±16.7y; body mass index 23.7±4.1 kg/m²). Median baseline TG levels were 1804 mg/dL (range 810-4151 mg/dL). Lomitapide dose increased from standard starting dose 5 mg/day at baseline to mean 32.8±17.8 mg/day at Week 26. Median TGs reduced to 305 mg/dL (range 70-1818 mg/dL) at Week 26. This equates to a 70.5% reduction in median fasting triglyceride levels. At Week 26, 14 patients achieved TG levels <1000 mg/dL and 13 of these achieved TGs ≤750 mg/dL. Treatment with lomitapide was generally well tolerated with no patient discontinuations. Adverse events were mild to moderate and were mainly related to gastrointestinal tolerability (n=9) and ALT/AST enzyme elevations ≥3x upper limit of normal (n=4). Where available (n=13), liver MRI imaging revealed increases in hepatic fat in some patients (n=5/13), and three patients with a baseline hepatic fat >20% (range 22-30%), experienced increases to 30-50% hepatic fat at 26 weeks. No patient experienced an episode of acute pancreatitis or severe abdominal pain during lomitapide treatment. One patient who temporarily interrupted lomitapide treatment due to an episode of diarrhoea, experienced acute pancreatitis during the treatment interruption period.

Conclusions. Lomitapide is effective in reducing triglycerides in FCS and preventing the recurrence of acute pancreatitis in this pilot study. The extent of the benefit of lomitapide to patients with FCS should be further evaluated in a larger prospective clinical trial.

EFFECT OF HDL/APOA-I DEFICIENCY ON CORONARY ATHEROSCLEROSIS, EXTRAVASCULAR LIPID DEPOSITION AND IMMUNE-INFLAMMATORY PROFILE

A. Colombo¹, M. Busnelli¹, S. Manzini¹, E. Franchi¹, F. Arnaboldi², E. Donetti², E. Scanziani³, G.D. Norata⁴, G. Chiesa¹

¹Department of Pharmacological and Biomolecular Sciences,

²Università degli Studi di Milano; ³Department of Biomedical

Sciences for Health, Università degli Studi di Milano; ³Department

of Veterinary Medicine, Università degli Studi di Milano

E-mail: alice.colombo@unimi.it

Aim. HDL and its main protein component, apolipoprotein A-I, exert a pivotal role in regulating cell cholesterol homeostasis and in modulating inflammatory response and immune cell activation. This study was aimed at investigating the impact of genetic manipulation of HDL/apoA-I levels on lipid deposition in heart vessels and extravascular tissues in relation to local and systemic immune-inflammatory activation.

Methods. ApoE deficient (EKO) mice, apoE/apoA-I double deficient (DKO) mice, DKO mice overexpressing human apoA-I (DKO/hA-I) and C57BL/6 control mice were fed chow diet until 30 weeks of age. Plasma lipids were quantified, atherosclerosis development at the aortic sinus and in coronary arteries was measured, skin ultrastructure was evaluated by electron microscopy. Blood and lymphoid organs were characterized through histological, immunocytofluorimetric and whole transcriptome analyses.

Results. DKO mice were characterized by an almost complete lack of plasma HDL-cholesterol and by total cholesterol levels comparable to those of control mice. Only DKO mice showed severe alterations of skin morphology and skin-draining lymph nodes, whose transcriptome analysis revealed increased activation of the immune system and an unbalanced expression of genes involved in energy metabolism. An increased presence of CD4+ T effector memory cells was detected in blood, spleen and in the skin-draining lymph nodes of DKO mice. A worsening of atherosclerosis at the aortic sinus and coronary arteries was also observed in DKO mice vs EKO mice. Human apoA-I overexpression in the DKO background was able to rescue the skin phenotype and to halt atherosclerosis development.

Conclusions. HDL deficiency, in the absence of hyperlipidemia, is associated with severe alterations of skin morphology, coronary atherosclerosis, local and systemic inflammation.

GUT MICROBIOTA AND ATHEROSCLEROSIS: WHAT PERSPECTIVES FOR THE GENERAL PRACTITIONER?

M. Zagami¹, E. Sartori¹, M.M. Coronelli²

¹Studio Medico di Medicina Generale di Bereguardo (PV);

²Università degli Studi di Pavia

E-mail: mauriziomaria.coronelli@unipv.it

Intestinal dysbiosis is known to cause the systemic release of inflammatory mediators. Inflammation is one of the main causes of the atherosclerotic process. From the literature and new clinical evidence, there appears to be a correlation between dysbiosis and atherosclerosis. Our study aims to investigate this correlation in order to understand if, indeed, it is possible for the general practitioner to have an additional tool for the primary prevention of cardiovascular diseases. For our study, we took a fecal sample from 45 patients already undergoing treatment for atherosclerosis and who had at least one comorbidity (diabetes or hypertension). The collected samples were then subjected to metagenomic analysis. Each patient underwent an echo TSA in order to investigate the presence of intimal plaques or thickenings at the carotid level; a search was conducted for the possible presence of hepatic steatosis and the blood values of TMAO and Zonulin were analyzed, as well as numerous other clinical and biochemical parameters that would allow an adequate assessment of the dyslipidemic state. Finally, each patient was subjected to a questionnaire relating to their eating habits, in order to be able to correlate this information with the composition of their intestinal microbiota. We also analyzed similar data relating to patients with, until that moment, subclinical atherosclerosis and no comorbidities that had already been collected in the context of the PLIC study. Our study leads the way for considering the presence of dysbiosis as an additional risk factor for atherosclerosis. For the treatment of patients suffering from atherosclerosis, it follows having to aim at a correction of the diet not only with a view to containing the dyslipidemic state, but also to correct the dysbiosis.

PCSK9, CARDIAC METABOLISM AND HFpEF

L. Da Dalt¹, L. Castiglioni², A. Baragetti³, M. Audano¹, M. Svecla¹, F. Bonacina⁴, S. Pedretti¹, P. Ubaldi¹, P. Benzonii⁴, F. Giannetti⁴, A. Barbuti⁴, F. Pellegatta⁵, S. Indino⁶, E. Donetti⁶, L. Sironi², N. Mitro¹, A.L. Catapano³, G.D. Norata⁷

¹Department of Pharmacological and Biomolecular Sciences, Università degli Studi di Milano; ²Department of Pharmaceutical Sciences, Università degli Studi di Milano; ³Department of Pharmacological and Biomolecular Sciences, Università degli Studi di Milano, IRCCS Multimedica Hospital, Sesto San Giovanni, Milan; ⁴Department of Biosciences, Università degli Studi di Milano; ⁵Centro SISA per lo studio dell'Aterosclerosi, Ospedale Bassini, Cinisello Balsamo (MI); ⁶Department of Biomedical Science for Health, Università degli Studi di Milano;

⁷Department of Pharmacological and Biomolecular Sciences, Università degli Studi di Milano, Centro SISA per lo studio dell'Aterosclerosi, Ospedale Bassini, Cinisello Balsamo (MI)
E-mail: lorenzo.dadalt@unimi.it

Introduction. PCSK9 is a glycoprotein released into the circulation mainly by the liver which, interacting with homologous and non-homologous LDLR receptors, including CD36, can regulate their functionality, thus favoring lysosomal degradation. PCSK9 deficiency induces an increase in the uptake of lipoproteins, promoting the removal of circulating lipids and their accumulation in different tissues.

Aim. Given the impact of PCSK9 inhibitors on lipoprotein metabolism, the present work is aimed to evaluate its role in cardiac functionality and metabolism.

Methods and Results. Mouse models WT, Pcsk9 KO, liver selective KO and Pcsk9/Ldlr double KO (DKO) were fed an SFD diet for 20 weeks. Exercise intolerance, muscle strength and cardiac structure were evaluated. Pcsk9 KO displays a reduced running endurance associated with echocardiographic alteration suggestive of heart failure with preserved ejection fraction (HFpEF). The lack of PCSK9 has therefore shown an impact on cardiac metabolism reflected by reduced mitochondrial oxygen consumption and ATP production. A similar phenotype was observed in the Pcsk9/Ldlr DKO models, thus excluding a contribution for LDLR on heart damage observed in Pcsk9 KO mice. The cardiac function profile in the liver selective PCSK9 KO model further ruled out the involvement of circulating PCSK9 in the development of HFpEF, indicating a possible role for locally expressed PCSK9. In vitro study on freshly isolated cardiomyocytes from mice model confirm that CD36, in PCSK9 deficiency states and, in the presence of VLDL, is upregulated and associated with neutral lipid accumulation and mitochondrial mass depletion. In line with what has been demonstrated, carriers of the R46L variant with loss of function for PCSK9 have an increase in left ventricular mass, but a similar ejection fraction compared to control subjects.

Conclusions. PCSK9 deficiency, modulating other receptors than the LDLR, can influence cardiac lipid metabolism, can favor the mitochondrial damage and the development of HFpEF.

TREATMENT OF HIGH- AND VERY HIGH-RISK PATIENTS FOR THE PREVENTION OF CARDIOVASCULAR EVENTS IN EUROPE: BASELINE ITALIAN DATA FROM THE MULTINATIONAL, OBSERVATIONAL SANTORINI STUDY

M. Arca¹, F. Romeo², A. Fischetti², I. Haq³, A. Bilitou³, K.K. Ray⁴, A.L. Catapano⁵

¹Department of Translational and Precision Medicine, Sapienza University of Rome; ²Daiichi Sankyo Italia, Rome;

³Daiichi Dantky Europe, Munich, Germany; ⁴Imperial Centre for Cardiovascular Disease Prevention, Department of Primary Care and Public Health, Imperial College London, London, UK;

⁵Department of Pharmacological and Biomolecular Sciences, University of Milan and Multimedica IRCCS, Milan

E-mail: letizia.dasacco@daiichi-sankyo.it

Background. The ESC/EAS 2019 guidelines recommend lower goals for LDL-C, especially in patients with high (<70 mg/dl) and very high CV risk (<55 mg/dl). As a consequence more intensive lipid-lowering therapies (LLTs) will be requested. Real-world studies in Europe have demonstrated suboptimal achievement of ESC/EAS 2016 guideline LDL-C goals, but to what extent practice has changed since the last ESC/EAS guideline is uncertain. The SANTORINI study (NCT04271280) was designed to assess in Europe the implementation of the new ESC/EAS 2019 guidelines in the management of dyslipidaemia in high- and very high-risk patients followed in a real-world setting.

Methods. The SANTORINI is a multinational, prospective, observational, non-interventional study enrolling patients aged ≥ 18 years at high and very high CV risk (as assigned by the investigators) requiring LLTs from 14 European countries across primary and secondary care settings. Patients' characteristics, medical history, major risk factors, current LLT as well as major lipid parameters (total, LDL-C, HDL-C and total triglycerides) were collected at baseline and again at follow-up, approximately 12 months after baseline data collection. Here, we reported baseline data of the Italian cohort enrolled into the SANTORINI study.

Results. From March 2020 to February 2021 in Italy were enrolled 1977 patients. The vast majority of them (77.4%) were classified at very high risk and the ESC/EAS guidelines were the most commonly used reference for risk classification. At baseline, 30.1% of patients were receiving LLT monotherapy, while the combination therapy was limited to 15.9% of patients; 32.6% of patients were not receiving any LLTs. The recorded mean baseline LDL values were 95.5 mg/dl in very high risk and 112.3 mg/dl in high risk patients. **Conclusions.** This large registry in patients at high and very high CV risk suggests that, in Italy, more potent LLTs (e.g. combination therapies) are largely underused in high and very-high risk patients and that in these patients LDL-C levels remain substantially higher than those recommended by the ESC/EAS guidelines.

INSIGHTS INTO INDIVIDUAL SUSCEPTIBILITY TO SARS-CoV-2 INFECTION AND DISEASE SEVERITY: THE POTENTIAL ROLE OF DIFFERENT HOST GENETIC PROFILES IDENTIFIED BY NEXT GENERATION SEQUENCING

R. De Cario, E. Sticchi, A. Kura, S. Suraci, T. Capezzuoli, M. Giannini, A. Bertelli, A.A. Rogolino, A.M. Gori, R. Marcucci, B. Giusti

Department of Experimental and Clinical Medicine, University of Florence; Atherothrombotic Diseases Center, A.O.U. Careggi, Florence

E-mail: decariorosy@hotmail.it

Background. First reported in the Wuhan Chinese region in December 2019, CoronaVirus Disease 2019 (COVID-19), a new form of severe acute respiratory syndrome (SARS) caused by a novel strain of coronavirus (SARS coronavirus 2 [SARS CoV 2]), was declared as a pandemic in 2020 leading to ~4 million deaths all over the world to date. Clinical manifestations range from asymptomatic forms to respiratory failure and death. The infection is also associated with a high incidence of thrombotic complications. Alongside age, comorbidities and gender, host genetic factors have been suggested to play a role in the severity of the disease outcomes, their identification potentially representing a useful prognostic tool. In this study, genetic characterization of 33 Covid-19 patients referred to the Advanced Molecular Genetics Laboratory, Atherothrombotic Diseases Center, Careggi Hospital-University of Florence, was made by Next Generation Sequencing (NGS) in order to identify genetic profiles potentially representing prognostic factors modulating the susceptibility to virus and thrombotic risk.

Methods. NGS was performed by Illumina MiSeq and Haloplex protocol targeting 7 virus entry-related genes (ACE2, TMPRSS2, CTSL, CTSB, HSPA5, IL6, FURIN) and 11 genes influencing the thrombotic phenotypic profile (PROC, PROS1, FGA, FGB, FGG, SERPINC1, F2, F5, F10, PLAT, PLG).

Results. Thirty-seven heterozygous rare variants [Minor Allele Frequency (MAF) <0.01 in the gnomAD European database] were identified among 25 patients involving 7/7 virus entry-related genes (14/40 variants) and 9/11 genes influencing the thrombotic phenotypic profile (23/40 variants). Loss-of-function mutations leading to a diminished activity of those molecular components involved in the virus attachment/entry to the host cells (i.e. ACE2), may be interpreted as protective factors while gain-of-function variants, positively modulating the expression of those genes, may increase susceptibility to infection (i.e. TMPRSS2). Moreover, previously described or new variants involving those genes implicated in the coagulation cascade, may determine a different clinical course (i.e. F10, F5) and response to therapy (i.e. SERPINC1) especially in those patients developing thrombotic complications which require long-term hospitalization and treatment in intensive care.

Conclusions. Our data suggest how individual genetic profiles may participate in modulating the susceptibility to SARS-CoV-2 infection and the wide range of clinical manifestations associated with the disease. Additional studies on the role of single genetic variant together with the evaluation of the potential contribution of common variants may enable the definition of an allelic risk score allowing the identification of subjects at a greater risk of developing severe complications.

TRANSENDOTHELIAL TRANSPORT OF HIGH-DENSITY LIPOPROTEIN: ROLE OF SPHINGOSINE 1-PHOSPHATE AND ITS RECEPTORS

M. Dessenai¹, F. Poti¹, R. Feuerborn², J.-R. Nofer², B. Hesse³, A. Lukasz³, M. Simoni⁴, A. von Eckardstein⁵

¹Department of Medicine and Surgery-Unit of Neurosciences, University of Parma, Parma; ²Central Laboratory Facility, University Hospital of Münster, Germany; ³Department of Medicine D, Division of General Internal Medicine, Nephrology, and Rheumatology, University Hospital Münster, Münster, Germany; ⁴Unit of Endocrinology, Department of Biomedical, Metabolic and Neural Sciences, University of Modena and Reggio Emilia, Modena; ⁵Institute of Clinical Chemistry, University of Zurich and University Hospital of Zurich, Switzerland
E-mail: mattia.dessenai@unipr.it

Background and Goals. Sphingosine 1-phosphate (S1P) is a bioactive lysosphingolipid carried by HDL. In these lipoproteins, S1P is mainly bound to apolipoprotein M (apoM) and this complex effectively activates the five S1P receptors (S1P1-5). The scavenger receptor class B type 1 (SR-BI) facilitates the interaction between HDL-S1P and its receptors on the cell membrane. It has been shown that stimulation of S1P1 is fundamental for vascular homeostasis, promoting the development and maintenance of the endothelial barrier. However, it is not known whether S1P can regulate transendothelial transport of HDL and the possible mechanisms involved in this process remain unknown. We developed a peculiar animal model overexpressing S1P1 specifically in endothelial cells (S1P1-iECKI mice), contributing to clarify the transport of HDL between the different compartments when S1P/S1P1 axis signaling is amplified.

Materials and Methods. Fluorescently labelled HDL or Evans Blue (albumin tracer) were administered to S1P1-iECKI and control mice by intravenous injection (tail vein). Subsequently, the mice were sacrificed and peritoneal lavage was performed. The presence of fluorescent particles or Evans Blue was assessed by fluorimetric-spectrophotometric techniques. In parallel, S1P1 over-expressing animals and related controls were sacrificed and their aortas isolated and processed for immunofluorescence imaging through confocal laser scanning microscopy.

Results. Compared to control mice, S1P1-iECKI mice showed an increased transport of HDL and a decreased transport of Evans Blue from the blood to the peritoneal cavity. The analysis of the aortic endothelium through confocal microscopy confirmed the overexpression of the S1P1 receptor, and most importantly demonstrated an increased expression of SR-BI in the endothelial cells of S1P1-iECKI mice, compared to controls.

Conclusions. The stimulation of S1P/S1P1 axis promotes transendothelial transport of HDL. The opposite effect on transendothelial transport of albumin suggests that HDL can cross the endothelial barriers mainly through specific mechanisms rather than through passive filtration.

THE SELECTIVE ACTIVATION OF FORMYL PEPTIDE RECEPTOR 2 PREVENTS THE INFLAMMATORY AND PRO-CALCIFIC DIFFERENTIATION OF INTERSTITIAL AORTIC VALVE CELLS

M. Donato, C. Bolego, E. Faggin, A. Bressan, F. Cinetto, C. Felice, C. Agostini, M. Rattazzi
Università degli Studi di Padova
E-mail: maristella.donato@studenti.unipd.it

Background. Calcific aortic valve disease (CAVD) is the most common valvulopathy in the general population; however, no effective pharmacological therapy has proven to halt or delay its progression. **Aim:** We aimed to investigate the effects of the activation of Formyl Peptide Receptor 2 (FPR2), a known receptor for lipoxins, resolvins and anti-inflammatory molecules, on the pro-calcific and inflammatory differentiation of interstitial aortic valve cells (VICs).

Methods. A clone of primary VICs seeded on culture plates or type I collagen scaffolds was treated with lipopolysaccharide (LPS, 500 ng/mL) for 12 days to acquire a pro-calcific profile, with or without the concomitant supplementation of two synthetic FPR2 agonists (MMK1, 50 µM and Ac2-26, 3.2 µM). At the end of the treatment, proteins and RNA were extracted for western blotting and gene expression analysis (RT-PCR). Alkaline phosphatase (ALP) activity and calcium deposition in collagen scaffolds were determined through colorimetric assays. The expression of FPR2 on human pathological and healthy aortic valves was investigated through immunohistochemistry and gene expression analysis.

Results. The gene expression analysis on human valves showed an increase in ALP, IL-6 and FPR2 levels in pathological valves compared to healthy tissue. Concurrently, the in vitro exposure of VICs to LPS increased the expression of inflammatory cytokines (such as IL-1beta, IL-6, TNF-alpha), ALP, BMP2 and FPR2. Moreover, it induced the deposition of calcium on collagen scaffolds. The treatment of cultured VICs with two selective FPR2 agonists (MMK1 and Ac2-26) reduced the overexpression of ALP ($p<0.05$), BMP2 ($p<0.05$) and inflammatory cytokines (such as IL6, $p<0.05$) induced by LPS. The same treatments were effective in reducing the deposition of calcium in collagen scaffolds ($p<0.05$).

Conclusions. The receptor FPR2 is overexpressed under pathological conditions and its selective activation is associated with reduced pro-calcific and inflammatory differentiation of VICs. These promising data offer new insights for a novel therapeutic strategy for CAVD.

NOVEL PATHOGENIC VARIANTS OF THE LDLR GENE IDENTIFIED IN PUTATIVE FH SUBJECTS

E. Bonelli¹, C. Trenti¹, E.A. Negri¹, R. Gnoni¹, S. Bertolini², S. Calandra³, T. Fasano¹

¹AUSL-IRCCS di Reggio Emilia; ²University of Genova;

³University of Modena and Reggio Emilia

E-mail: tommaso.fasano@ausl.re.it

Introduction. Familial hypercholesterolemia (FH) is a common inherited disorder of low-density lipoprotein (LDL) catabolism causing elevated LDL-cholesterol (LDL-C) and premature atherosclerotic cardiovascular disease. FH is typically caused by deleterious variants of LDLR, APOB or PCSK9 genes. Recent data showed a heterozygous FH prevalence of 1:300 in the general population. Despite effective treatments, FH remains underdiagnosed and undertreated. Aim of this study was the genetic characterization of suspected FH patients referred to the Lipid Clinic and the cascade screening of their relatives.

Methods. From 2014 to 2019 we collected 186 subjects with suspected FH (122 index cases and 64 relatives, aged ³¹8 years) who were clinically examined at the Lipid Clinic and tested by Next Generation Sequencing for genes associated with FH (LDLR, APOB, PCSK9, APOE, LDLRAP1, ABCG5, ABCG8, LIPA, CYP27A1, MYLIP).

Results. Overall, 107 subjects (54 index patients/53 relatives) resulted to be heterozygous carriers of pathogenic variants of LDLR (103, 96.3%), APOB (3, 2.8%), or PCSK9 (1, 0.9%) genes. Five (likely)pathogenic variants of LDLR were not reported previously. Three of these, respectively due to nucleotides deletion, deletion/insertion and duplication, caused frameshift with the occurrence of a premature termination codon (Gln33Profs*17, Cys243Trpfs*12, Val365Argfs*20). The other two were missense variants (Pro608His, Ala684Asp), involving highly conserved amino acids, which were found to be deleterious by "in silico" analysis (REVEL score 0.962 and 0.817, respectively).

Conclusion. Clinical and genetic identification of FH patients represents a challenging task in clinical practice. From a genetic point of view, a major challenge is the demonstration of pathogenicity of a newly identified variant. In the present study we report 5 novel LDLR variants. Three of them can be regarded as deleterious due to the formation of a truncated protein. Clinical phenotypes and "in silico" analysis suggested that the two novel missense mutations can also be considered pathogenic.

NON-INVASIVE INSTRUMENTAL EVALUATION OF COENZYME Q10 PHYTOSOME ON ENDOTHELIAL REACTIVITY IN HEALTHY NON-SMOKING YOUNG VOLUNTEERS: A DOUBLE-BLIND, RANDOMIZED, PLACEBO-CONTROLLED CROSS-OVER CLINICAL TRIAL

F. Fogacci, A. Di Micoli, M. Veronesi, C. Borghi, A.F.G. Cicero

University of Bologna

E-mail: federicafogacci@gmail.com

Coenzyme Q10 (CoQ10) is a natural antioxidant compound that prevents the vascular damage induced by free radicals and the activation of inflammatory signaling pathways. Supplementation with CoQ10 is safe though its bioavailability is generally low, as far as variable depending on the pharmaceutical form of preparation. Recently, the development of phytosome technology has improved the bioavailability of CoQ10 and definitely facilitated its effective use in clinical. The present double-blind, randomized, placebo-controlled, cross-over clinical study aimed to investigate the effect on endothelial reactivity and total antioxidant capacity (TAC) of either acute and chronic supplementation with CoQ10 phytosome in a sample of 20 healthy young not smoking subjects. The immediate acute effect of dietary supplementation with CoQ10 phytosome on pulse volume (PV) was sustained in the actively treated group in comparison with placebo and the baseline ($p<0.05$). Chronic supplementation of the tested pharmaceutical formulation of CoQ10 significantly improved mean arterial pressure and TAC compared to placebo and baseline values ($p<0.05$ for both comparisons). In the actively treated group, the effect on dietary supplementation with CoQ10 phytosome on PV was also sustained when compared to the baseline ($P<0.05$).

RUPATADINE TREATMENT IS ASSOCIATED TO ATHEROSCLEROSIS WORSENING AND ALTERED T LYMPHOCYTES RECRUITMENT IN APO-E DEFICIENT MICE

E. Franchi¹, M. Busnelli¹, S. Manzini¹, A. Colombo¹, F. Bonacina¹, G.D. Norata¹, S. Castiglion¹, C. Andronis², E. Lekka², E. Scanziani³, G. Chiesa¹

¹Department of Pharmacological and Biomolecular Sciences, Università degli Studi di Milano; ²Biovista, Athens, Greece;

³Mouse and Animal Pathology Laboratory (MAPLab), Fondazione UniMi, Milano
E-mail: elsa.franchi@unimi.it

Background and Aims. Rupatadine is a second-generation anti-histamine and a PAF antagonist, currently employed for the treatment of allergies. It displays anti-inflammatory properties through the inhibition of macrophages and granulocytes recruitment. The anti-inflammatory and antiplatelet effects showed by rupatadine could be exploited against atherosclerosis development.

Methods. Apolipoprotein E-deficient female mice (n=15 per group) were fed Western-type diet, with (Rupatadine) or without (Control) 0.017% w/w rupatadine for 12 weeks.

Results. Weight gain, food and water intake and organ weights were similar in both groups. Also, plasma cholesterol and triglyceride levels were comparable. Atherosclerotic plaque extent in the aorta was comparable between groups. Unexpectedly, rupatadine treatment worsened plaque development in the aortic sinus, without altering necrotic core area, extracellular matrix and neutral lipids deposits and the presence of macrophages. The treatment increased the levels of T lymphocytes intraplaque (+70%) and around the aortic sinus (+80%). Rupatadine effects on T cells were also evaluated with in vitro tests, which showed that rupatadine did not affect cell proliferation, but promoted the polarization of CD4+ towards Th1 and Th2 subsets. No difference in inflammatory infiltrates was detected in liver, lung, kidney, lymph node and spleen.

Conclusion. In conclusion, rupatadine treatment in EKO mice fed Western diet resulted in a moderate worsening of atherosclerosis development and an altered T lymphocyte activation.

IMPACT OF THE COVID-19 PANDEMIC ON THE MANAGEMENT OF PATIENTS WITH CHRONIC CARDIOVASCULAR THERAPIES IN LOMBARDY

F. Galimberti¹, E. Olmastroni², A.L. Catapano³, E. Tragni², M. Casula³

¹IRCCS MultiMedica, Via Milanese 300, 20099, Sesto S. Giovanni (MI); ²Servizio di Epidemiologia e Farmacologia Preventiva (SEFAP), Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari (DiSFeB), Università degli Studi di Milano;

³IRCCS MultiMedica, Sesto S. Giovanni (MI), Servizio di Epidemiologia e Farmacologia Preventiva (SEFAP), Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari (DiSFeB), Università degli Studi di Milano
E-mail: federica.galimberti@multimedica.it

The COVID-19 pandemic has posed major challenges to healthcare systems and public policies. We aimed to investigate its impact on the management of chronic cardiovascular therapies (lipid-lowering, antihypertensive, antidiabetic, and anticoagulant drugs) using administrative databases of Lombardy Region. The study period between January and June 2020 was compared with the control period January-June 2019. For all adult patients (≥ 40 years) with at least one prescription of the selected drugs, the percentage change in drug consumption, adherence to therapy (calculated as proportion of subjects with PDC=100%), and access to healthcare services (blood tests, diagnostic investigations, or specialist visits for disease monitoring) was evaluated. A total of 911,566 patients on lipid-lowering therapy (mean age: 70.9 years; males: 52.2%), 2,147,386 on antihypertensives (mean age: 70.1 years; males: 47.7%), 392,678 on antidiabetics (mean age: 70.7 years; males: 56.4%), and 621,976 on anticoagulants (mean age: 78.8 years; males: 51.1%) were enrolled and compared with 879,881, 2,128,334, 381,752, and 601,204 controls, respectively. Overall, there was a small change in the number of dispensed packages (lipid-lowering drugs: +3.8%; antihypertensives: -1.8%; antidiabetics: -5.9%; anticoagulants: -5.2%); however, in all the cohorts, a slight increase was observed in the first two bimesters, with a sharp decrease in May-June (lipid-lowering drugs: -6.7%; antihypertensives: -11.4%; antidiabetics: -21.3%; anticoagulants: -22.6%). Likewise, adherence to treatments showed an increase in March-April, and a reduction during the following two months. Conversely, there was a dramatic drop in healthcare services utilization in each patient cohort (lipid-lowering drugs: -23.2%; antihypertensives: -29.6%; antidiabetics: -25.6%; anticoagulants: -20.4%), with a negative spike in March/April (lipid-lowering drugs: -65.2%; antihypertensives: -66.0%; antidiabetics: -63.5%; anticoagulants: -53.9%). The COVID-19 pandemic has negatively affected the access to healthcare services by patients with chronic cardiovascular diseases. We observed a tendency to accumulate medicines at the beginning of the lock-down, and a decreased use of health services for disease monitoring compared to the control period.

MANAGEMENT OF A PATIENT WITH DELAYED DIAGNOSIS OF HOMOZYGOUS FAMILIAL HYPERCHOLESTEROLEMIA

A. Giannanco¹, R. Scicali², C. Scrimali¹, A. Di Pino², F. Brucato¹, R. Spina¹, S. Piro², D. Noto¹, A.B. Cefalù¹, F. Purrello², M. Averna¹

¹Dipartimento di Promozione della Salute, Materno-Infantile, di Medicina Interna e Specialistica di Eccellenza "G. D'Alessandro" (PROMISE), Università degli Studi di Palermo; ²Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Università degli Studi di Catania

E-mail: agiamman@gmail.com

Background. Homozygous familial hypercholesterolemia (HoFH) is a rare, life-threatening genetic disorder characterized by extremely high low-density lipoprotein-cholesterol (LDL-C) levels and severe and accelerated atherosclerotic cardiovascular disease (ASCVD). We describe the clinical management and molecular characterization of a subject with severe hypercholesterolemia. **Methods** The proband is a 50-year-old man with family history of early cardiovascular disease and hypercholesterolemia (both parents and his two children). Severe hypercholesterolemia (LDL-C: 450 mg/dL) was first documented when he was 32 and treatment with statin was begun. When he was 47, over a routine cardiologic workup, a coronary angiography revealed diffuse stenotic coronary disease and he underwent to BACG procedure. The LDL-C levels were 230 mg/dL while treated with high-intensity statin at the maximum tolerated dose in combination with ezetimibe. Genetic analysis of FH candidate genes was carried out by NGS. Additional hypolipidemic therapeutic options were considered for the management of this patients.

Results. The genetic analysis revealed that the patient was compound heterozygous of two already known pathogenic mutations of the LDLR gene classified as receptor-defective (c.1118G>A - p.Gly373Asp - and c.1195G>A - p.Ala399Thr). Cascade screening was performed and four family members were found to be heterozygous carriers. Before the genetic data were available, the patient was treated with Alirocumab 150 mg every other week on top of standard care. Once the genetic diagnosis of HoFH was made, alirocumab was switched to Evolocumab 420 mg once a month. Although an effective reduction of LDL-C levels, the lipid goal was not reached and therefore we decided to potentiate hypolipidemic treatment by adding a low dose of Lomitapide (5 mg/daily) which was well tolerated and very effective (LDL-C: 42 mg/dL).

Conclusions. In this HoFH case, the combination of Evolocumab with low-dose Lomitapide an effective and well-tolerated add-on therapeutic option in HoFH carriers of defective mutations of the LDL-R gene.

EXTRACELLULAR VESICLES ENRICHED IN PCSK9 ARE INDICATIVE OF PRO-ATHEROGENIC PHENOTYPE

M.F. Greco¹, C. Macchi¹, L. Cantone¹, M. Hoxha¹, C. Banfi², F. Zimetti³, M.P. Adorni³, I. Giusti⁴, V. Dolo⁴, A. Corsini¹, C.R. Sirtori¹, N. Ferri⁵, V. Bollati¹, M. Ruscica¹

¹Università degli Studi di Milano; ²Centro Cardiologico Monzino;

³Università degli Studi di Parma; ⁴Università degli studi dell'Aquila; ⁵Università degli Studi di Padova

E-mail: mariafrancesca.greco@unimi.it

Background. Extracellular vesicles (EVs) are a heterogeneous population of particles wrapped by a phospholipid bilayer, secreted into the extracellular space by several cell types, carrying proteins, lipids and nucleic acids. EVs are classified into exosomes, microvesicles and apoptotic bodies. EVs deliver their biologically active molecular cargo to the recipient cells. EVs play a significant role in the process of atherosclerotic cardiovascular diseases (ASCVD) through different mechanisms: by promoting endothelial dysfunction and vascular wall inflammation; by increasing expression of surface adhesion molecules; by favouring smooth muscle cell differentiation and by determining the release of pro-inflammatory cytokines. In the context of the pathophysiology of ASCVD, proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) appears to play a crucial role. PCSK9 is not only a key-player in the regulation of low-density lipoprotein-cholesterol (LDL-C) but it also plays pleiotropic effects on atherosclerosis. PCSK9 is expressed in cultured human endothelial cells, vascular smooth muscles cells (VSMC) and in human atherosclerotic plaques. Furthermore, PCSK9 positively influences VSMC differentiation, migration and proliferation.

Aim. To unveil the impact of EVs derived from human smooth muscle cells overexpressing PCSK9 (hSMC-PCSK9) on the inflammatory milieu, migratory capacity, oxidized LDL (oxLDL) uptake and mitochondrial respiration of human monocytes THP-1 and human derived-THP-1 macrophages.

Methods. EVs are isolated from cell culture media of hSMC over-expressing or not PCSK9 (EVs-PCSK9 and EVs-CTR) by ultracentrifugation and are characterized by high-resolution flow cytometry and Western blot (WB) analyses. Number and size of EVs have been measured by Nanoparticle Tracking Analysis (NTA), morphology and size by transmission electron microscopy (TEM). Proteomic analysis has been carried out by liquid chromatography mass spectrometry. Mitochondrial respiration has been assessed by Seahorse analysis.

Results. EVs-CTR and EVs-PCSK9 express CD9 and CD63 tetraspanins as well as Alix and Beta1-Integrin, all markers of exosomes and microvesicles. No differences in concentration were found between EVs-CTR and EVs-PCSK9, 1.2*10¹⁰ particles/ml and 1.3*10¹⁰ particles/ml, respectively. Similar conclusions were reached in the case of size, namely, 152.3 nm (EVs-CTR) and 160.7 nm (EVs-PCSK9). This evidence was further confirmed by TEM, namely, EVs-CTR and EVs-PCSK9 have the same morphology and size (approximately 100 nm in diameter). Untargeted proteomic analysis has shown that EVs-PCSK9 carry a higher amount of PCSK9. 24-h exposure to EVs-PCSK9 raised gene expression of MCP-1/chemokine (C-C motif) ligand 2 (+27 fold), interleukin (IL)-1 (+28 fold), IL-1beta (+25 fold), IL-6 (+94 fold), and IL-8 (+4 fold) in both monocytes and macrophages. EVs-PCSK9 increased the phosphorylation of STAT3 and decreased that of SOCS3 in both cell lines, whereas no differences were found for NLRP3. EVs-PCSK9 increased oxLDL uptake, compared to their counterpart (EVs-CTR) in derived-THP-1 macrophages and decreased basal and maximal respiration achieved by THP-1. The migratory

capacity of THP-1 monocytes and macrophages was raised upon incubation with EVs-PCSK9.

Conclusions. EVs enriched in PCSK9 appear to be characterized by a pro-atherogenic phenotype, with a raised inflammatory milieu, cell migratory capacity, oxLDL uptake and impairment in mitochondrial respiration.

POST PRANDIAL METABOLISM OF LIPOPROTEINS IN FAMILIAL CHYLOMICRONEMIA PATIENTS TREATED WITH LOMITAPIDE AND TIPARVOVEC

M. Gueli Alletti¹, P. Bigolin², F. Brucato¹, C. Scrimali¹, R. Spina¹, V. Ingrassia¹, G.I. Altieri¹, F. Fayer¹, D. Noto¹, G. Misiano¹, A. Giannanco¹, C.M. Barbagallo¹, A. Ganci¹, A.B. Cefalù¹, A. Zambon², M.R. Averna¹

¹Dipartimento di Promozione della Salute, Materno-Infantile, di Medicina Interna e Specialistica di Eccellenza "G. D'Alessandro" (ProMISE), Università degli Studi di Palermo; ²Dipartimento di Medicina - DIMED Università degli Studi di Padova
E-mail: mariagrazia.guelialletti@gmail.com

Background. Familial chylomicronemia syndrome (FCS) is a rare recessive monogenic disease characterized by triglycerides (TG) levels >10 mmol/L. Although FCS is causally associated with mutations in candidate genes (LPL, LMF1, GPIHBP1, ApoAV and ApoCII), most patients with FCS have mutations in lipoprotein lipase (LPL). Defects in LPL enzyme result in reduced clearance of chylomicrons (CM) from plasma and development of acute pancreatitis. Treatment of FSC patients is based on combined action of a lipid- and carbohydrate-reduced diet in addition to available hypolipidemic therapies (fibrates, statins, omega-3 fatty acids) that often fails to achieve a desired TG levels. Recently several innovative drugs have been developed: tiparvovec (gene therapy), lomitapide (MTP inhibitor), volanesorsen (antisense oligonucleotide that inhibits the formation of apoC-III) and monoclonal antibodies (anti ApoCIII and ANGPTL3).

Material and Methods. Five patients carrying familial chylomicronemia causative mutations of the major candidate genes were collected. Each patient was given a modified oral fat load to avoid a risk of pancreatitis induced by postprandial hyperchylomicronemia but sufficient to assess the change in postprandial chylomicron levels. The meal was supplemented with retinol palmitate (RP) as CM biomarker. We compared TG and RP levels after administration of an oral fat load before and after lomitapide or tiparvovec. The trend in postprandial TG levels was evaluated by taking hourly samples for nine hours and a single sample at 24 hours later.

Risultati e Conclusioni. Here we present preliminary data of four patients treated with lomitapide for twenty-six weeks and the only patient that received tiparvovec in Italy. Area Under Curve of patients on lomitapide therapy were reduced roughly by 87% for TG, 27% for non-HDL-C, while no improvement was observed for tiparvovec. Lomitapide was effective in improving post prandial metabolism of lipoproteins in subjects with FCS. No benefits were observed for tiparvovec.

RISK STUDY: ROLE OF BIOLOGICAL MARKERS AND TRANSCRIPTOMICS PROFILE FROM CEREBRAL THROMBI AND PERIPHERAL VENOUS BLOOD IN PATIENTS WITH ACUTE ISCHEMIC STROKE

A. Kura¹, G. Cassioli¹, A. Sodero², E. Sticchi¹, A. Magi¹, S. Suraci¹, R. De Carlo¹, A. Consoli³, A. Rosi³, S. Nappini³, L. Renieri³, N. Limbucci³, B. Piccardi², F. Arba², C. Sartì², D. Inzitari², S. Mangiafico³, R. Marcucci¹, A.M. Gorì¹, B. Giusti¹

¹Univ. Dept. Exp. Clin. Med. Florence; ²AOUC Careggi, Stroke Unit, Florence; ³AOUC Careggi, Interventional Neuroradiol, Florence
E-mail: ada-kura@hotmail.it

Background. Acute ischemic stroke (AIS) remains a major cause of death and disability worldwide. AIS therapies consist of cerebral blood restoration by i.v. rt-PA thrombolysis and/or mechanical thrombectomy (MT). Few previous studies showed that thrombus composition can correlate with both AIS pathophysiology and outcomes. Moreover, it has been observed the important role of MMP and other inflammatory biomarkers for prediction of unfavorable outcomes in patients undergoing thrombolysis.

Aims of the study were:

- 1) to investigate the global gene expression profile of cerebral thrombi (CT) and venous peripheral blood (PB) in order to identify markers of different pathophysiological mechanisms of AIS and/or determinants of clinical outcomes (haemorrhagic transformation, 24 h edema, modified 3 months Rankin scale-mRS, death);
- 2) to evaluate the role of circulating biomarkers, namely metalloproteinase, interleukins, adhesion molecules and growth factor in relation to clinical outcomes.

Methods. We investigated 110 AIS patients treated with systemic or endovascular t-PA thrombolysis, enrolled between October 2015 and October 2018. Blood samples were collected before and 24 hours after MT in tubes containing liquid for RNA stabilization. A blood withdrawal for assessment of MMPs, cyto/chemokines and myeloperoxidase (MPO) was performed. We evaluated a gene expression profile of 52 AIS patients. The thrombus obtained during MT was collected in RNA later. The global gene expression was assessed by Affymetrix technology using GeneChip Human Transcriptome Array 2.0. Data analysis was performed in R environment with dedicated pipelines. Circulating biomarkers were determined in serum by using a multiplex assay (Bioplex Instruments). For statistical analysis we used SPSS v.25 software

Results. As concerns transcriptomics data, the average of analyzable probe sets numbered 440,085 in CT and 602,874 in PB samples. In the two different type of specimens 20,341 symbols were common, whereas 3 symbols were unique in CT and 562 symbols were unique in PB. The Gene Ontology (GO) enrichment analysis allowed to identify common and peculiar features and biological processes; really in CT we observed 221 significant biological processes associated with poor outcome according to mRS, and in PB, we observed 27 terms associated with 24 h edema. Among significant terms in CT, those associated with regulation of neutrophil mediated immunity and activation play a crucial role. Concerning PB, significant enriched terms associated with regulation and activation of transcriptomes of cells are particularly significant. Biomarkers evaluation showed that:

- 1) pre-tPA EMMPRIN and MMP-2 circulating levels were associated with death;
- 2) pre-tPA VCAM-1 and CXCL-10 circulating levels were associated with worse clinical outcome (mRS>2);

- 3) ICH occurred more frequently in patients with high levels of pre-tPA, IL-6 and CXCL-8;
- 4) the occurrence of edema at 24 hours after thrombolysis was slightly associated with low EMMPRIN and VCAM-1 pre-tPA levels, whereas pre-/post-tPA-variations of MMP-3, VCAM-1 and EMMPRIN were positively and significantly associated with edema at 24 hours.

Conclusions. In conclusion, our results obtained from both transcriptomics profile and biomarkers evaluation in ischaemic stroke patients treated with thrombolysis provided interesting insights into the mechanisms underlying the ischaemic stroke and the response to thrombolysis.

AN INNOVATIVE BERBERINE FORMULATION IS ABLE TO REDUCE PROPROTEIN CONVERTASE SUBTILISIN/ KEXIN TYPE 9 PLASMA LEVELS IN MICE

M.G. Lupo¹, G. Panighel¹, I. Ferrarese¹, E. Brilli², G. Tarantino², S. Dall'Acqua¹, N. Ferri³

¹Department of Pharmaceutical and Pharmacological Sciences, University of Padua; ²PharmaNutra S.p.A., Siena;

³Department of Medicine, University of Padua

E-mail: mariagiovanna.lupo@unipd.it

Background: Increased proprotein subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) plasma levels may hide a subclinical cardiovascular risk (CVR) due to increase low-density lipoprotein cholesterol (LDLc) level. Berberine (BBR) is a natural hypocholesterolemic alkaloid able to reduce circulating PCSK9 by hampering its transcription via the inhibition of hepatic nuclear factor 1α (HNF1α) transcription factor. Moreover, BBR prolongs LDL receptor (LDLR) mRNA half-life. Despite its proven efficacy as hypocholesterolemic agent, BBR has a poor bioavailability. The aim of this study was to evaluate the efficacy of a new BBR formulation (BBR-U) both *in vitro* and *in vivo*.

Methods: HuH7 human hepatocarcinoma cells were incubated for 24h with increased concentration (10 – 20 – 40µg/mL) of two different BBR formulations: not formulated BBR (BBR) and BBR-U. Simvastatin 40µM and BBR chloride 40µM were use as positive controls. RT-qPCR, western blotting, and LDL-uptake assays were performed to evaluate the efficacy of the new BBR formulation. Twenty male wild-type C57BL/6 mice (age 6 weeks at starting time) were randomly divided in 4 groups (5 mice each) in order to receive standard diet (SD) or high fat diet (HFD) for 16 weeks and oral BBRs gavage (or vehicle) for the last 8 weeks, according to this scheme: group 1 (G1), SD + vehicle; G2, HFD + vehicle; G3, HFD + BBR; G4, HFD + BBR-U. The daily oral gavage was provided from Monday to Friday. BBR and BBR-U dosage was initially 50mg/kg/die and 6.25mg/kg/die respectively, according to the different Cmax observed. Glucose tolerance test (GTT) was performed the day before sacrifice. At sacrifice, liver, kidney, brain, and blood were collected. Pcsk9 serum levels was measured thanks to commercially available ELISA kit. BBR distribution among tissues were analyzed via mass spectrometry (MS)

Results: *In vitro*, BBR-U produced a significant decrease in PCSK9 mRNA, intracellular and extracellular protein levels at each tested concentration ($p < 0.001$ vs control), and a significant dose-dependent increase in LDLR mRNA levels and in LDL uptake by the cells. *In vivo*, BBR-U 6.25mg/kg/die proved very effective in reducing Pcsk9 serum levels in HFD mice (-50% vs SD mice), compared to BBR 50mg/kg/die. In addition, BBR-U 6.25mg/kg/die proved as effective as BBR 50mg/kg/die in ameliorating GTT profile compared to vehicle-gavaged-HFD mice. MS analysis showed a different distribution of BBR and its metabolites among tissues in BBR-U derived murine tissues compared to BBR ones, with the brain being the most affected.

Conclusion: The innovative formulation of BBR (BBR-U) proved highly effective in reducing PCSK9 expression and in boosting LDL uptake in HuH7 cell line. Moreover, a very low-dosage of BBR-U oral gavage on mice under HFD regimen resulted as effective as BBR at standard dosage in reducing PCSK9 serum level and in ameliorating GTT profile, compared to HFD mice, thus proving the innovative formulation being a very successful tool to improve the low BBR bioavailability. In addition, the different distribution of BBR and its metabolites in tissues from BBR-U group (es. brain), may pave the way to effectively repurpose BBR to treat

other diseases, such as Alzheimer's, in whose onset and progression cholesterol seems to play a role, and in which BBR has been already proved to be effective.

DEPRESSION AND CARDIOVASCULAR RISK IN OBESITY: IMPACT OF PROPROTEIN CONVERTASE SUBTILISIN/KEXIN TYPE 9 AND BRAIN-DERIVED NEUROTROPHIC FACTOR ON ADIPOCYTES

C. Macchi¹, P. Amadio², M.F. Greco¹, M. Buoli³, L. Vigna⁴, A. Ieraci⁵, A. Corsini¹, S. Barbieri², C.R. Sirtori¹, V. Bollati⁶, M. Ruscica¹

¹Department of Pharmacological and Biomolecular Sciences, Università degli Studi di Milano; ²Unit of Brain-Heart Axis: Cellular and Molecular Mechanisms, Centro Cardiologico Monzino IRCCS, Milan; ³Department of Pathophysiology and Transplantation, Università degli Studi di Milano; ⁴Occupational Medicine Unit, Fondazione Cà Granda, IRCCS Ospedale Maggiore Policlinico, Milan; ⁵Laboratory of Neuropsychopharmacology and Functional Neurogenomics, Department of Pharmaceutical Sciences, Università degli Studi di Milano; ⁶EPIGET Lab, Department of Clinical Sciences and Community Health, Università degli Studi di Milano
E-mail: chiara.macchi@unimi.it

Introduction. Obesity, raising Worldwide, increases the susceptibility to cardiovascular diseases (CVDs) and mood disorders. Among these, depression enhances the CVD risk and it is approximately twice as prevalent in women. Obesity, depression and CVDs often come hand in hand, although a mechanistic link among these three conditions remains not well defined. Aim. To unravel molecular pathways beneath these liaisons.

Methods. In 642 obese individuals, of the cross-sectional SPHERE (Susceptibility to Particle Health Effects, miRNAs and Exosomes) study, we evaluated possible mediators of the link between depression and obesity (proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) and Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF)). We have deepened the molecular mechanisms contributing to this association by taking advantage of an in vitro model of human adipocytes (SW872 cells).

Results. In the SPHERE cohort, PCSK9, a key-regulator of cholesterol, mediated 11% of the relationship between depression and insulin resistance, a CVD risk factor. This association was lost in carriers of the loss-of-function PCSK9 R46L variant, confirming a possible causal role for PCSK9 in the link between depression and insulin resistance. Since SPHERE cohort comprises obese individuals, the effects of PCSK9 on SW872 cells were investigated. The silencing of PCSK9 raised the adipocyte differentiation process. Since BDNF Val66Met human polymorphism is involved in the onset of depression, in CVD risk and in adipose tissue pathophysiology, we measured circulating BDNF levels in the SPHERE cohort. Circulating BDNF was negatively associated with depression (BDI-II score), while positively associated with insulin and HOMA-IR, an index of insulin resistance, in females. Treatment of SW872 cells with ProBDNFMet synthetic peptide impaired adipogenesis and the insulin signaling pathway.

Conclusions. PCSK9 and BDNF may share biological mechanisms underlying the association between depression and insulin resistance. This suggests how they may be intertwined in modulating CV risk factors in the presence of an obesity-driven depressive-like phenotype.

RESTRING: MANAGING FUNCTIONAL ENRICHMENT OF COMPLEX EXPERIMENTAL DESIGNS MADE EASY

S. Manzini¹, M. Busnelli¹, A. Colombo¹, E. Franchi¹, P. Grossano²

¹Department of Pharmacological and Biomolecular Sciences, Università degli Studi di Milano; ²Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milano
E-mail: stefano.manzini@unimi.it

Functional enrichment analysis is an analytical method to extract biological insights from gene expression data, popularized by the ever-growing application of high-throughput techniques. Typically, expression profiles are generated for hundreds to thousands of genes/proteins from samples belonging to two experimental groups, and after ad-hoc statistical tests, researchers are left with lists of statistically significant entities, possibly lacking any unifying biological theme. Functional enrichment tackles the problem of putting overall gene expression changes into a broader biological context, based on pre-existing knowledge bases of reference: database collections of known expression regulation, relationships and molecular interactions. STRING is among the most popular tools, providing both protein-protein interaction networks and functional enrichment analysis for any given set of identifiers. For complex experimental designs, manually retrieving, interpreting, analyzing and abridging functional enrichment results is a daunting task, usually performed by hand by the average wet-biology researcher. We have developed restring (<https://github.com/Stemanz/reString>), a cross-platform, open-source software that seamlessly retrieves from STRING functional enrichments from multiple user-supplied gene sets, without any need for specific bioinformatics skills. As a core capability, it aggregates all such findings into human-readable table summaries, with built-in features to easily produce user-customizable publication-grade clustermaps and bubble plots. Everything is managed through reString's straightforward graphical user interface in just a few clicks and seconds of processing times. The software is backed with a comprehensive online documentation, YouTube installation tutorials, sample input files, online support, an upcoming publication and more.

CEREBROSPINAL FLUID AND SERUM HDL CHOLESTEROL EFFLUX CAPACITY ARE IMPAIRED IN NEURODEGENERATIVE DISORDERS

C. Marchi¹, M.P. Adorni², E. Conti³, L. Tremolizzo⁴, F. Bernini¹, L. Calabresi⁵, F. Zimetti⁶

¹Department of Food and Drug, University of Parma;

²Department of Medicine and Surgery, University of Parma;

³Lab of Neurobiology, School of Medicine and Surgery and Milan Center of Neuroscience, University of Milano-Bicocca, Monza;

⁴Lab of Neurobiology, School of Medicine and Surgery and Milan Center of Neuroscience, University of Milano-Bicocca, Monza, Neurology Unit, San Gerardo Hospital, ASST Monza;

⁵Centro E. Grossi Paoletti, Department of Pharmacological and Biomolecular Sciences, University of Milano;

⁶Department of Food and Drug, University of Parma

E-mail: cinzia.marchi2@studenti.unipr.it

Background. Alterations of cholesterol homeostasis in the central nervous system (CNS) have been associated to various neurodegenerative disorders, including Alzheimer's disease (AD). In the brain, cholesterol transport is mediated by lipoproteins similar to plasma HDL that have been identified in the cerebrospinal fluid (CSF). These particles, as occurs in plasma, interact with membrane transporters such as ABCA1 and ABCG1 both expressed on astrocytes, and promote the efflux of cholesterol towards the neurons. The overall objective of the present study is to characterize CSF and serum of AD patients, by evaluating their HDL cholesterol efflux capacity (CEC), in comparison with non-AD dementia patients and controls.

Material and Methods. CSF and serum from AD (n=36), non-AD dementia (n=13) and from control subjects (n=14) have been collected by lumbar puncture and blood withdrawal, respectively. CEC was evaluated by a radioisotopic technique, using specific cellular models. In particular, human astrocytoma cells U373 were used as models of astrocytes to evaluate CSF-CEC. For serum evaluation we used ABCG1 overexpressing CHO and ABCA1 overexpressing J774 macrophages.

Results. CSF-CEC measured in astrocytes was reduced both in AD and non-AD dementia patients compared to controls (-40%, p=0.0193; -38%, p=0.0308, respectively). By analyzing serum from the same patients, we found that the total efflux from macrophages did not differ among the three groups. However, by separately evaluating the single cholesterol efflux pathways, we observed that ABCA1-CEC in AD and non-AD dementia patients was reduced compared to controls (-19.5%, p=0.0151 and -28.4%, p=0.0015, respectively). In addition, serum ABCG1-CEC was lower in AD patients compared to controls (-19.5%, p=0.0153). By considering AD and non-AD patients as a whole group, we found a direct correlation between serum ABCG1-CEC and the MMSE score evaluated at sixth month of follow-up ($r=0.47$; $p=0.03$).

Conclusion. These preliminary results suggest that neurodegenerative disorders may be associated to alterations of brain cholesterol transport. These alterations are also detectable in serum correlating with the degree of cognitive decline. Further evaluations will be necessary to establish whether CSF or serum CEC may represent valid biomarkers of disease or a novel pharmacological target.

VALUTAZIONE DELLA DISPERSIONE DEGLI INDICI DI RIPOLARIZZAZIONE NEI PAZIENTI AFFETTI DA COVID-19

M. Marino, F. Spadaro, D. Sinicropi, M. Sparacino, M. Cinquegrani, E. Rullo Venenzi, C. Morace, G. Nunnari, G. Squadrato, V. Viapiana, G. Mandrafino

Internal Medicine Unit Department of Clinical and Experimental Medicine University of Messina

E-mail: marinom04@gmail.com

L'OMS ha dichiarato l'infezione da SARS-CoV-2 come emergenza sanitaria di interesse internazionale nel gennaio 2020. L'infezione da SARS-CoV-2 si presenta con diverse caratteristiche che potrebbero essere associate alla genesi dell'instabilità elettrica e all'allungamento dell'intervallo QT (1). La malattia può agire in chiave pro-aritmica non solo per l'effetto patogeno diretto o indiretto associato alla risposta infiammatoria (2), ma anche per la terapia farmacologica di fondo utilizzata o per il suo trattamento (3). Abbiamo valutato retrospectivamente i dati clinici ed elettrocardiografici di 75 pazienti affetti da COVID-19 ricoverati presso l'Unità di Malattie Infettive dell'Azienda Ospedaliera Universitaria G. Martino di Messina nel periodo compreso tra marzo e maggio 2020. Sono stati considerati l'età e l'anamnesi farmacologica (OLT, corticosteroidi, azitromicina, idrossiclorochina, EBPM, fondaparinux, anticoagulanti orali, altri farmaci potenzialmente in grado di allungare l'intervallo QT) (4). Il rischio di aritmie ventricolari e morte cardiaca improvvisa è stato valutato calcolando gli intervalli QT e QTc, (5) ed indici da questi derivati quali la dispersione e la DS di QT e QTc (6), sia al momento del ricovero che durante la degenza ospedaliera, secondo il metodo raccomandato da Priori et al. (7). Il 44% dei pazienti (33 su 75) inclusi nello studio assumeva - come terapia consolidata - farmaci riconosciuti come potenzialmente in grado di allungare l'intervallo QT (antipsicotici, antiepilettici, antidepressivi), spesso in combinazione; inoltre, al 62,67% delle persone incluse (47 su 75) è stato prescritto il protocollo azitromicina/idrossiclorochina come raccomandato nel periodo di riferimento. Non abbiamo trovato alcuna associazione significativa tra i parametri elettrocardiografici e i farmaci prescritti. Abbiamo testato ogni parametro elettrocardiografico come potenziale predittore di mortalità intraospedaliera in pazienti con COVID-19. Non sono stati stimati modelli significativi per i parametri QT e QTc e le misure derivate, ad eccezione della dispersione relativa di QTc (beta 0,651, p=0,003), identificata pertanto come potenziale predittore di mortalità. I dati ottenuti supportano il suggerimento di valutare gli indici di dispersione della ripolarizzazione ventricolare per stimare il rischio proaritmico nei pazienti COVID-19. Potrebbe essere utile un follow-up elettrocardiografico più stretto durante la degenza ospedaliera per poter riconoscere precocemente i pazienti a maggior rischio di morte cardiaca.

Bibliografia

- Yenerağ M, Arslan U, Doğuş M, Günal Ö, Öztürk ÇE, Aksan G, Erdogan G, Güll S, Yontar OC, Sen A. Evaluation of electrocardiographic ventricular repolarization variables in patients with newly diagnosed COVID-19. *J Electrocardiol.* 2020; 62: 5-9.
- Lazzerini PE, Laghi-Pasini F, Acampa M, Boutjdir M, Leopoldo Capecchi P. IL-6 (Interleukin 6) Blockade and Heart Rate Corrected QT Interval Prolongation in COVID-19. *Circ Arrhythm Electrophysiol.* 2020; 13(9).
- Bazoukis G, Yeung C, Wui Hang Ho R, Varrias D, Papadatos S, Lee S, Ho Christien Li K, Sakellaropoulos A, Saplaouras A, Kitoulis P, Vlachos K, Lampropoulos K, Thomopoulos C, Letsas

- KP, Liu T, Tse G. Association of QT dispersion with mortality and arrhythmic events-A meta-analysis of observational studies. *J Arrhythm.* 2019; 36(1): 105-115.
4. Zhu S, Wang J, Wang Y, Chu J, Liu Y, Chen X, Chen X. QTc prolongation during antiviral therapy in two COVID-19 patients. *J Clin Pharm Ther.* 2020; 45(5): 1190-1193.
 5. Kosmopoulos M, Roukoz H, Sebastian P, Kalra R, Goslar T, Bartos JA, Yannopoulos D, Benditt DG. Increased QT Dispersion Is Linked to Worse Outcomes in Patients Hospitalized for Out-of-Hospital Cardiac Arrest. *J Am Heart Assoc.* 2020; 9(16): e016485.
 6. Kautzner J, Yi G, Camm AJ, Malik M. Short- and long-term reproducibility of QT, QTc, and QT dispersion measurement in healthy subjects. *Pacing Clin Electrophysiol.* 1994; 17(5 Pt 1) 928-37.
 7. Priori SG, Napolitano C, Diehl L, Schwartz PJ. Dispersion of the QT interval. A marker of therapeutic efficacy in the idiopathic long QT syndrome. *Circulation.* 1994; 89(4): 1681-9.

COMPARING DIETARY CALORIC INTAKE AND DIETARY INFLAMMATORY POTENTIAL

E. Mattavelli¹, R. Domenighini², L. Redaelli², C. Tidone², A. Pirillo³, L. Grigore², F. Pellegatta², P. Magni², A.L. Catapano⁴, A. Baragetti¹

¹Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università di Milano; ²SISA Centro per lo Studio dell'Aterosclerosi, Ospedale Bassini, Cinisello Balsamo, Milano; ³SISA Centro per lo Studio dell'Aterosclerosi, Ospedale Bassini, Cinisello Balsamo, Milano, IRCCS Ospedale Multimedica Milano; ⁴Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università di Milano, IRCCS Ospedale Multimedica Milano
E-mail: elisa.mattavelli@unimi.it

Introduction. The increasing access to a variety of nutrient-dense food is believed to impact on the risk CVDs worldwide, despite it is still unresolved whether this association is merely reflecting the caloric intake or it implies an inflammatory effect of the macro-nutrients and food component. To preliminary get into these aspects, we analyzed how the whole caloric dietary intake or the quantitative intake of specific macronutrients associate with a set of immune-inflammatory circulating markers that we previously associated with CVD occurrence.

Materials and Methods. Clinical, anthropometrical, biochemical information of 336 subjects (PLIC cohort) were collected. The analysis of seven day-dietary records provided two parameters that were independently used in the analysis: a) the whole energy intake (kcal) was derived from and b) the estimated pro-/anti-inflammatory score of diet Dietary Inflammatory Index (DII) (that sums the quantitative intake of each dietary component, multiplied for a correction factor indicative of the in vitro inflammatory effect of the component). In addition, to evaluate the estimated DII independently from caloric intake, Energy Adjusted-Dietary Inflammatory Index (EA-DII) was also calculated. A panel of 368 inflammatory systemic markers were evaluated; Parameters were quantitated by mass spectrometry and their changes were normalized (Normalized Protein eXpression; NPX). Also complete hematocrit formula were crossed with dietary data.

Results and Conclusion. We observed that higher caloric intakes (> median 1.700 Kcal/day), that were more likely explained by the quantitative daily intake of fats, were associated with a significant amount of immune-inflammatory markers (up to 50). Similarly to the whole caloric intake, also higher DII values (indicating a more pro-inflammatory potential of diet) were explained by higher intakes of dietary fats, although they were associated with different immune-inflammatory markers and more significantly with leukocytes from hematocrit. These findings hold true also when considering (EA-DII). This preliminary study, one of the few harnessing quantitative analysis of dietary intakes, calls for the formulation of future algorithms, to be tested on larger populations, to assess the inflammatory relevance of diet.

HOMEMADE FOOD, ALCOHOL, AND BODY WEIGHT: CHANGE IN EATING HABITS IN YOUNG INDIVIDUALS AT THE TIME OF COVID 19 LOCKDOWN

S. Maurotti¹, Y. Ferro¹, E. Mazza², G. Boragina³, A. Mirarchi², J. Khoory⁴, A. Pujia⁵, T. Montalcini³

¹Department of Health Science, University Magna Græcia;

²Department of Medical and Surgical Science, University Magna Græcia; ³Department of Clinical and Experimental Medicine, University Magna Græcia;

⁴Nutrition Unit, University Magna Græcia; ⁵Department of Medical and Surgical Science, University Magna Græcia

E-mail: smaurotti@unicz.it

Background. The 2019 coronavirus disease (COVID-19) lockdown has caused significant changes in everyday life. This study evaluated the effect of the COVID-19 quarantine on dietary and alcohol consumption habits and body weight of Italian university students.

Materials and Methods. An online cross sectional survey was carried out among university students than 18 years in July 2020. The online self administered questionnaire included demographic and anthropometric data (reported weight and height), weight, and dietary habits changes during of the COVID-19 lockdown.

Results. A total of 520 respondents have been included in the study. A total of 393 (~76%) were female, 3.8% was obese, and the mean age was 23±4 years. Numerous students reported a change in their eating habits during the lockdown with an increase in consumption of chocolate (40%), ice cream, and desserts (34%), but most of all an increase of homemade bread and pasta (60%), pizza (47%), and homemade sweets (55%). The students also reported an increase of vegetables, fresh fruit, legumes, eggs, and coffee, but also of processed meat, fried foods, cheeses, butter, and sweet beverage, and a reduction in alcohol intake. The weight gain was observed in 43.8%, and males have greater weight gain than females (57% vs. 46%, respectively; P=0.04). A greater increase in body weight was observed in obese as compared to those with normal weight (77% vs. 44%, respectively; P<0.001).

Conclusions. Our data highlighted the need for dietary guidelines to prevent weight gain during the self-isolation period, particularly by targeting people who are overweight and obese, with increased atherosclerotic and cardiometabolic risk. Therefore, targeted interventions are needed to maintain optimal body weight for maximum benefits already in young people, to reduce these dietary errors that lead to early atherosclerosis.

ATHEROSCLEROSIS, NON-ALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE AND SARCOPENIA: A DANGEROUS TRIAD

S. Maurotti¹, Y. Ferro¹, E. Mazza², M. Prastaro², G. Boragina³, A. Mirarchi², R. Mare², A. Pujia², T. Montalcini³

¹Department of Health Science, University Magna Græcia;

²Department of Medical and Surgical Science, University Magna Græcia; ³Department of Clinical and Experimental Medicine, University Magna Græcia

E-mail: smaurotti@unicz.it

Background. While it is well recognized that cirrhotic patients are affected by sarcopenia, it is currently unexplored the association between non-alcoholic fatty liver disease and sarcopenia. Myostatin levels significantly increased in both conditions. It modulates fibrogenic phenotype of human liver cells and promotes atherosclerotic damage. Grip strength is a parameter of muscle function and is the primary measure for the diagnosis of sarcopenia, which also influences immune response and inflammation mechanisms. The relationship between muscle deterioration and hepatic steatosis are extensively investigated in the Asian population, but not in Caucasians. We thus assessed the association between muscle function, liver steatosis and atherosclerosis in an adult population.

Methods. We retrospectively evaluated 388 ambulatory patients of both genders. Dynamometer, transient elastography and atherogenic index of plasma were performed. Relative handgrip strength was assessed as the handgrip strength divided by the body mass index. The population was divided into tertiles.

Results. A total of 207 participants had non-alcoholic fatty liver disease. The prevalence of hepatic steatosis was higher among the participants with the lowest relative handgrip strength (tertile I) than those with a higher (tertile III) (64% vs 46%, p=0.02). Compared to the tertile III (reference), the tertile I and tertile II had significantly higher ORs of having non-alcoholic fatty liver disease (OR=5.30, 95% CI=2.24-12.57, p<0.001; and OR=2.56, 95% CI=1.17-5.59, p=0.01; respectively). Furthermore, atherogenic index of plasma was significantly higher only in the adult men of tertile I than those in the tertile III (4.54±0.6 vs 0.33±0.06, p=0.05; respectively).

Conclusion. We observed a greater risk of non-alcoholic fatty liver disease in Caucasian individuals with lower handgrip strength. Several metabolic alteration are common in liver disease, atherosclerosis and sarcopenia. The muscle function assessment might be useful in identify individuals at risk for liver steatosis and atherosclerosis especially in men.

CIRCULATING LIPOOLYSACCHARIDES AND IMPAIRED ANTIOXIDANT STATUS IN PATIENTS WITH ATRIAL FIBRILLATION. DATA FROM THE ATHERO-AF STUDY

D. Menichelli, R. Carnevale, C. Nocella, V. Cammisotto, V. Castellani, S. Bartimoccia, G. Frati, F. Violi, P. Pignatelli, D. Pastori
Sapienza University of Rome
 E-mail: danilo.menichelli@uniroma1.it

Background. Atrial fibrillation (AF) is characterized by an oxidative imbalance, which is associated with an increased risk of cardiovascular events (CVEs). It is unclear whether low grade endotoxemia may contribute to the impaired antioxidant status in AF patients. We investigated the relationship between circulating lipopolysaccharides (LPS) and antioxidant status in AF patients.

Patients and Methods. Post-hoc analysis from the ongoing prospective observational cohort ATHERO-AF study including 907 patients. Antioxidant status was evaluated by the activity of glutathione peroxidase 3 (GPx3) and superoxide dismutase (SOD). Patients were divided into two groups to evaluate the risk of CVEs:

- 1) LPS below median and GPx3 above median (n=254);
- 2) LPS above median and GPx3 below median (n=263).

Results. The mean age was 73.5 ± 8.3 years, and 43.1% were women. Median LPS and GPx3 were 50.0 pg/mL (interquartile range [IQR] 15-108) and 20.0 U/mL (IQR 10.0-34.0), respectively. Patients of Groups 2 were older, with a higher prevalence of heart failure. LPS above the median was associated with reduced GPx3 (Odds Ratio for LPS 1.752, 95% Confidence Interval [CI] 1.344-2.285, p<0.001) and SOD (OR 0.525, 95%CI 0.403-0.683) activity after adjustment for CHA2DS2VASc score. In a mean follow-up of 54.0 ± 36.8 months, 118 CVEs occurred, 42 in Group 1 and 76 in Group 2 (Log-Rank test p=0.001). At multivariable Cox regression analysis, Group 2 was associated with a higher risk of CVEs (Hazard Ratio [HR] 1.644, 95%CI 1.117-2.421, p=0.012), along with age ≥ 75 years (HR 2.035, 95%CI 1.394-2.972, p<0.001), diabetes (HR 1.927, 95%CI 1.280-2.900, p=0.002), and previous cerebrovascular disease (HR 1.895, 95%CI 1.251).

Conclusions. Our study indicates that circulating LPS may contribute to impaired antioxidant status in patients with AF. Patients with coincidentally high LPS and reduced GPx3 activity showed the highest risk of CVEs.

CONSEQUENCES OF ANGPTL3 DEFICIENCY ON HEPATIC AND EXTRAHEPATIC FAT DISTRIBUTION: A COMPARISON OF ANGPTL3 GENE LOSS-OF-FUNCTION CARRIERS

I. Minicocci¹, L. D'Erasmo², T. Neufeld³, M. Di Martino⁴, T. Fraum⁵, A. Di Costanzo⁶, S. Bini⁶, M. Maranghi⁶, G. Pigna⁶, G. Labbadia⁷, J. Zheng⁸, P. Commean⁵, A. Montali⁶, F. Ceci⁹, C. Catalano¹⁰, A. Arca¹¹, N. Stitzel¹¹

¹Department of Translational and Precision Medicine, Sapienza, University of Rome; ²Department of Translational and Precision Medicine, Sapienza, University of Rome; ³Cardiovascular Division, Department of Medicine, Washington University School of Medicine, Saint Louis, Missouri, USA; ⁴Department of Radiological Sciences, Oncology, Anatomical Pathology, Sapienza, University of Rome; ⁵Mallinckrodt Institute of Radiology, Washington University School of Medicine, Saint Louis, Missouri, USA; ⁶Department of Translational and Precision Medicine, Sapienza, University of Rome; ⁷Department of Internal Medicine and Medical Specialties, Sapienza University of Rome; ⁸Mallinckrodt Institute of Radiology, Washington University School of Medicine, Saint Louis, Missouri, USA; ⁹Department of Experimental Medicine, Sapienza, University of Rome; ¹⁰Department of Radiological Sciences, Oncology, Anatomical Pathology, Sapienza, University of Rome; ¹¹Cardiovascular Division, Department of Medicine; Department of Genetics and McDonnell Genome Institute, Washington University School of Medicine, Saint Louis, Missouri, USA;
 E-mail: ilenia.minicocci@hotmail.it

Introduction. Loss-of-function (LOF) mutations in ANGPTL3 cause familial combined hypolipidemia (FHBL2) characterized by very low levels of all major lipoprotein fractions (LDL-C, TGs, HDL-C and ApoB). Genetic or pharmacological inactivation of ANGPTL3 has emerged as a new therapeutic opportunity to lower two causal risk factors (LDL-C and TG) for coronary heart disease (CHD) with potentially favorable metabolic effects. It is unknown, however, if inhibiting ANGPTL3 will result in adverse consequences. We aimed to ascertain changes in fat liver content as well as ectopic fat distribution in subjects showing partial or total ANGPTL3 deficiency due to the presence of inactivating mutations in ANGPTL3 gene.

Methods. We studied individuals carrying LOF mutations in ANGPTL3 resulting in complete (N=6) or partial (N=28) ANGPTL3 deficiency along with 76 wild-type controls. Magnetic resonance spectroscopy (MRS) and chemical shift magnetic resonance imaging (csMRI) were used to quantify hepatic triglyceride content in ANGPTL3 LOF carriers and non-carriers.

Results. The mean hepatic fat fraction (HFF) measured by MRS was not significantly different in ANGPTL3 LOF mutation carriers as compared with non-carrier controls [$8.1\% \pm 13.3\%$ (IQR 0.1%-9.2%) vs. $11.9\% \pm 16.3\%$ (IQR 0.1%-21.6%), respectively, P=NS]. Similar results were found by csMRI [$5.6\% \pm 3.8\%$ (IQR 2.6%-7.1%) vs. $7.3\% \pm 6.2\%$ (IQR 2.7%-9.7%), respectively, P=NS]. In a multivariate model including ANGPTL3 genotype, age, gender, triglycerides, BMI and HOMA-IR, we found that only BMI and HOMA-IR were independently associated with increased HFF.

Conclusion. In the present study, we have shown how loss of ANGPTL3 function *in vivo* is not associated with hepatic fat accumulation thus suggesting that the pharmacological inhibition of ANGPTL3 may be not associated with increased risk of fatty liver.

Disclosures. This work was funded by the United States National Institutes of Health (R01HL131961). NS has received an investigator-initiated research grant from Regeneron Pharmaceuticals.

AGING-RELATED DECLINE OF AUTOPHAGY IN PATIENTS WITH ATRIAL FIBRILLATION. A POST-HOC ANALYSIS FROM THE ATHERO-AF STUDY

C. Nocella¹, F. Versaci², V. Valenti², M. Forte³, V. Cammisotto⁴, S. Bartimoccia⁵, L. Schirone⁵, S. Schiavon⁵, D. Vecchio⁵, L. D'Ambrosio⁶, G. Spinosa⁵, A. D'Amico⁶, I. Chimenti⁵, F. Violì⁷, G. Frati⁸, P. Pignatelli⁹, S. Sciarretta⁸, D. Pastori⁹, R. Carnevale¹⁰
¹Department of Clinical, Internal Medicine, Anesthesiological and Cardiovascular Sciences, "Sapienza" University of Rome;
²Department of Cardiology, Santa Maria Goretti Hospital, Latina; ³IRCCS Neuromed, Pozzilli (IS); ⁴Department of General Surgery and Surgical Speciality Paride Stefanini, Sapienza University of Rome; ⁵Department of Medical-Surgical Sciences and Biotechnologies, Sapienza University of Rome, Latina; ⁶Department of Movement, Human and Health Sciences, University of Rome "Foro Italico", Rome; ⁷Mediterranea Cardiocentro, Naples; ⁸IRCCS Neuromed, Pozzilli (IS), Department of Medical-Surgical Sciences and Biotechnologies, Sapienza University of Rome, Latina; ⁹Department of Clinical, Internal, Anesthesiological and Cardiovascular Sciences, "Sapienza" University of Rome; ¹⁰Department of Medical-Surgical Sciences and Biotechnologies, Sapienza University of Rome, Latina, Mediterranea Cardiocentro, Naples
E-mail: cristina.nocella@uniroma1.it

Background. Aging is an independent risk factor for chronic disorder. Recent evidence suggests that autophagy plays a role in delaying aging and improving cardiovascular function in aging.
Methods. Post-hoc analysis of the prospective ATHERO-AF cohort study including 150 atrial fibrillation (AF) patients and 150 healthy subjects (HS). The population was divided into three age groups: <50-60, 61-70 and >70 years. Oxidative stress (Nox2 activity and hydrogen peroxide, H2O2), platelet activation (PA) by sP-selectin and CD40L, endothelial dysfunction (nitric oxide, NO) and autophagy parameters (P62 and ATG5) were assessed.

Results. Nox2 activity and H2O2 production were higher in AF patients than HS; conversely, antioxidant capacity was decrease in AF patients compared HS. Compared to HS, NO bioavailability in AF patients was decreased. Moreover, sP-selectin and CD40L were higher in AF patients than HS. Autophagy process was also significantly impaired in AF patients. Moreover, a significant difference in oxidative stress, PA, endothelial function and autophagy across age groups was found. A simple linear regression analysis showed that autophagy markers were associated with oxidative stress, PA and endothelial dysfunction both AF patients and HS.

Conclusions. This study provides evidence that autophagy process may represent a mechanism for the increased cardiovascular risk in the AF population.

STUDY OF THE ROLE OF MATURE NATURAL KILLER CELLS IN EXPERIMENTAL ATHEROSCLEROSIS

J. Nour¹, F. Bonacina¹, A. Moregola¹, R. Bellini¹, C. Garlanda², G.D. Norata³

¹Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano; ²Dipartimento di Scienze Biomediche, Istituto Clinico Humanitas, IRCCS, Rozzano (MI);

³Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano; Centro SISA, Ospedale Bassini, Cinisello Balsamo (MI)

E-mail: jasmine.nour@unimi.it

Aim. Natural killer cells are innate lymphoid cells, playing a key role in the antiviral and antitumoral response. Mature Natural Killer 2 (mNK2, CD27-CD11b+) is a subset of NK known for its cytotoxic activity towards unhealthy cells and is increased following IL-1r8 (TIR-8) deficiency. Our aim is to study mNK2 in experimental atherosclerosis.

Methods. 8 weeks old-LDLR KO and IL-1r8/LDLR double KO (DKO) male mice were fed with standard diet (STD) or western-type diet (WTD) for 12 weeks. Plasma lipid profiling, extensive immunophenotyping by flow cytometry and histological analysis of the atherosclerotic plaques were then performed to evaluate the progression of atherosclerosis.

Results. Circulating mature Natural Killer 2 cells significantly increase in LDLR KO mice when fed for 12 weeks with cholesterol-enriched diet when compared to animals on STD ($p<0,01$). In mice fed standard diet, IL-1r8 deficiency did not impact neither circulating and tissue-resident immune cell distribution, nor plasma lipids. When mice were fed with WTD, DKO mice presented a significant increase in circulating mNK2 ($p<0,0001$) and monocytes ($p<0,05$), as compared to LDLR KO animal, whereas plasma cholesterol and triglyceride levels were similar. The increase in mNK2 cells however did not impact the development of atherosclerotic plaques which presented similar atheroma area, collagen deposition and macrophage infiltration.

Conclusion. These data suggest that mature Natural Killer 2 cells do not impact the development of atherosclerosis.

SEPARATE AND COMBINED EFFECTS OF BODY MASS INDEX AND POLYGENIC PREDISPOSITION TO HIGH BMI ON THE RISK OF DEVELOPING TYPE 2 DIABETES

E. Olmastroni¹, B.A. Ference², Q. Guo³, D.L. Bhatt³, N.J. Samani⁴, K.K. Ray⁵, S.J. Nicholls⁶, T.B. Ference², F. Galimberti⁷, G.D. Smith⁸, M.V. Holmes⁹, C. Baigent⁹, S.E. Nissen¹⁰, C.T. Ruff¹¹, M.S. Sabatine¹¹, A.L. Catapano⁷, N. Sattar¹², J.E. Deanfield¹³
¹*Epidemiology and Preventive Pharmacology Service (SEFAP), Department of Pharmacological and Biomolecular Sciences, University of Milan; ²Centre for Naturally Randomized Trials, University of Cambridge, Cambridge, UK; ³Brigham and Women's Hospital Heart and Vascular Center, Harvard Medical School, Boston, MA; ⁴Department of Cardiovascular Sciences, University of Leicester, Leicester, UK & National Institute for Health Research Leicester Cardiovascular Biomedical Research Centre, Leicester, UK; ⁵Imperial Centre for Cardiovascular Disease Prevention, Department of Primary Care and Public Health, School of Public Health, Imperial College London, London UK; ⁶Victorian Heart Institute, Monash University, Melbourne, Australia; ⁷Epidemiology and Preventive Pharmacology Service (SEFAP), Department of Pharmacological and Biomolecular Sciences, University of Milan, Italy & Multimedica IRCCS, Milano; ⁸MRC Integrative Epidemiology Unit, University of Bristol, Bristol, UK; ⁹MRC Population Health Research Unit and the Clinical Trial Service Unit and Epidemiological Studies Unit, Nuffield Department of Population Health, University of Oxford, Oxford, UK; ¹⁰Cleveland Clinic Coordinating Center for Clinical Research, Department of Cardiovascular Medicine, Cleveland Clinic, Cleveland, Ohio; ¹¹Thrombolysis in Myocardial Infarction (TIMI) Study Group, Division of Cardiovascular Medicine, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston, USA; ¹²Institute of Cardiovascular and Medical Sciences, University of Glasgow, Glasgow, UK; ¹³Institute of Cardiovascular Science, University College London, London, UK
E-mail: elena.olmastroni@unimi.it*

Background. Type 2 diabetes (T2D) is a chronic metabolic disorder characterized by dysglycemia leading to microvascular and macrovascular complications. Whether measurements of body mass index (BMI) and polygenic predisposition to high BMI can be combined to better estimate risk of type 2 diabetes or identify the optimal timing for interventions to prevent diabetes is unknown. To address this issue, we sought to evaluate the separate and combined effects of BMI and a PGS on the risk of developing T2D. In addition, we sought to compare the effect of lifelong exposure to increased BMI as compared to BMI changes later in life on the risk of T2D to assess whether BMI has a cumulative effect on the risk of diabetes over time.

Methods. The primary outcome was type 2 diabetes, defined as the diagnosis of diabetes after the age of 35 years. We compared the separate and combined effects of BMI and a polygenic score (PGS) composed of 2,037,596 variants on the risk of T2D among 445,765 participants enrolled in UK Biobank. Cumulative lifetime risk of T2D was estimated using Kaplan-Meier curves, with age as the time scale, for participants within each quintile of PGS, and within each quintile of measured BMI. To evaluate the combined effect of measured BMI and polygenic predisposition to high BMI on the risk of T2D, the proportion of participants diagnosed with T2D was compared after ordering participants by quintiles of BMI and PGS, respectively. To make inferences about the optimal timing of interventions to prevent diabetes, we compared the effect of genetically determined lifelong exposure to increased BMI using a

96-variant instrumental variable BMI genetic score with the effect of increased BMI measured in middle-life on the risk of T2D.

Results. The mean age of participants at enrolment was 57.3 years (54.3% women), the median follow-up time was 8.1 years, and a total of 28,563 participants (6.4%) were diagnosed with T2D after the age of 35 years. A 1 standard deviation (SD) increase in BMI (4.77 units) as measured at the time of enrolment into UK Biobank was associated with an OR for diabetes of 2.26 (95%CI: 2.23-2.28). One SD increase in this score was associated with a OR of 1.50 (95%CI: 1.49-1.52). Both increasing quintiles of PGS and increasing quintiles of BMI were associated with increasingly steeper trajectories of lifetime risk for diabetes. Participants in the highest compared to lowest BMI quintile had an OR of 12.57 (95%CI: 11.43-13.34) for the risk of T2D, while participants in the highest compared to lowest PGS quintile had an OR of 3.09 (95%CI: 2.96-3.22). In stratified analyses, the risk of T2D varied by at least 10-fold within each quintile of PGS depending on differences in BMI. By contrast, ordering by BMI quintile stratified by PGS quintile appeared to separate participants into distinct categories of risk. In observational analyses, a 1-unit increase in BMI measured in middle life was associated with an OR for T2D of 1.21 (95%CI: 1.21-1.22). In Mendelian randomization analyses, a one-unit increase in genetically determined lifetime exposure to BMI was associated with an OR of 1.23 (95%CI: 1.21-1.25), suggesting that lifetime exposure to one-unit increase in BMI had a very similar effect on the risk of T2D as the same change in BMI measured in middle-life.

Conclusion. We found that BMI is a much stronger risk factor for T2D than polygenic predisposition to high BMI and that leads to reversible metabolic changes that do not accumulate over time. Therefore, most cases of diabetes can potentially be prevented or reversed if clinical interventions are put in place in the early stages of the disease.

NADPH OXIDASE-2 ACTIVATION AND GUT-DERIVED LIPOPOLYSACCHARIDES IN PATIENTS WITH CORONARY MICROVASCULAR ANGINA

F. Orlando¹, V. Ivanov², N. Ciobanu², M. Ivanov², C. Nocella¹, V. Cammisotto¹, A. Parainfi¹, P. Ciacci¹, E. Maggio¹, A. D'Amico³, S. Bartimoccia⁴, F. Barillà⁵, F. Violà⁶, R. Carnevale⁴, L. Loffredo¹

¹Department of Clinical, Internistic, Anaesthetic and Cardiovascular Sciences, Sapienza University of Rome;

²Moldavian Research Institute of Cardiology, Chisinau, Republic of Moldova;

³Department of Movement, Human and Health Sciences, University of Rome "Foro Italico", Rome;

⁴Department of Medical-Surgical Sciences and Biotechnologies, Sapienza University of Rome, Latina; ⁵Dipartimento di Medicina dei Sistemi, Università degli Studi "Tor Vergata", Roma;

⁶Cardiocentro Mediterranea, Napoli

E-mail: fedeorlando91@gmail.com

Background. Coronary microvascular angina (MVA) is characterized by typical chest pain, ischemic EKG alterations and the absence of obstructive coronary artery disease. Endothelial dysfunction and oxidative stress were hypothesized to be involved in the pathogenesis of this disease. In particular NADPH oxidase-2 (NOX2) activation could provoke increased oxidative stress and endothelial dysfunction but data in MVA have not been provided yet. The aim of this study was to evaluate NOX2 activation, serum lipopolysaccharide (LPS) levels as well as oxidative stress production and endothelial dysfunction in MVA patients and control group (CT).

Methods. In this study we wanted to compare serum levels of soluble NOX2-dp (sNOX-2-dp), H2O2 production, hydrogen peroxide breakdown activity (HBA), nitric oxide (NO) bioavailability, endothelin-1 (ET-1), zonulin and LPS in 80 consecutive subjects, including 40 MVA patients and 40 CT matched for age and gender.

Results. Compared with CT, MVA patients had significant higher values of sNOX-2-dp, H2O2, ET-1, LPS and zonulin; conversely HBA and NO bioavailability was significantly lower in MVA patients. Simple linear regression analysis showed that sNOX2 was associated with serum LPS ($R_s=0.629$; $p<0.001$), serum zonulin ($R_s=0.641$; $p<0.001$), H2O2 ($R_s=0.590$; $p<0.001$) and ET-1 ($R_s=0.410$; $p<0.001$); furthermore, an inverse correlation between sNOX2 and HBA ($R_s=-0.646$; $p<0.001$) and nitric oxide bioavailability ($R_s=-0.312$; $p=0.005$) was observed. Multiple linear regression analysis showed that LPS, HBA, zonulin emerged as the only independent predictive variables associated with sNOX2 ($R^2=61\%$).

Conclusions. This study provides the first report attesting that patients with MVA have an impairment of gut permeability, high LPS levels, NOX-2 activation and an imbalance between pro-oxidant and antioxidant systems, in favor of the oxidizing molecules that could be potentially implicated in the endothelial dysfunction and vasoconstriction of this disease.

B-TYPE AND NT-PROBNP NATRIURETIC PEPTIDES AS A PROGNOSTIC MARKER OF COVID-19 DISEASE SEVERITY AND OUTCOME: WHICH ONE IS THE BEST PERFORMER?

D. Palma¹, R. de Falco², M. Vano², G. Cardiero¹, C. Anastasio², P. Autiero², M. Savoia², G. Fortunato¹

¹Dip. di Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche, Università degli Studi di Napoli Federico II, Napoli;

²CEINGE S.C.a r.l. Biotecnologie Avanzate, Napoli

E-mail: palmad@ceinge.unina.it

Introduction. In March 2020, the World Health Organization (WHO) declared a pandemic for coronavirus disease (COVID 19). In September 2021, WHO data recorded about 220 million positive cases with a mortality rate of about 2% (over 4 million deaths). Several studies investigated the possible correlation between markers of cardiac disease and the worsening of COVID-19 severity (1, 2). Diffuse inflammation is the hallmark of the disease and could lead to atherosclerosis-based cardiovascular disease, as previously demonstrated for other infectious diseases (3). Increased concentrations of BNP and NT-proBNP in COVID-19 patients have already been reported. The aim of this study was to evaluate the usefulness of these markers and any potential difference between them in predicting COVID-19 prognosis.

Materials and Methods. We retrospectively collected and analyzed data about 174 consecutive adult patients affected with COVID-19. The clinical course of COVID-19 before hospitalization and its related complications were also acquired. In particular, the presence of pre-existing diseases related to cardiac and pulmonary functions was recorded, alongside with diabetes and hypertension. BNP and NT-proBNP of each patients were collected at admission in hospital. BNP plasma concentrations were measured by chemiluminescent microparticle immunoassay on the ARCHITECT i2000SR system (Abbott Laboratories, Wiesbaden, Germany). NT-proBNP was also measured on the ARCHITECT i2000SR system by using the Alere assay (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). Results: BNP and NT-proBNP values were higher in in-hospital non-surviving patients ($p<0.001$). Despite a high correlation obtained by Spearman's rank correlation coefficient between these two variables ($\rho=0.716$, $p<0.001$), receiver operating characteristics (ROC) curve analysis showed that NT-proBNP (AUC =0.951) performed better ($p=0.01$) than BNP (AUC =0.777). Kaplan-Meier analysis was performed by dividing the population into groups, based on whether NT-proBNP and BNP concentrations at admission were higher than the cut-offs resulting from ROC curves. Both log rank tests resulted significant ($p<0.001$), in the group of patients with NT-proBNP admission values lower than the cut-off showing an absence of fatal outcome, whereas the subgroup of patients with BNP admission values lower than cut-off included 53.84% of all non-survivors of this study.

Conclusion. NT-proBNP proved to be a better prognostic tool than BNP for fatal outcome in COVID-19 patients. In particular, our study highlighted that a value of NT-proBNP below the cut-off of 511 ng/L at admission led to no in-hospital mortality in our population.

References

1. Mueller C, Giannitsis E, Jaffe AS, Huber K, Mair J, Cullen L, Hammarsten O, Mills NL, Mockel, M, Krychtiuk K, et al. Cardiovascular biomarkers in patients with COVID-19. European heart journal. Acute cardiovascular care 2021.

2. Dawson D, Dominic P, Sheth A, Modi M. Prognostic value of Cardiac Biomarkers in COVID-19 Infection: A Meta-analysis. Research square 2020; 10.21203/rs.3.rs-34729/v1.
3. Musher DM, Abers MS, Corrales-Medina VF. Acute Infection and Myocardial Infarction. The New England journal of medicine. 2019; 380: 171-176.

PROPROTEIN CONVERTASE SUBTILISIN/KEXIN TYPE 9 (PCSK9) ALTERS CHOLESTEROL HOMEOSTASIS IN CELL MODELS OF ASTROCYTES AND NEURONS

B. Papotti¹, C. Marchi¹, N. Ferri², M.P. Adorni³, N. Ronda¹, F. Zimetti¹, F. Bernini¹

¹Department of Food and Drug, University of Parma;

²Department of Pharmaceutical and Pharmacological Sciences, University of Padova; ³Department of Medicine and Surgery, University of Parma

E-mail: bianca.papotti@unipr.it

Introduction. Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin type 9 (PCSK9) seems to be involved in Alzheimer's disease (AD), although the underlying mechanisms are not fully clarified. This study aims to investigate the influence of PCSK9 in cholesterol transport from astrocytes to neurons, essential to maintain neuronal functions.

Materials and Methods. The following cellular models have been utilized:

- 1) human astrocytoma U373 cells exposed to exogenous PCSK9;
- 2) human neuroblastoma SH-SY5Y cells differentiated to neurons overexpressing or not PCSK9.

Amyloid β ($A\beta$) fibrils were used to reproduce in vitro AD-like conditions. Cholesterol synthesis, efflux and uptake were evaluated by radioisotopic assays; cholesterol content by a fluorimetric assay. Gene and protein expression were evaluated through qRT-PCR and WB, while the interaction between fluorescent apolipoprotein E (apoE) and cells by confocal microscopy. Cell viability was evaluated through MTT assay.

Results. In U373 PCSK9 significantly increased endogenous cholesterol synthesis ($p<0.05$), either in the absence or presence of $A\beta$, and reduced LDLR and ApoER2 expression ($p<0.05$). PCSK9 and $A\beta$ both reduced intracellular cholesterol content ($p<0.05$ and $p<0.01$, respectively), with a more pronounced effect when incubated together ($p<0.001$). PCSK9 did not influence ABCA1- and ABCG1-mediated cholesterol efflux, while $A\beta$ reduced ABCA1-mediated efflux ($p<0.001$), and ABCA1 protein expression. In PCSK9-overexpressing SH-SY5Y cells, the uptake of apoE-HDL was reduced ($p<0.001$) compared to control cells, either in the absence or presence of $A\beta$. PCSK9 overexpression also reduced LDLR and ApoER2 expression ($p<0.05$) and the interaction between fluorescent apoE and cells. Finally, PCSK9 overexpression in $A\beta$ -treated cells furtherly reduced neuronal viability compared to control cells ($p<0.05$).

Conclusion. In conclusion, PCSK9, possibly in cooperation with $A\beta$, impairs brain cholesterol transport, with negative consequences on neuronal survival. Hence, PCSK9 may be considered a pathogenic factor in AD.

THE ROLE OF ADHERENCE TO LIPID-LOWERING THERAPIES IN ACHIEVING LIPID TARGET: FINDINGS FROM REAL-WORLD ANALYSIS IN ITALY

L. Degli Esposti¹, C. Borghi², M. Galvani³, E. Giacomini¹, P. Manotti⁴, A. Marra⁵, A. Passaro⁶, V. Perrone¹, F. Pieraccini⁷, D. Sangiorgi¹, A. Navazio⁸
¹CliCon Srl, Bologna; ²Medicine Department of Medical and Surgical Sciences University of Bologna; ³U.O.C. Cardiologia Ospedale Morgagni-Pierantoni Forlì, AUSL Romagna, Forlì; ⁴Dipartimento Cure Primarie, AUSL di Reggio Emilia; ⁵U.O. Farmacia Ospedaliera Dipartimento Biotecnologie, Trasfusionale e di Laboratorio Azienda Ospedaliero Universitaria S. Anna, Ferrara; ⁶Azienda Ospedaliera-Universitaria S. Anna, Ferrara; ⁷Assistenza farmaceutica AUSL della Romagna, Forlì; ⁸U.O. Cardiologia Ospedaliera Presidio Ospedaliero ASMN Azienda USL di Reggio Emilia - IRCCS, Reggio Emilia
E-mail: valentina.perrone@clicon.it

The objective of the present real-world analysis was to evaluate the impact of adherence to lipid-lowering drugs in reaching the lipid target in settings of clinical practice in Italy. The analysis was based on administrative and laboratory databases of selected Healthcare Units in Italy covering approximately 10% of Italian population. Adult patients prescribed with statins and with at least a low-density lipoprotein (LDL) determination were included between 2012 and 2019. The index date was defined as the first prescription for statins within the inclusion period. Patients fell into 4 clusters collectively exhaustive and mutually exclusive based on their characteristics assessed during the year prior index date. Patients were considered as adherent if they had a proportion of days covered (PDC) $\geq 80\%$. Among overall patients prescribed statins and with a LDL determination, 1% was with familial hypercholesterolemia, 28% with previous cardiovascular events, 21% with diabetes and 50% in primary prevention. Regardless their risk profile, the increasing of adherence was related to a higher achievement of LDL-target, with an increment of +53.2% among familial hypercholesterolemia, +43.1% in diabetes and +30% in previous cardiovascular events and primary prevention clusters while progressing from low (PDC<40%) to high (PDC $\geq 80\%$) levels of adherence. However, while in diabetes and primary prevention clusters 80% and 86% of adherent patients, respectively, had their cholesterol level under control, in the familial hypercholesterolemia and previous cardiovascular events clusters only 46% of adherent patients achieved the lipid target. The analysis showed adherence to be a key factor for cholesterol control. However, our findings underline a therapeutic need for patients that, although adherent, fail to achieve the lipid target, especially among patients with previous cardiovascular events (that have low level of LDL to achieve) and with familial hypercholesterolemia (that have high LDL basal level), suggesting therapeutic intensification should be applied.

REAL-WORLD ANALYSIS ON THE ECONOMIC VALUE OF REACHING LIPID TARGET IN ITALY

L. Degli Esposti¹, C. Borghi², M. Galvani³, E. Giacomini¹, P. Manotti⁴, A. Marra⁵, A. Passaro⁶, V. Perrone¹, F. Pieraccini⁷, D. Sangiorgi¹, A. Navazio⁸

¹CliCon Srl, Bologna; ²Medicine Department of Medical and Surgical Sciences University of Bologna; ³UOC Cardiologia Ospedale Morgagni-Pierantoni Forlì, AUSL Romagna, Forlì;

⁴Dipartimento Cure Primarie, AUSL di Reggio Emilia;

⁵U.O. Farmacia Ospedaliera Dipartimento Biotecnologie, Trasfusionale e di Laboratorio Azienda Ospedaliero Universitaria S. Anna, Ferrara; ⁶Azienda Ospedaliera-Universitaria S. Anna, Ferrara;

⁷Assistenza farmaceutica AUSL della Romagna, Forlì; ⁸U.O. Cardiologia Ospedaliera Presidio Ospedaliero ASMN Azienda USL di Reggio Emilia - IRCCS, Reggio Emilia

E-mail: valentina.perrone@clicon.it

The study aimed to evaluate the healthcare direct costs for Italian National Health System of patients treated with lipid-lowering drugs that do not achieve the low-density lipoprotein (LDL)-cholesterol target compared to those reaching their targets, and to analyze costs according to the distance from LDL target by using real-world data. An observational analysis was performed on administrative and laboratory data from selected Italian Healthcare Departments. Patients were included if they presented at least one laboratory LDL test between 2012 and 2019 and if they were prescribed lipid-lowering drugs during 6 months prior the last LDL detection (index date). Mean annual direct costs were evaluated in the 12 months before index date in terms of all drugs prescribed, all-cause hospitalizations and all outpatient services. Distance to LDL target was calculated as difference between the index LDL level and LDL target. Total mean annual healthcare direct cost for patients that did not reach LDL target was higher compared to total cost of patients achieving LDL target (€ 3,678 vs € 2,906). Costs were mainly driven by hospitalization (€ 1,330) followed by drugs (€ 1,012) and outpatient services (€ 563) expenditure. Mean total annual healthcare costs increased with the distance from LDL target, specifically from € 3,004 for patients with 10% distance from LDL target up to € 4,823 for those 50% or more distance from LDL target. This trend was particularly evident for the cost item related to hospitalization, that went from € 1,486 to € 2,819 moving from 10% to ≥ 50 distance from LDL target.

Results from this real-world study highlighted the higher economic burden for patients that do not reach the therapeutic LDL target, that tend to rise along with increasing distance from the LDL target. Overall, our findings could suggest that reducing the distance from LDL target could have a positive impact also on the economic outcomes for these patients.

THE MANAGEMENT OF CHOLESTEROL LEVEL CONTROL WITH LIPID-LOWERING DRUGS IN ITALIAN CLINICAL PRACTICE: FINDINGS FROM THE STREAM (SUPPORTING WITH THE REAL-WORLD EVIDENCE THE ASSESSMENT OF MEDICINES AND HEALTH TECHNOLOGIES) STUDY

L. Degli Esposti¹, C. Borghi², M. Galvani³, E. Giacomini¹, P. Manotti⁴, A. Marra⁵, A. Passaro⁶, V. Perrone¹, F. Pieraccini⁷, D. Sangiorgi¹, A. Navazio⁸

¹CliCon Srl, Bologna; ²Medicine Department of Medical and Surgical Sciences University of Bologna, Bologna;

³UOC Cardiologia Ospedale Morgagni-Pierantoni Forlì, AUSL Romagna, Forlì; ⁴Dipartimento Cure Primarie, AUSL di Reggio Emilia; ⁵U.O. Farmacia Ospedaliera Dipartimento Biotecnologie, Trasfusionale e di Laboratorio Azienda Ospedaliero Universitaria S. Anna, Ferrara; ⁶Azienda Ospedaliera-Universitaria S. Anna, Ferrara; ⁷Assistenza farmaceutica AUSL della Romagna, Forlì; ⁸U.O. Cardiologia Ospedaliera Presidio Ospedaliero ASMN Azienda USL di Reggio Emilia, IRCCS, Reggio Emilia
E-mail: valentina.perrone@clicon.it

The study aimed to evaluate the proportion of patients not reaching their low-density lipoprotein (LDL)-cholesterol target according to their risk profile in real-world settings of Italian clinical practice. This observational analysis was based on administrative and laboratory databases from a pool of Italian Entities covering around 10% of Italian population. All patients included had at least one laboratory LDL test between 2012 and 2019. Presence of lipid-lowering drugs was analyzed in the 6 months before index date (last LDL test detected), during which time adherence to these therapies was measured as proportion of days covered (PDC). Risk profile was assessed based on ESC guidelines (1). Among patients with LDL tests that received lipid-lowering drugs, 49.7% were deemed as very high-risk (VHR), 38.3% at high risk (HR), 12% with other risks (OR). Overall, 80% of patients did not reach their LDL-cholesterol target: 87.2% in the HR-cohort, 82.9% in the VHR-cohort (LDL level target 70 mg/dl and 55 mg/dl, respectively) and 49.6% in OR-cohort (LDL level target 116 mg/dl). Statin and ezetimibe combination was observed only in 6.5% of HR and OR and 10.3% of VHR patients, while patients were mainly in monotherapy with statins (87.5 VHR, 91.2% HR, 90.6% OR). Furthermore, patients adherent to treatment (PDC≥80%) accounted for the 52% of VHR-cohort, 47.2% of HR-cohort and 39.1% of OR-cohort. Our findings highlight the need to optimize the management of cholesterol control, especially among patients at risk. Despite the high proportion of patients not reaching LDL target, sub-optimal levels of adherence and a low use of combination regimens were observed, thus suggesting LDL-control could be supported by increasing adherence and/or the use of combination therapies and, if the target is not yet achieved, by the utilization of more recent therapies.

Reference

- European Heart Journal. 2020; 41, 111188.

DISCORDANT RESPONSE OF LDL-CHOLESTEROL AND LIPOPROTEIN(A) PLASMA LEVELS TO PCSK9I THERAPY IN A COHORT OF HYPERLP(A) PATIENTS: A SINGLE CENTRE EXPERIENCE

G. Petracca, E. Sani, L. Santi, D. Travia, M.G. Zenti

Division of Endocrinology, Diabetes and Metabolism, Department of Medicine, University and University Hospital of Verona

E-mail: grazianapetracca1@gmail.com

Background. Lipoprotein(a) (Lp(a)) is an independent risk factor for atherosclerotic cardiovascular disease. No effective therapies that target Lp(a) exist currently but some clinical-trials have shown that proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 inhibitors (PCSK9i) reduce Lp(a) levels by 25% to 30%, irrespective of baseline-levels.

Method. Monocentric observational cohort study aiming at evaluating the efficacy of PCSK9i-therapy in lowering Lp(a) and LDL-C plasma-levels in a real-world-setting.

Results. 145 patients (88 males, 57 females; median age: 65.6 years [interquartile range: 40-74]). All subjects were at very-high cardiovascular risk (CVR): 45% had Heterozygous familial hypercholesterolemia (HeFH), 65% coronary heart disease (CHD), 50% peripheral vascular disease (PWD), 19% diabetes mellitus (DM), 6% impaired fasting glucose (IFG) and 61% were statin-intolerant. Baseline mean LDL-C and median Lp(a) were 149±53 mg/dL and 36 mg/dL [17-88], respectively. LDL target (<55 mg/dL) was reached in 56% patients at 6 months, 56% at 12months, 54% at 24 months follow-up. Furthermore, LDL-C target was reached in 66.7% males vs 26.7% females ($p<0.001$), 60% patients with CHD vs 34% without CHD ($p<0.01$), 62% patients with PWD vs 41% without PWD ($p<0.036$). HyperLp(a), defined as Lp(a) >50 mg/dL, was observed in 57 patients: baseline median Lp(a) 89 mg/dL [62-129], with an increasing trend in the follow up: 88 mg/dL [70-129] at 6months, 114 mg/dL [77-267] at 12 months (+28%) and 133 mg/dL [80-333] at 24 months (+49%).

Conclusion. In our experience PCSK9i-therapy failed to reduce Lp(a) plasma level, indeed we observed a further increase in the follow-up. Awaiting the new drugs on the way, such as the anti-sense oligonucleotides against apolipoprotein(a), the first step is the personalization of the therapy for intensive management of all CVR factors (i.e. glucose-metabolism and blood pressure). In the meantime lipoprotein Apheresis, which is the golden standard treatment, should be considered.

LIPOPROTEIN(A) MASS LEVELS PREDICT HEPATIC FIBROSIS BUT NOT CARDIOVASCULAR OUTCOMES IN NONALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE PATIENTS

M. Ruscica¹, M. Meroni², M. Longo², R. Lombardi², E. Paolini¹, C. Macchii¹, A. Corsini¹, C. Sirtori¹, A.L. Fracanzani², P. Dongiovanni³

¹Università degli Studi di Milano; ²Fondazione IRCCS Cà Granda Ospedale Maggiore Policlinico; ³Fondazione IRCCS Cà Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milano
E-mail: massimiliano.ruscica@unimi.it

Background. Dyslipidemia and cardiovascular complications are comorbidities of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD), which ranges from simple steatosis to nonalcoholic steatohepatitis (NASH), fibrosis and cirrhosis. Although, genome wide association, epidemiological, and clinical studies have established Lp(a) levels as a causal risk factor for cardiovascular diseases, whether Lp(a) is causal in NAFLD patients remains to be clarified.

Methods. Circulating Lp(a) mass levels were assessed in 600 patients with biopsy-proven NAFLD. The association of Lp(a) with liver damage was explored by categorizing serum Lp(a) into quartiles. ROC curves were used to analyse the prediction of Lp(a) on CVD outcomes and hepatic fibrosis. Hepatic expression of LPA was evaluated by RNA-seq in 183 patients of whom Lp(a) dosage was available.

Results. In NAFLD patients, elevated Lp(a) levels were modestly associated with circulating lipids, carotid plaques and hypertension. Conversely, patients with low serum Lp(a) displayed insulin resistance ($p<0.05$), transaminases elevation ($p<0.05$) and increased risk to develop severe fibrosis ($p=0.007$) and cirrhosis ($p=0.002$). The diagnostic accuracy of Lp(a) to predict fibrosis increased by combining it with transaminases (AUC F4=0.87, $p<0.0001$). Hepatic LPA expression reflects serum Lp(a) levels ($p=0.018$), and both were reduced with the progression of NAFLD ($p=0.05$). Hepatic LPA mRNA levels correlate with those of genes involved in lipoprotein release, lipid synthesis and fibrogenesis ($p<0.05$). The TM6SF2 rs58542926, ApoE rs445925 and PCSK9 rs7552841 variants, known to affect circulating lipids, influence significantly serum Lp(a) mass levels.

Conclusions. Lp(a) mass levels predict hepatic fibrosis but not cardiovascular outcomes in patients with NAFLD.

LIRAGLUTIDE FOR WEIGHT MANAGEMENT IN A REAL-WORLD SETTING: EXPERIENCE FROM A SINGLE OBESITY CENTER

E. Sani, G. Petracca, L. Santi, G. Da Prato, M.G. Zenti
Division of Endocrinology, Diabetes and Metabolism, Department of Medicine, University and University Hospital of Verona
E-mail: elenasani@live.it

Purpose. Several randomized controlled clinical trials have shown that the use of Liraglutide, in combination with diet and exercise, leads to a significant weight loss and improvement of blood pressure and metabolic profile. This retrospective study aimed at evaluating the effectiveness of Liraglutide therapy in a real-world setting.

Methods. A cohort of 58 patients (46 females, 12 males), mean \pm DS age 47.1 ± 11.7 years, referring to our Obesity Center, all obese or overweight with weight-related comorbidities, started Liraglutide therapy from May 2016 to January 2021. 39/58 (67.2%) patients reached the maximum dose of 3 mg. At 3 months 43/58 (74.1%) patients continued therapy, at 6 months 26/58 (44.8%), at 12 months 11/58 (19%).

Results. The mean weight loss at 3 months was -5.8 kg (-5.6%), at 6 months -7.5 kg (-7.4%), at 12 months -10.0 kg (-8.9%). The proportion of patients achieving 5-10% weight loss was 20.7% at 3 months, 10.3% at 6 months, while the proportion achieving $\geq 10\%$ weight loss was 13.8% at 3 months, 15.5% at 6 months, 10.3% at 12 months. We observed a significant weight loss at 3, 6 and 12 months. There was also a significant reduction of systolic blood pressure and HbA1c at 3 and 6 months, while total cholesterol and LDL-cholesterol significantly declined only at 3 months. The majority of patients (37.9%) discontinued treatment for economic concerns. The overall incidence of adverse events was 46.6% (27/58) and the most reported was nausea or vomiting.

Conclusion. In a real-world setting, Liraglutide therapy was associated with a clinical meaningful weight loss at 3, 6 and 12 months, with also a significant improvement in systolic blood pressure and metabolic profile in the short term, which may contribute to the reduction of cardiovascular risk. Economic concerns still represent an important barrier for access to therapy.

NON-HDL CHOLESTEROL AND APOLIPOPROTEIN B IN A HYPERTENSIVE POPULATION: ROLE OF ADIPOSITY AND INSULIN RESISTANCE

R. Sarzani^{1,2}, F. Giulietti^{1,2}, S. Biondini², E. Fausti², M. Allevi², F. Spannella^{1,2}

¹Internal Medicine and Geriatrics, IRCCS INRCA, Ancona;

²Department of Clinical and Molecular Sciences, University "Politecnica delle Marche", Ancona

E-mail: r.sarzani@univpm.it

Introduction. Non-HDL cholesterol (non-HDLC) and apolipoprotein B (ApoB) indirectly measure all atherogenic or potentially atherogenic circulating lipoproteins. In patients with essential hypertension, atherogenic dyslipidemia and insulin resistance (IR) due to overweight/obesity are highly prevalent.

Aim. Evaluate how adiposity and IR affect non-HDLC and ApoB levels in essential hypertensive patients.

Methods. We performed a cross-sectional study on 272 consecutive patients referred to our Hypertension Centre and not taking lipid-lowering drugs. Body mass index (BMI) and waist circumference (WC), measured to the nearest 0.1 cm at the midpoint between the lowest rib and the iliac crest, were used to assess adiposity. IR was evaluated with HOMA-IR index, calculated according to the formula: HOMA-IR = [glucose] (mmol/l) × [insulin] (μU/ml)/22.5.

Results. Mean age: 50.2±14.5 years; male prevalence: 65.1%; mean BMI: 27.9±4.8 kg/m²; mean WC: 99.1±13.1 cm; mean Non-HDLC: 156.2±48.6 mg/dl; mean ApoB100: 113.8±36.4 mg/dl; median HOMA-IR index: 2.4 (1.7-4.0). The prevalence of overweight/obesity and IR was 76.0% and 48.6%, respectively. We found a fair correlation between non-HDLC and ApoB ($r=0.588$; $p<0.001$). Overweight/obese patients showed higher prevalence of IR (57.4% of overweight/obese). We found no linear association of both BMI and WC neither with ApoB nor with non-HDLC (all $p>0.05$), while a negative correlation was found with HDLC ($r=-0.295$; $p<0.001$ for BMI and $r=-0.224$; $p=0.009$ for WC) and a positive correlation with triglycerides ($r=0.222$; $p=0.004$ for BMI). A significant correlation emerged between HOMA-IR index and ApoB100 ($r=0.280$; $p=0.016$), independently of BMI.

Conclusion. In our study, the excess adiposity is directly linked to HDLC and triglycerides, while IR is directly linked to ApoB levels. Although there is a close association between IR and obesity, not all overweight/obese patients had IR, IR that probably plays a major role in atherogenic lipoprotein levels than just obesity.

RECLASSIFICATION OF CARDIOVASCULAR RISK ACCORDING TO SCORE2 AND PREVALENCE OF TARGET LDL-CHOLESTEROL RECALCULATED WITH MORE RECENT EQUATIONS IN A LARGE HYPERTENSIVE POPULATION

F. Spannella^{1,2}, F. Giulietti¹, M. Allevi², P. Turri², S. Sarnari², S. Re², R. Sarzani^{1,2}

¹Internal Medicine and Geriatrics, IRCCS INRCA, Ancona;

²Department of Clinical and Molecular Sciences, University "Politecnica delle Marche", Ancona

E-mail: r.sarzani@univpm.it

Introduction. Until recently, SCORE was the most commonly used model for cardiovascular risk (CVR) assessment and Friedewald was the most widely used formula to calculate low-density lipoprotein cholesterol (LDLc) in clinical practice. Recently, an updated CVR model (SCORE2) and several apparently more accurate equations have been proposed and validated.

Aim. Evaluate the impact of both SCORE2 on CVR stratification and of new formulas on prevalence of LDLc control in a wide hypertensive population.

Methods. Cross-sectional study on 1192 consecutive hypertensive outpatients. LDLc was calculated using the Friedewald formula (F), the modified Friedewald formula proposed by Martin SS. (M) and the equation proposed by Sampson M. (S). SCORE and SCORE2 have been used for individual CVR stratification. LDLc control was defined according to the 2019 ESC/EAS Dyslipidemia Guidelines.

Results. Mean age: 56.5±13.7 years. Mean LDLc calculated using the three formulas: 122.8±35.1 mg/dl (F), 124.4±34.1 mg/dl (M) and 125.4±35.1 mg/dl (S), respectively. The three LDLc equations showed high correlations ($r=0.99$, $p<0.001$ for all the three comparisons). According to SCORE2, there is a significant re-classification of the individual CVR ($p<0.001$). The 57.6% and the 4.5% of patients with low-moderate risk at SCORE moved to high risk and very high risk according to SCORE2, respectively, while the 4.0% and the 47.6% of patients with high risk according to SCORE moved to low-moderate risk and very high risk according to SCORE2, respectively. All patients with very high risk at SCORE (27.3% of all the studied population) was confirmed at SCORE2. Within patients at target for LDLc according to SCORE and F, the 39.3% and the 41.1% was not at target according to SCORE2 and S or M, respectively (all $p<0.001$).

Conclusion. We found non-negligible differences in CVR reclassification and LDLc control in our hypertensive population, after the application of SCORE2 and new LDLc equations. Our findings show how the application of these new tools may significantly affect the management of dyslipidemia and therefore the CV prevention in clinical practice.

COVID-19 SWAB COLLECTION AND SEROLOGICAL SCREENING IN LIPOPROTEIN ApherESIS UNIT

F. Sbrana¹, B. Dal Pino², F. Bigazzi², M. Pianelli², R. Luciani², A. Ripoli², T. Sampietro²

¹Fondazione Toscana "Gabriele Monasterio";

²Fondazione Toscana "Gabriele Monasterio"

E-mail: francesco.sbrana@ftgm.it

Background. Assessing evolution of SARS-CoV-2 immune response among patients receiving therapeutic apheresis can define its durability in a highly clinically relevant context because these patients share the characteristics of persons most susceptible to SARS-CoV-2 infection. In our Lipoprotein Apheresis (LA) Center 36 subjects (mean age 64±10 years; male 25/36) are currently being treated for inherited dyslipidemias; more than 500 treatment/year are performed.

Methods. To protect patients and healthcare team against the COVID-19 outbreak, a dedicated protocol was applied:

- 1) telephone call performed two days before LA treatment, in order to identify clinical symptoms relate to COVID-19 disease;
- 2) real-time PCR assays for SARS-CoV-2 on upper respiratory specimens collected the day before LA;
- 3) body temperature check when the patient arrives at the entrance of the facility;
- 4) all patients undergoing LA are wearing surgical mask and maintaining a social distanced of 1.8 meters (including bed space);
- 5) serological testing (Coronavirus Disease 2019 Antibody Combined Test Kit - Medical Systems Biotechnology®) is periodically done.

Results. In 14th months 5 patients out of 36 on treatment (14%) had SARS-CoV-2 infection: one patient required intensive care unit admission, 3 had mild symptoms and the last one had asymptomatic infection. The serological tests performed monthly before LA treatment and at least 21 days after positive results on RT-PCR, revealed that, after a peak (2 months after infection), there was a continuous decline in the median value with a response that persisted for at least 6 months (IgG Receptor Binding Domain: 1st month 4.16±1.02-7th month 0.85±0.33; R2 0.9246; IgG index value ≥1.4).

Conclusion. Our data show that the protocol in use was effective in containing COVID-19 outbreak in patients receiving LA and that serological trend in patients with COVID-19 infection is in line with other clinical settings. We are further implementing our protocol dosing Ig response to the spike protein antigen after vaccination.

OPTIC NERVE HEAD BLOOD FLOW ACUTELY INCREASES UPON CHOLESTEROL REMOVAL. THE EYES MIRROR OF THE HEART?

T. Sampietro¹, B. Dal Pino¹, F. Bigazzi¹, F. Sbrana¹, A. Ripoli¹, E. Fontanelli², M. Pianelli¹, R. Luciani¹, A. Lepri², G. Calzetti³

¹Fondazione Toscana "Gabriele Monasterio";

²Università di Pisa; ³Università di Parma

E-mail: francesco.sbrana@ftgm.it

Background. Lipoprotein apheresis (LA) acutely increases coronary microcirculation blood flow (BF) measured with different techniques, most of which are time-consuming, costly and invasive. The ocular vasculature may be assumed as an easily accessible window to systemic microcirculation. Recent advances in imaging techniques enable to quantify ocular microcirculation BF in a quick and non-invasive manner, which represents a wonderful opportunity to study the short-term changes in optic nerve head (ONH) BF after LA in inherited hypercholesterolemia (IH).

Methods and Results. The study was performed at Italian Reference Centre for inherited dyslipidemias of Tuscany and included 22 patients with IH, the same cohort that was previously studied for coronary microcirculation. Laser Speckle Flowgraphy (LSFG) was used to measure rest ONH BF before and after lipoprotein removal by LA. Main outcomes were:

- 1) tissue average BF (referred to as 'Mean Tissue', MT);
- 2) arteriolar/venular average BF (referred to as 'Mean Vessel', MV).

Eyes were statistically clustered in two groups based on pre-LA ONH blood flow values. After each LA treatment, parallel to the reduction of plasma lipids, all ONH microcirculatory parameters significantly increased, more significantly in eyes with lower pre-apheresis ONH BF values (MT +7.0%, p<0.005; MV +7.2%, p<0.05).

Conclusions. A single LA session resulted in a statistically significant increase in short-term ONH BF rest. These findings, evaluated together with previous coronary microcirculation data, suggest a similar ocular and coronary BF response to LA. Ocular microcirculation BF might represent a versatile biomarker to evaluate microcirculatory system health, including coronary microcirculation. It is therefore plausible that plasma lipoproteins levels may influence ONH BF.

IS TREATING SEVERE HE FH SO EASY? A COMBINED TREATMENT BETWEEN LIPOPROTEIN APHERESIS AND PCSK9 INHIBITORS

B. Dal Pino, F. Sbrana, F. Bigazzi, T. Sampietro
Fondazione Toscana "Gabriele Monasterio"
 E-mail: francesco.sbrana@ftgm.it

Background. Despite advance in pharmacotherapy of lipid disorders, many heterozygous Familial Hypercholesterolemia patients do not achieve a desirable lipid target to significantly reduce the risk of atherosclerotic cardiovascular disease. The aim of the present work is to evaluate the interaction between Lipoprotein apheresis (LA) and PCSK9i in a small FH cohort in which the guidelines therapeutic target is not achieved.

Methods. We evaluate 14 patients (mean age 66±9 years, male 71%) with HeFH and ischemic heart disease (IHD) on maximally tolerated lipid lowering therapy and chronic LA. Pre-LA lipid values plus PCSK9i administered immediately after LA (PCSK9i-0) or 7 days later LA (PCSK9i-7) were compared.

Results. The PCSK9i administration 7 days after the LA, counteracting the LA lipid rebound effect, allowed to achieve the pre-LA lipid values at a significantly longer time interval (LDL cholesterol: PCSK9i-0 102±35 mg/dl vs. PCSK9i-7 103±50 mg/dl, p=0.474; mean LDL cholesterol: PCSK9i-0 71±28 mg/dl vs. PCSK9i-7 71±40 mg/dl, p=0.985; median inter-LA interval: PCSK9i-0 14 [14-15] days vs. PCSK9i-721 [14-28] days, p= 0.025). By PCSK9i and LA therapy combination, as here reported, we obtain LDL-cholesterol reduction higher than 50% when comparing with lipid levels without the injection therapy. During one year, together with a complete adherence to PCSK9i therapy, we recorded a mean reduction by 3 LA-treatment per patient.

Conclusion. This therapeutic approach suggests:

- 1) the possibility of increasing the number of patients treated with LA;
- 2) the improvement of patient quality of life;
- 3) the costs reduction for the single patient-treatment.

ACUTE CORONARY SYNDROME AND LIPID-LOWERING THERAPY IN A REALISTIC DIAGNOSTIC- THERAPEUTIC CARE PATHWAY

T. Sampietro, B. Dal Pino, F. Sbrana, F. Bigazzi,
 C. Palmieri, S. Berti
Fondazione Toscana "Gabriele Monasterio"
 E-mail: francesco.sbrana@ftgm.it

Background. Optimal use of lipid-lowering therapy (LLT) after acute coronary syndromes need to be intensified. Fondazione Toscana Gabriele Monasterio (FTGM) is a cardiopulmonary tertiary-level Institute, with cath-lab hub for acute coronary syndrome, adult and pediatric cardiac surgery center, referral facility for heart failure, primitive pulmonary hypertension patients and reference center for inherited dyslipidemias, rare lipid disorders with lipoprotein apheresis unit.

Study design. To optimize the LLT, in FTGM, we developed a diagnostic-therapeutic care pathway (DTCP) for subjects admitted with acute coronary syndrome because:

- 1) inherited atherogenic dyslipidemias have an expected prevalence up to 75% among coronary patients under 65 years of age and are usually unrecognized;
- 2) in the POSTER study on Italian patients with a recent coronary artery event, heterozygous familial hypercholesterolemia has about 5.1% prevalence, which indicates the need of early identification to improve their cardiovascular risk management;
- 3) plasma levels of Lp(a) are definite risk factor for atherosclerotic cardiovascular disease and their measurement, in the cascade screening of familial hypercholesterolemia, are strongly recommended;
- 4) statin-associated muscle symptoms are a major determinant of poor treatment adherence and/or statin discontinuation.

The DTCP in inherited dyslipidemias involves dialogue between the cardiologist who manages acute coronary syndrome and the lipidologist, in order to assess the correct diagnosis, to initiate the cascade screening, to proceed with the best LLT and to perform patient's personalized follow-up.

Conclusion. DTCP have a pivotal role to improve the LLT effectiveness; the first cardiovascular event must signal the opportunity to start a personalized LLT and an unmissable opportunity to activate the cascade testing for studied case and relatives.

DIRECT AND INDIRECT EFFECT OF SARS-COV-2 PANDEMIC IN SUBJECTS WITH FAMILIAL HYPERCHOLESTEROLEMIA: A SINGLE LIPID CENTER REAL WORLD EVALUATION

R. Scicali¹, V. Ferrara², M.G. Farina³, S. Conti³, S. Piro³, F. Purrello³, A. Di Pino³

¹U.O.C. Geriatria - ARNAS Garibaldi Catania;

²U.O.C. Medicina Interna, Azienda Ospedaliera Policlinico Catania; ³UOC Medicina Interna, ARNAS Garibaldi, Catania
E-mail: robertoscicali@gmail.com

Background and Aims. The clinical manifestations of SARS-CoV-2 infection broadly differ among the affected subjects; about half of the infected subjects remain asymptomatic, the majority of the symptomatic subjects experience influenza-like symptoms and 10-15% of these develop a severe disease (COVID-19) characterized by a widely clinical scenario from pneumonia to acute respiratory distress syndrome (ARDS) and disseminated intravascular coagulation. Over the respiratory tract, COVID-19 could also affect the cardiovascular system. Beyond the reported direct damage of SARS-CoV-2 infection, an increasing attention has been focused on the indirect effects of SARS-CoV-2 pandemic due to the healthcare public system restructuring. In this context, the reduced cardiovascular screening may be deleterious in subjects at high cardiovascular risk such as familial hypercholesterolemia (FH). In this study we evaluated the direct and indirect effects of SARS-CoV-2 pandemic in a cohort of FH subjects.

Methods. This was a retrospective observational study involving patients aged over 18 years with a genetically confirmed FH diagnosis and enrolled from the Lipid Centre University Hospital of Catania, Italy from 4th June 2021 to 9th August 2021. All participants obtained a telephone survey concerning their lipid profile values [total cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol (HDL), triglycerides (TG), LDL-C], lipidologist and cardiologist visits, carotid and femoral ultrasound evaluation and lipid lowering therapy adherence in the 12 months before and after the Italian lockdown (9th March - 3rd June 2020); moreover, all participants confirmed or not the SARS-CoV-2 infection from 9th March 2020 to the 12 months after the end of Italian lockdown (3rd June 2020).

Results. The percentage of FH subjects who analyzed the lipid profile was lower after COVID lockdown (56.5% vs 100.0%, p<0.01); moreover, FH subjects had a significant reduction of HDL cholesterol (47.78±10.12 vs 53.2±10.38 mg/dL, p<0.05) and increasing of Non HDL cholesterol (117.24±18.83 vs 133.09±19.01 mg/dL, p<0.05); finally, a reduced percentage of FH subjects reached the recommended LDL cholesterol target after COVID-19 lockdown (31.2% vs 40.4%, p=0.09). Of note, a reduction of lipid lowering therapy adherence was observed after COVID-19 lockdown (85.4% vs 95.4%, p=0.08). Moreover, it was observed a reduced percentage of FH subjects who performed lipidologist, cardiologist and vascular imaging follow-up after lockdown (for lipidologist follow-up 33.5% vs 100.0%, p<0.001; for cardiologist follow-up 22.3% vs 60.8%, p<0.01; for vascular imaging follow-up 19.6% vs 100.0%, p<0.001). The most frequent reason of the reduced health care follow-up was the COVID contagion fear. Finally, the percentage of FH subjects who was affected by SARS-CoV-2 was 7.3%; of these, the majority were in secondary prevention and didn't reach the recommended LDL cholesterol target and none of FH subjects was hospitalized.

Conclusion. In our retrospective study, the indirect effects of SARS-CoV-2 pandemic was deleterious in a cohort of subjects at high cardiovascular risk as FH.

UNCOMMON PRESENTATION OF CHOLESTERYL ESTER STORAGE DISEASE (CESD): DESCRIPTION OF A CASE AND GENETIC CHARACTERIZATION BY NEXT GENERATION SEQUENCING

C. Scrimali¹, F. Brucato¹, M. Caserta², M. Gueli Alletti¹, C. Castana², R. Spina¹, V. Ingrassia¹, G.I. Altieri¹, F. Fayer¹, D. Noto¹, G. Misiano¹, A. Giannamico¹, C.M. Barbagallo¹, A. Ganci¹, M. Piccione³, A.B. Cefalù¹, M.R. Averna¹

¹Dipartimento di Promozione della Salute, Materno-Infantile, di Medicina Interna e Specialistica di Eccellenza "G. D'Alessandro" (PROMISE), Università degli Studi di Palermo;

²Pediatric Clinic, ARNAS Civico Di Cristina Benfratelli, Palermo;

³Regional Reference Center for the Control and Treatment of Down Syndrome and Other Chromosomal and Genetic Diseases, Medical Genetics University of Palermo, Villa Sofia/Cervello-United Hospitals, Palermo

E-mail: chiara.scrimali@libero.it

Introduction. The LIPA gene located on chromosome 10 encodes the lysosomal acidic lipase (LAL), an enzyme which hydrolyzes cholesterol esters (CE) and triglycerides (TG). Cholestrylo Ester Storage Disease (CESD) is a rare recessive disease caused by mutations in LIPA gene which result in residual LAL activity. Complete LAL deficiency is associated with a more severe form of disease known as Wolman's disease. Hyperlipidemia and liver steatosis are common clinical features of CESD.

Materials and Methods. The proband, a 2 years old child, was evaluated for microcephaly. Routine laboratory data showed total high cholesterol levels (243 mg/dL) and triglycerides (272 mg/dL). Next generation sequencing was carried out on an Ion Genestudio S5 Plus System using the Ion 540 Chip. We designed a custom panel to analyze 50 candidate genes related to LDL, HDL e triglycerides metabolism.

Results and Conclusions. No pathogenic mutations were identified in the major candidate genes for familial hypercholesterolemia and hypertriglyceridemia. However, the proband was found to be carrier of two mutations in LIPA gene (c.883C>T -p.His295Tyr and c.929G>A - p.Trp310Ter). This result prompted to the assay of LAL activity by Dried Blood Spot Analysis. LAL activity was <5% of the normal range. The His295Tyr variant is an already known pathogenic missense mutation associated with CESD, while the Trp310Ter variant has been previously identified in homozygosity in two newborns of Sicilian origin with Wolman's disease. The family cascade screening revealed the presence of His295Tyr mutation in the proband's father and the Trp310Ter in the proband's mother. We report a case of CESD with uncommon clinical presentation features compound heterozygous for two mutations in LIPA gene.

SERUM ENDOCAN LEVELS IN PATIENTS WITH COVID-19

D. Sinicropi¹, F. Spadaro¹, M.S. Franzè¹, M. Marino¹, G. Caliò², G. Nunnari³, A. David², G. Squadrito¹, G. Mandraffino¹

¹Department of Clinical and Experimental Medicine Internal Medicine Unit, University of Messina; ²Department of Clinical and Experimental Medicine Intensive Care Unit, University of Messina; ³Department of Clinical and Experimental Medicine Infectious Disease Unit, University of Messina

E-mail: sinicropidavide@gmail.com

COVID-19 pandemic due to the novel SARS-CoV-2 coronavirus caused -and is still causing- a high number of deaths worldwide. The clinical course of COVID is very heterogeneous and unpredictable, ranging from mild and self-limiting disease, up to more severe forms characterized by acute respiratory distress syndrome (ARDS), pulmonary embolism, multi-organ failure and death. The more severe course of the disease seems to be supported by an inappropriate inflammatory response, resulting of a direct and indirect pathogenic effect that SARS-CoV-2 exerts on endothelial cells, with consequent dysfunctional activation in a pro-thrombotic way. Under these lights, to identify a biochemical profile associated to the higher risk of evolution towards the most severe forms could be of help to recognize early the patients needing higher intensity of care. Endocan is a molecule recently acknowledged as a potential immune-inflammatory marker associated with cardiovascular events. Higher levels of endocan have been reported in some inflammatory diseases with endothelial involvement, suggesting its possible role as a marker of endothelial dysfunction. In this work we evaluated endocan serum levels in two small groups of patients with COVID-19, admitted to a standard care ward and ICU, looking for any difference and the potential correlations between endocan levels with the other variables (including medical therapy, laboratory tests and the need for oxygen therapy). The results seem to confirm a significant correlation between endocan serum levels and the need for intensive care in patients hospitalized for COVID-19.

ACHIEVING THERAPEUTIC GOAL ON LDL IN HIGH AND VERY HIGH RISK PATIENTS IN A DEDICATED OUTPATIENT CLINIC

B. Napolitano¹, A. Maretta², V. Spagnuolo³

¹Internship Student Internal Medicine, A.O. Cosenza;

²Institute of Pharmacy, University of Catanzaro, Catanzaro;

³Lipid Center Cosenza, A.O. Cosenza

E-mail: vitalianos@yahoo.com

Background. High LDL cholesterol levels represent an important risk factor for development of cardiovascular disease. Reduction of LDL reduces cardiovascular risk. Current guidelines (ESC 2019) recommend ambitious LDL levels for high and very high risk patients. But, in clinical practice, just a part of these patients achieve the ESC 2019 goals (DA VINCI Study).

Patients and Methods. We wanted to evaluate, in the first 105 patients, at high and very high cardiovascular risk, consecutively afferent to our dedicated clinic for hyperlipidaemia (Lipid Center CS), the achievement of the therapeutic goal of LDL according to ESC 2019 guidelines. All patients were on lipid-lowering drug treatment from at least twelve months and the last blood tests were no less recent than three months.

Results. Of all patients, 61 were female. The mean age was 64.49 ± 10.22 years. Twenty patients were in secondary prevention. Of all patients, 77% reached the therapeutic goal (65% with very high risk and 84% with high risk). 71% were taking high-intensity lipid-lowering therapy. 43% were taking combination therapy. 35% were treated with PCSK1 inhibitors.

Discussion. Taking note of the limited number of the sample, our therapeutic results achieved are higher than that achieved in the DA VINCI study in which only 60% of patients from west Europe reached the therapeutic goal. A dedicated clinic for hyperlipidaemia and the high use of combination therapy with intensive drugs and extensive use of PCSK1 inhibitors may justify the results of our study. Our center did not participate in the DA VINCI study.

FIXED COMBINATION OF MONACOLIN K AND OCTACOSANOL REDUCE LDL LEVELS IN MODERATE CARDIOVASCULAR RISK PATIENTS AND UNWILLING TO STATINS

B. Napolitano¹, A. Maretta², V. Spagnuolo³

¹Internship Student Internal Medicine, A.O. Cosenza;

²Institute of Pharmacy, University of Catanzaro;

³Lipid Center Cosenza, A.O. Cosenza

E-mail: vitalianos@yahoo.com

Background. Monacolin k is a bioactive element of fermented red rice which acts with a mechanism of inhibition of HMG-CoA reductase reducing LDL values (~ 20%). Octacosanol is an aliphatic alcohol that has a synergistic action with monacolin K inhibiting synthesis of HMG-CoA reductase. The combined use may be effective in reducing LDL values in subjects unwilling to statin therapy.

Patients and methods:

We wanted to evaluate efficacy in reducing LDL values in 25 hypercholesterolemic patients, with moderate cardiovascular risk (SCORE > 1% < 5% at 10 years), unwilling to statin therapy, who received monacolin K at 10 mg with octacosanol 12 mg once daily for six weeks.

In Table I are reported initial mean values of the 25 patients.

Table I	Age (years)	Body mass index (kg/m ²)	LDL (mg/dl)
All (25)	61.5±9.5	26.5±2.12	125.8±29.9
Females (16)	63.7±9.7	23.3±3.1	116.9±29.8
Males (9)	56.2±7.4	26.5±2.1	147.2±17.9

Results

Table II shows the mean values after six weeks of therapy with monacolin 10 mg and octacosanol 12 mg in fixed combination.

Table II	Body mass index (kg/m ²)	LDL (mg/dl)
All (25)	26.5±2.12	95.2±29.8
Females (16)	23±3.3	92.25±32.4
Males (9)	26.5±2.1	102.4±23.9

Discussion. After six weeks of therapy, the mean reduction in LDL was 24% (females 21.13%; males 30.44%). This reduction is higher respect this reduction is greater than that reported in the literature with monacolin K alone.

Despite the limited number of patients evaluated, the good result on the reduction of LDL values supports the combined use of monacolin 10 mg and octacosanol 12 mg in patients at moderate cardiovascular risk and not compliant with statins therapy.

FAMILIAL HYPERCHOLESTEROLEMIA GENETIC CHARACTERIZATION: WHAT ELSE BEYOND LDLR?

E. Sticchi¹, A. Kura², R. De Cario², G. Barbieri², A. Magi³, S. Suraci², A.M. Gori¹, F. Cesari⁴, G.M. Scaturro⁵, E. Lotti¹, R. Marcucci¹, B. Giusti¹

¹University of Florence, Department of Experimental and Clinical Medicine, Atherothrombotic Diseases Center, Careggi Hospital, Florence; ²University of Florence, Department of Experimental and Clinical Medicine, Florence; ³University of Florence, Department of Information Engineering, Florence;

⁴Atherothrombotic Diseases Center, Careggi Hospital, Florence;

⁵Metabolic Disease Unit, AOU Meyer

E-mail: elenasticchi@hotmail.com

Background. As many subjects (about 60%) with Familial Hypercholesterolemia(FH) did not demonstrate functional mutations in FH major candidate genes (LDLR, APOB, PCSK9, LDLRAP1), we genetically characterized FH patients through targeted high-throughput sequencing (HTS).

Method. We analysed 79 patients with clinically possible/probable/definite FH according to Dutch Lipid Score. Targeted HTS (57 genes including those involved in lipid metabolism, supposed to be involved in dyslipidemia, pharmacogenetics of statins, related to FH polygenic forms, HDL and triglycerides related diseases) was assessed by Illumina technology.

Results. Among 79 patients, 35 carried a rare variant in LDLR gene, whereas 44 were LDLR-negative. Talmud score evaluation (Talmud 2013) in both groups showed a higher mean value in patients without LDLR mutations, with respect to LDLR-positive (0.977±0.203 vs 0.937±0.184). HTS analysis revealed that 8 LDLR mutation-positive patients also carried likely pathogenetic/uncertain significance mutations in APOB or LDLRAP1 genes. In patients without LDLR mutations, at least 2 rare variants were identified in 20 patients (46%), and at least 3 rare variants were identified in 14 patients (32%). In these patients, 82 rare variants with uncertain significance/conflicting interpretation of pathogenicity were identified in 34 different genes (APOB, PCSK9, LDLRAP1, ABCB1, ABCG2, ABCG5, ABCG8, ANGPTL3, APOA4, CELSR2, CETP, CREB3L3, DAB2, GCKR, GHR, HFE, ITIH4, LCAT, LIPC, LIPI, LMF1, LPA, LPL, LRP1, MTTP, NPC1, NYNRIN, PON1, PPP1R17, SCARB1, SLC12A4, SREBF1 SREBF2). Patients with or without pathogenetic mutations in LDLR gene were comparable for age, sex, and LDL cholesterol levels, whereas Dutch score was significantly higher in LDLR mutation positive patients.

Conclusions. The present study suggest the possible contribution of multiple loci, beyond LDLR gene, in influencing lipid profile alterations and cardiovascular risk. Further expansion of present data might allow a better comprehension of major/modifier genes role, as well as of accumulation of common small-effect LDL-C raising alleles in determining LDL-C levels and cardiovascular events.

ROLE OF THE ASIALOGLYCOPROTEIN RECEPTOR 1 ON LIPOPROTEIN METABOLISM AND ATHEROSCLEROSIS

M. Svecla¹, A. Moregola¹, P. Ubaldi¹, L. Da Dalt¹, F. Bonacina¹, A.L. Catapano², G.D. Norata³

¹Department of Pharmacological and Biomolecular Sciences, University of Milan; ²Department of Pharmacological and Biomolecular Sciences, University of Milan; ²IRCCS Multimedica Hospital, Sesto San Giovanni (MI); ³Department of Pharmacological and Biomolecular Sciences, University of Milan;
³Centro SISA, Ospedale Bassini, Cinisello Balsamo (MI)

E-mail: monika.svecla@unimi.it

Background. The hepatic asialoglycoprotein receptor 1 (ASGR1) is involved in the removal from circulation of several desialylated glycoproteins including vitamin B12, alkaline phosphatase, low-density lipoproteins (LDL), chylomicron remnants, fibronectin, IgA but also platelets, apoptotic cells. Loss of function in ASGR1 results in lower levels of plasma non-HDL-cholesterol compared to non-carriers and a 34% reduction in the risk of coronary artery disease.

Aim. To investigate the molecular mechanism of ASGR1 in controlling lipoprotein catabolism and liver metabolism under hypercholesterolemic conditions.

Methods. Fast protein liquid chromatography (FPLC) was performed in the plasma of LDL-R/- and ASGR1-/-/LDL-R/- mice, fed in western type diet (WTD) for 16 weeks, and shotgun proteomics using orbitrap Fusion™ Tribrid™ Mass Spectrometer was performed in the liver of LDL-R/- and ASGR1-/-/LDL-R/- mice followed by protein inference, label-free quantification, and pathway enrichment analysis.

Results. Plasma cholesterol was reduced in ASGR1-/-/LDL-R/- compared with LDL-R/- (p-value=0.03). When the analysis was focused on enzymes for N-glycosylation cascade in the liver, Ddost, which controls glycans transfer from Dolichol-P-P to asparagine in ER, was down-regulated (p<0.001) while glucosidases (Ganab, Prkcsf) which favor proper protein folding in concert with the lectin chaperon Calnexin/Calreticulin and ERp57 were downregulated. In parallel ERGIC-53 that operates the transport of glycoproteins from ER to Golgi was significantly down-regulated while Derlin-1 (p-value<0.01) which increases during unfolding proteins response was up-regulated. These data suggest that reduced production of glycosylated proteins occurs during atherosclerosis coupled with a reduction in transporting proteins from ER to Golgi.

Conclusion. Our data suggest that an alteration in protein N-glycosylation takes place within the liver of WTD fed LDL-R vs ASGR1/LDL-R KO mice. This can further affect the synthesis of apolipoproteins secreted in plasma.

PLASMA AND CEREBROSPINAL FLUID LIPID PROFILE AND LIPOPROTEINS CHARACTERIZATION IN ALZHEIMER'S DISEASE

M. Turri¹, C. Pavanello¹, E. Conti², F. Gastoldi¹, L. Tremolizzo³, L. Calabresi¹

¹Centro E. Grossi Paoletti, Department of Pharmacological and Biomolecular Sciences, University of Milano;

²Lab of Neurobiology, School of Medicine and Surgery and Milan Center of Neuroscience, University of Milano-Bicocca, Monza;

³Neurology Unit, San Gerardo Hospital, ASST Monza

E-mail: marta.turri@unimi.it

Aim. The inverse association between the risk of developing Alzheimer's disease (AD) and plasma HDL-C levels has been demonstrated in different epidemiological studies. The mechanism by which plasma HDL could influence the pathogenesis and progression of AD is still unsolved. It has been suggested a direct involvement of plasma HDL on brain cholesterol homeostasis, related to the ability of specific HDL subclasses to cross the blood-brain barrier. Despite the consistent knowledge of the relation with plasma HDL-C levels, a qualitative analysis of plasma and brain HDL is still lacking. In this study HDL subclasses have been characterized in plasma and cerebrospinal fluid (CSF) of AD patients.

Materials and Methods. 42 AD patients (19M/23F, 75±7 y.o.) and 17 non-AD demented (8M/9F, 69±8 y.o.) were recruited at the memory clinics of the San Gerardo hospital and 5 cognitively-intact control subjects (3M/2F, 70±8 y.o.) were recruited from patients undergoing knee replacement surgery. Blood and CSF samples have been collected and plasma separated by low-speed centrifugation at 4°C. A complete plasma lipid-lipoprotein profile was determined using a Roche Integra c311 analyzer. CSF total cholesterol (TC) and unesterified cholesterol (UC) content have been measured by HPLC. ApoE and apoA-I in CSF were determined by SDS-page electrophoresis, PL content by commercial fluorometric assay kit. HDL subclasses have been characterized in plasma and CSF by non-denaturing two-dimensional (2D)-electrophoresis, followed by immunodetection with polyclonal antibodies against human apoE, apoA-I and apoA-II.

Results. Plasma UC/TC ratio of AD patients (0.19±0.08) is similar to controls (0.20±0.03), but UC/TC in AD CSF (0.45±0.13) is higher than controls (0.40±0.12), suggesting a defect in esterification process in CSF of AD patients. Plasma HDL subclass distribution in AD patients is similar to that of healthy controls. Three different classes of apoA-I-containing HDL are detected; they comprise small pre-β HDL, and α-migrating HDL2 and HDL3. Curiously, CSF apoE-containing lipoproteins showed only α-migrating particles in all samples. CSF apoA-I-containing lipoproteins of AD patients are characterized by a high amount of α-migrating HDL; in addition, pre-α-migrating apoA-I-containing lipoproteins have been detected in CSF samples from AD patients. The migration of CSF lipoproteins containing apoA-II is similar to apoA-I lipoproteins and their profile looks analogue to plasmatic HDL.

Conclusions. Since it is known that apoA-I and apoA-II mRNA are not present in central nervous system, this qualitative characterization of HDL together with their quantitative determination supports the hypothesis of a direct role of plasma HDL in brain cholesterol homeostasis. Further studies are necessary to evaluate if parameters related to HDL-C may represent biomarkers of disease's risk and progression.

EFFECT OF LIPID-LOWERING THERAPIES ON C-REACTIVE PROTEIN LEVELS: A META-ANALYSIS OF RANDOMIZED CONTROLLED TRIALS

S. Xie¹, F. Galimberti², E. Olmastroni¹, M. Casula², A.L. Catapano²

¹*Epidemiology and Preventive Pharmacology Service (SEFAP), Department of Pharmacological and Biomolecular Sciences, University of Milan; ²Epidemiology and Preventive Pharmacology Service (SEFAP), Department of Pharmacological and Biomolecular Sciences, University of Milan, IRCCS MultiMedica, Sesto San Giovanni (MI)*
E-mail: sining.xie@unimi.it

Cardiovascular diseases are widely recognized as having an inflammatory component. Yet, it is not clear whether inflammation simply accompanies the atherosclerotic process or represents the causal driver. Our study aimed to assess the anti-inflammatory effect of lipid-lowering drugs on C-reactive protein (CRP) levels, in addition to lipid reduction. We conducted a meta-analysis according to the PRISMA reporting guidelines. PubMed, Web of Science, EMBASE, Cochrane Library and ClinicalTrial.gov were searched since inception to June 2021.

Inclusion criteria were:

- 1) randomized controlled trials (RCTs) in human, phase II, III or IV;
- 2) English language;
- 3) reporting the effects on CRP levels;
- 4) with intervention duration more than 3 weeks;
- 5) and sample size (for each arm) over than 100 subjects.

Pooled estimates were assessed by random-effects model. Between-study heterogeneity was tested by Cochrane's Q test and measured with the I² statistics. For statins, 11 RCTs were included in the meta-analysis, accounting for 46,499 participants. An additional 1.10 mg/L (95%CI, -1.11 to -1.10) absolute reduction of CRP concentration was observed for statin-treated group compared to placebo. For lipid profile, there was a significant decrease of 51.28 mg/dL for LDL-C levels and 19.85 mg/dL for TG levels. For PCSK9 inhibitors, 5 trials were included with 47,709 participants. CRP level was slightly increased by 0.06 mg/L (95%CI, 0.06 to 0.06). LDL-C and TG levels were significantly reduced by 62.28 mg/dL and 26.70 mg/dL, respectively. For Ezetimibe, also 5 trials were included with 15,505 participants. A 0.66 mg/L (95%CI, -0.68 to -0.64) absolute decrease of CRP level was found in the ezetimibe-combined treatment group compared to single-drug treatment group. Both LDL-C and TG were decreased (-17.28 mg/dL and -13.32 mg/dL, respectively). In conclusion, that statin and ezetimibe administration reduce serum CRP concentration while, patients treated with PCSK9 inhibitors experience no significant changes in CRP levels.

INDICE DEGLI AUTORI

A

Adorni M.P., 18, 23, 30
 Agostini C., 15
 Allegra M., 5
 Allevi M., 34
 Asiiat Alieva, 1
 Altieri G.I., 5, 19, 37
 Amadio P., 22
 Anastasio C., 29
 Andreozzi F., 10, 11
 Andronis C., 17
 Angelico F., 2
 Arba F., 20
 Arca A., 26
 Arca M., 3, 9, 11, 12, 14
 Armentaro G., 10, 11
 Arnaboldi F., 12
 Arnaboldi L., 1
 Audano M., 13
 Autiero P., 29
 Averna M., 5, 11, 12, 18, 19, 37

B

Baigent C., 28
 Banfi C., 18
 Baragetti A., 1, 9, 13, 24
 Barale C., 9
 Baratta F., 2, 9
 Barbagallo C.M., 5, 12, 19, 37
 Barbara K., 11
 Barbieri G., 39
 Barbieri S., 22
 Barbuti A., 13
 Barillà F., 29
 Bartimoccia S., 9, 26, 27, 29
 Bartuli A., 8
 Batori G., 3
 Bellini R., 2, 27
 Benzoni P., 13
 Bernini F., 23, 30
 Bertelli A., 14
 Berti S., 36
 Bertolini S., 16
 Bhatt D.L., 28
 Bianco F., 5, 6
 Bianconi V., 3

B

Bigazzi F., 35, 36
 Bigolin P., 19
 Bilitou A., 14
 Bini S., 3, 26
 Biolo M., 1
 Biondini S., 34
 Bolego C., 15
 Bollati V., 18, 22
 Bonacina F., 2, 13, 17, 27, 40
 Bonelli E., 16
 Boragina G., 25
 Bordonaro F., 1
 Borghi C., 11, 16, 31, 32
 Brambilla A., 4
 Bressan A., 15
 Brilli E., 21
 Brucato F., 5, 18, 19, 37
 Bucci M., 5, 6, 7
 Bucciarelli B., 5, 6
 Buoli M., 22
 Buonuomo P.S., 8
 Busnelli M., 8, 12, 17, 22

C

Calabresi L., 23, 40
 Calandra S., 16
 Caliò G., 38
 Calzetti G., 35
 Cammisotto V., 9, 26, 27, 29
 Canclini L., 9
 Cantone L., 18
 Capezzuoli T., 14
 Caporale M., 6, 7
 Carbone F., 10
 Cardiero G., 10, 29
 Carnevale R., 9, 26, 27, 29
 Caserta M., 37
 Cassano V., 10, 11
 Cassioli G., 20
 Castana C., 37
 Castellani V., 9, 26
 Castiglioni L., 13
 Castiglioni S., 17
 Casula M., 1, 17, 41
 Catalano C., 26
 Catapano A.L., 7, 9, 13, 14, 17, 24, 28,

D

Cecchi S., 2
 Ceci F., 26
 Cefalù A.B., 5, 11, 12, 18, 19, 37
 Cesari F., 39
 Chiesa G., 8, 12, 17
 Chimenti I., 27
 Ciacci P., 29
 Cicero A.F.G., 16
 Cinetto F., 15
 Cinquegrani M., 23
 Ciobanu N., 29
 Cipollone F., 5, 6, 7
 Clausi E., 10
 Cocomello N., 2, 9
 Colantoni A., 2
 Colombo A., 8, 12, 17, 22
 Commean P., 26
 Condoleo V., 11
 Consoli A., 20
 Conti E., 23, 40
 Conti S., 37
 Coretti A., 8
 Coronati M., 2
 Coronelli M.M., 13
 Corsini A., 1, 18, 22, 33
 Cosentini E., 3
 Crescibene D., 11
 Curia M.C., 7

D'Ambrosio L., 27
 D'Amico A., 27, 29
 D'Ardes D., 5, 6, 7
 D'Erasmo L., 3, 9, 12, 26
 Da Dalt L., 13, 40
 Da Prato G., 33
 Dal Pino B., 35, 36
 Dall'Acqua S., 21
 Dall'Agata M., 1
 David A., 38
 De Cario R., 14, 20, 39
 de Falco R., 29
 Deanfield J.E., 28
 Degli Esposti L., 31, 32
 Del Ben M., 2, 9

- Dessena M., 15
 Di Costanzo A., 3, 26
 Di Martino M., 26
 Di Micoli A., 16
 Di Nicola M., 5
 Di Pino A., 9, 18, 37
 Di Taranto M.D., 10
 Di Vincenzo F., 1
 Dolo V., 18
 Domenighini R., 24
 Donato M., 15
 Donetti E., 12, 13
 Dongiovanni P., 33
- F**
 Faggin E., 15
 Farina M.G., 37
 Fasano T., 16
 Fausti E., 34
 Fayer F., 19, 37
 Felice C., 15
 Ference B.A., 28
 Ference T.B., 28
 Ferrara V., 37
 Ferrarese I., 21
 Ferri N., 18, 21, 30
 Ferro Y., 25
 Feuerborn R., 15
 Figorilli F., 3
 Fiorentino T.V., 10
 Fischetti A., 14
 Fogacci F., 16
 Fontanelli E., 35
 Forte F., 12
 Forte M., 27
 Fortunato G., 10, 29
 Fracanzani A.L., 33
 Franchi E., 8, 12, 17, 22
 Francisci D., 3
 Franzè M.S., 38
 Frati G., 26, 27
 Fraum T., 26
 Frisa E., 1
- G**
 Ghadiri A., 3
 Galicia-Garcia U., 10
 Galimberti F., 17, 28, 41
 Galvani M., 31, 32
 Ganci A., 5, 19, 37
 Garavaglia A., 4
- Garbellotto R., 11
 García-Rivera M.A., 8
 Garlanda C., 27
 Gastoldi F., 40
 Gazzotti M., 1
 Gentile M., 5
 Gérard P., 8
 Giacomini E., 31, 32
 Giannanco A., 5, 12, 18, 19, 37
 Giannetti F., 13
 Giannini M., 14
 Giannini S., 12
 Gidari A., 3
 Giulietti F., 34
 Giusti B., 14, 20, 39
 Giusti I., 18
 Gnoni R., 16
 Gomaraschi M., 2
 Gonfiantini M.V., 8
 Gori A.M., 14, 20, 39
 Granata A., 1
 Greco M.F., 18, 22
 Grignani F., 3
 Grigore L., 9, 24
 Grillo E., 4
 Grossano P., 22
 Guagnano M.T., 5
 Gueli Alletti M., 5, 19, 37
 Guerrasio A., 11
 Guo Q., 28
- H**
 Haq I., 14
 Hesse B., 15
 Holmes M.V., 28
 Hoxha M., 18
- I**
 Iannuzzo G., 12
 Ieraci A., 22
 Indino S., 13
 Ingrassia V., 5, 19, 37
 Inzitari D., 20
 Ivanov M., 29
 Ivanov V., 29
- J**
 Jabnati N., 9
 Jaros M.J., 4
- K**
 Kallend D., 4
 Kastelein J.J.P., 4
 Khoory J., 25
 Kirwan J., 8
 Koenig W., 4
 Kura A., 14, 20, 39
- L**
 Labbadia G., 26
 Larrea-Sebal A., 10
 Latella M., 4
 Leiter L.A., 4
 Lekka E., 17
 Lepri A., 35
 Limbucci N., 20
 Loffredo L., 29
 Lombardi R., 33
 Longo M., 33
 Lotti E., 39
 Luciani R., 35
 Lugari S., 1
 Lukasz A., 15
 Lupo M.G., 21
- M**
 Macchi C., 18, 22, 33
 Macchiaiolo M., 8
 Maggio E., 29
 Magi A., 20, 39
 Magni P., 7, 24
 Malvandi A.M., 9
 Mandraffino G., 23, 38
 Mangiafico S., 20
 Mannarino M.R., 3
 Mannino G., 10
 Manotti P., 31, 32
 Manzini S., 8, 12, 17, 22
 Maranghi M., 26
 Marchi C., 23, 30
 Marchioni, M., 5
 Marcucci R., 14, 20, 39
 Mare R., 25
 Maretta A., 38, 39
 Marini E., 3
 Marino M., 23, 38
 Marra A., 31, 32
 Martin C., 10
 Massaroni K., 11
 Mattavelli E., 24
 Maurotti S., 25

- Mazza E., 25
 Mazza S., 1
 Menichelli D., 26
 Meroni M., 33
 Miceli S., 11
 Minicocci I., 3, 26
 Mirarchi A., 25
 Misiano G., 5, 19, 37
 Mitro N., 13
 Mombelli G., 11
 Monaco V., 11
 Montalcini T., 25
 Montali A., 12, 26
 Montecucco F., 10
 Morace C., 23
 Moregola A., 27, 40
- N**
 Napolitano B., 38, 39
 Nappini S., 20
 Nascimbeni F., 1
 Navazio A., 31, 32
 Negri E.A., 16
 Neufeld T., 26
 Nicholls S.J., 28
 Nissen S.E., 28
 Nocella C., 9, 26, 27, 29
 Nofer J.-R., 15
 Norata G.D., 2, 12, 13, 17, 27, 40
 Noto D., 5, 12, 18, 19, 37
 Nour J., 27
 Nunnari G., 23, 38
 Nuti R., 11
- O**
 Olmastroni E., 1, 17, 28, 41
 Orlando F., 29
- P**
 Palma D., 10, 29
 Palmieri C., 36
 Panighel G., 21
 Paolini E., 33
 Papotti B., 30
 Paraninfo A., 29
 Passaro A., 31, 32
 Pastori D., 2, 9, 26, 27
 Pavanello C., 40
 Pecce V., 3
 Pedretti S., 13
 Pellegatta F., 13, 24
 Perrone V., 31, 32
- Perticone M., 10, 11
 Petracca G., 32, 33
 Pianelli M., 35
 Piattelli A., 7
 Piccardi B., 20
 Piccione M., 37
 Pieraccini F., 31, 32
 Pigna G., 26
 Pignatelli P., 7, 9, 26, 27
 Pirillo A., 24
 Piro S., 9, 18, 37
 Pirro M., 3, 11
 Polissi A., 1
 Polito L., 3
 Poti F., 15
 Prastaro M., 25
 Puja A., 25
 Purrello F., 5, 9, 18, 37
- R**
 Raal F.J., 4
 Rana I., 8
 Rattazzi M., 15
 Ray K.K., 4, 14, 28
 Re S., 34
 Redaelli L., 24
 Renieri L., 20
 Ripoli A., 35
 Ristè F., 1
 Rogolino A.A., 14
 Romeo F., 14
 Ronda N., 30
 Rosi A., 20
 Rossi I., 5, 6, 7
 Rubba P., 11
 Ruff C.T., 28
 Rullo Venenzi E., 23
 Ruscica M., 18, 22, 33
 Russo I., 9
- S**
 Sabatine M.S., 28
 Sahebkar A., 3
 Samani N.J., 28
 Sampietro T., 35, 36
 Sangiorgi D., 31, 32
 Sani E., 32, 33
 Santi L., 32, 33
 Santilli F., 5
 Sarnari S., 34
 Sarti C., 20
- Sartori E., 13
 Sarzani R., 34
 Sattar N., 28
 Savoia M., 29
 Sbrana F., 35, 36
 Scanziani E., 12, 17
 Scarinzi P., 1
 Scaturro G.M., 39
 Schiaroli E., 3
 Schiavon S., 27
 Schirone L., 27
 Sciacqua A., 10, 11
 Sciarretta S., 27
 Scorpiglione L., 7
 Sesti G., 10, 11
 Severini G., 11
 Simoni M., 15
 Sinicropi D., 23, 38
 Sinjari B., 5
 Sironi L., 13
 Sirtori C., 18, 22, 33
 Smith G.D., 28
 Sodero A., 20
 Spadaro F., 23, 38
 Spagnuolo V., 38, 39
 Spannella F., 34
 Sparacino M., 23
 Sperandeo P., 1
 Spina R., 5, 18, 19, 37
 Spinosa G., 27
 Squadrato G., 23, 38
 Sticchi E., 14, 20, 39
 Stitziel N., 26
 Succurro E., 10
 Suppressa P., 12
 Suraci S., 14, 20, 39
 Svecla M., 13, 40
- T**
 Tarantino G., 21
 Tidone C., 24
 Tirone G., 11
 Tozzi G., 2
 Tragni E., 17
 Travia D., 32
 Tremolizzo L., 23, 40
 Trenti C., 16
 Troiano F., 5, 6, 7
 Turner T., 4
 Turri M., 40
 Turri P., 34

U

Uboldi P., 13, 40

V

Valenti V., 27

Vano M., 29

Vecchio D., 8, 27

Venezia S., 4

Veronesi M., 16

Versaci F., 27

Viapiana V., 23

Vigna L., 22

Violi F., 9, 26, 27, 29

Vizzarri P., 5, 6, 7

von Eckardstein A., 15

W

Wijngaard P.L.J., 4

Wright R.S., 4

X

Xie S., 41

Z

Zagami M., 13

Zambon A., 12, 19

Zenti M.G., 32, 33

Zhang X., 8

Zheng J., 26

Zimetti F., 18, 23, 30

