

Effetti diversi indotti dal trattamento con varie statine sull'espressione del Tissue Factor monocitario nei soggetti ipercolesterolemici

I farmaci ipocolesterolemizzanti (statine) possono ridurre il rischio cardiovascolare tramite l'azione ipolipemizzante ma verosimilmente anche per mezzo di effetti antitrombotici diretti come la modulazione dell'attività di piastrine e monociti. Lo scopo dello studio è stato quello di valutare l'effetto di varie statine sull'attività piastrinica e monocitaria in soggetti ipercolesterolemici. I nostri dati mostrano incremento della produzione di TF su cellule isolate e su sangue intero e della P-selectina (indice di attivazione piastrinica) nei soggetti ipercolesterolemici rispetto ai controlli ($p < 0.001$). Atorvastatina, Fluvastatina e Simvastatina riducono l'attività procoagulante monocitaria e l'attività piastrinica ($p < 0.01$) indipendentemente dalle modificazioni del colesterolo. La Pravastatina invece riduce l'espressione del TF nel sangue intero in modo direttamente proporzionale alla riduzione dell'attività piastrinica e del colesterolo ($p < 0.05$). I nostri dati mostrano quindi un'influenza diversa esercitata dalle statine sull'espressione del TF nel sangue intero, suggerendo la presenza sia di azioni dirette sui monociti che mediate dalla modulazione dell'attività piastrinica.

Specific effects of several statins on monocyte Tissue Factor expression in hypercholesterolemic subjects

Summary

Cholesterol-lowering drugs (statins) reduce cardiovascular risk either by decreasing cholesterol or non-lipidic actions such as platelet and monocyte activity modulation. The aim of our study was to evaluate the effect of several statins on platelet and monocyte activity in hypercholesterolemic subjects.

P-selectin (as an indicator of platelet activity), tissue factor expression in whole blood and isolated cells were increased in hypercholesterolemic subjects with respect to controls (all $p < 0.001$). Atorvastatin, Fluvastatin and Simvastatin reduced monocyte procoagulant activity in whole blood and platelet activation ($p < 0.01$). Tissue factor antigen and activity in isolated cells were further reduced (all $p < 0.05$) beyond cholesterol reduction. Pravastatin decreased tissue factor expression in whole blood with direct relation to reduced P-selectin and cholesterol ($p < 0.05$). In conclusion our data show a different impact of several statins on monocyte TF expression in whole blood suggesting a possible role for both direct or platelet-mediated actions.

Bruni F, Puccetti L, Pasqui AL, et al. Specific Effects of several statins on monocyte Tissue Factor expression in hypercholesterolemic subjects. *Trends Med* 2005; 5(1):89-98.

© 2005 Pharma Project Group srl

Fulvio Bruni, Luca Puccetti, Anna Laura Pasqui, Marcello Pastorelli, Giovanni Bova, Alberto Auteri

Dipartimento di Medicina Clinica e Scienze Immunologiche, Sezione di Medicina Interna, Centro Interdipartimentale per ricerche sull'Aterosclerosi, Sezione Clinica, Università degli Studi di Siena

Key words:

**atherothrombosis
monocytes
platelets
Tissue Factor
dyslipidaemias
statins**

 **Luca Puccetti**

Dip. di Medicina Clinica e Scienze Immunologiche, Divisione di Medicina Interna, Centro per lo Studio dell'Aterosclerosi. Policlinico Santa Maria alle Scotte, V.le Bracci, 53100 Siena Tel:0577-585741 - Fax:0577-44114 e-mail: puccetti@unisi.it

Introduzione

Le cellule ed i mediatori biochimici dell'infiammazione svolgono un ruolo rilevante nella genesi e nella progressione dell'aterosclerosi¹. I monociti sono infatti coinvolti nell'induzione, nella progressione e rottura della placca aterosclerotica². Essi, inoltre sono provvisti di attività procoagulante legata all'espressione di TF, considerato il principale promotore della cascata coagulativa in vivo³. Per tale motivo si ritiene che questi elementi cellulari svolgano un ruolo di rilievo nel determinarsi delle complicazioni trombotiche acute dell'aterosclerosi. Altre protagoniste principali nell'aterotrombosi sono le piastrine, sia attraverso un ruolo diretto⁴, che grazie alla capacità di influenzare l'attività procoagulante monocitaria⁵.

L'iperattività piastrinica e monocitaria è stata descritta nell'ipercolesterolemia^{6,7}, un classico fattore di rischio per gli eventi cardiovascolari⁸. Gli inibitori dell'enzima 3-I-drossi-metil-glutaril coenzima-A (HMG-CoA) reductasi (statine) inducono un efficace effetto ipocolesterolemizzante e molti trial mostrano i loro effetti positivi sugli eventi cardiovascolari⁹. In ogni modo, la riduzione della mortalità¹⁰ e la regressione delle placche aterosclerotiche sono rilevabili in modo indipendente dalla riduzione del colesterolo stesso¹¹ ed anche in pazienti con livelli normali di partenza¹². Tali evidenze hanno suggerito la possibilità che le statine possano esplicare azioni anti-aterotrombotiche dirette, non correlate con l'azione ipolipemizzante principale, che potrebbero assumere un ruolo positivo nella protezione cardiovascolare¹³. Le statine riducono infatti l'attività piastrinica¹⁴ e l'espressione di TF in vitro¹⁵ ed in vivo⁷. Inoltre il nostro gruppo ha precedentemente dimostrato un'azione diretta di alcune statine sull'interazione piastrine-monociti e sulla produzione di TF (in vitro)¹⁶. Comunque, le varie statine modulano differenzialmente l'espressione di TF monocitario in vitro¹⁵, la generazione di trombina piastrino-dipendente¹⁷ e l'espressione di P-Selectina, marker sensibile di attivazione piastrinica, in vivo¹⁸. Studi precedenti hanno mostrato che la somministrazione di Simvastatina induce una riduzione dell'espressione di TF monocitario⁷. In ogni modo, al momento non esistono dati comparativi disponibili sugli effetti delle varie statine nello stesso modello sperimentale durante trattamento in vivo. Lo scopo del nostro studio è stato quello di investigare gli effetti tempo-dipendenti di varie statine sulla produzione di TF in monociti isolati e nel sangue intero di soggetti con ipercolesterolemia pura. Il test sul sangue intero veniva eseguito per valutare le possibili influenze della somministrazione di statine sulle piastrine e sull'attività procoagulante monocitaria, come precedentemente descritto in vitro¹⁶. Inoltre, abbiamo valutato l'attività piastrinica attraverso le misurazioni della P-Selectina di superficie (CD62, GMP-140 o P-Sel).

Materiali e metodi

Venivano inclusi nello studio sessantaquattro soggetti ipercolesterolemici [41 maschi, 23 femmine, range d'età 36-63 anni, colesterolo totale (TC) $264,4 \pm 12,4$ mg/dl, colesterolo-HDL (HDL-C) $48,4 \pm 4,2$ mmol/l, trigliceridi (TG) $111,9 \pm 9,7$ mg/dl, colesterolo-LDL (LDL-C) $192,5 \pm 7,2$ mg/dl,

indice di massa corporea (BMI) $24,7 \pm 1,7$ kg/m²]. I pazienti non responsivi al regime dietetico per 6 settimane (AHA step II)¹⁹, venivano randomizzati a trattamento con atorvastatina 10 mg/die (n=16), simvastatina 20 mg/die (n=16), fluvastatina 80 mg/die (n=16) o pravastatina 40 mg/die (n=16). Il regime dietetico consisteva nell'assunzione di 1700 ± 100 Kcal/die: l'introito di colesterolo era minore di 200 mg/die; il 30% delle calorie totali proveniva da grassi (<5% grassi saturi, 25% grassi insaturi), il 55% da carboidrati e il 15% da proteine; l'assunzione quotidiana di fibre era di circa 35 g. Ciascun soggetto proseguiva il regime dietetico durante il periodo di osservazione e la compliance era verificata settimanalmente da un nutrizionista attraverso questionari e controlli del peso corporeo.

Il regime dietetico era considerato inefficace se il colesterolo-LDL non era diminuito in misura superiore al 25% fino ad un livello di 160 mg/dl. L'efficacia e la tollerabilità delle dosi delle varie statine erano comparabili, in accordo ai risultati dello studio CURVES²⁰ eccetto che per la fluvastatina. Infatti in tale studio 40 mg di tale molecola erano risultati meno attivi delle altre statine e pertanto decidevamo di somministrare un dosaggio più elevato ma sovrapponibile per tollerabilità²¹. Inoltre la scelta delle dosi delle diverse molecole era effettuata in base al precedente rilievo della relazione tra dose di statina e attività sulla generazione di trombina piastrino-dipendente dopo 6 settimane di trattamento¹⁷.

Venivano inoltre valutati 20 soggetti normali, comparabili per sesso e per età, come controlli dell'attività piastrinica e procoagulante monocitaria di base.

I criteri di esclusione dallo studio erano: precedenti eventi cardio e cerebrovascolari nella storia clinica, ipertensione arteriosa, diabete mellito, malattie epatiche, renali, tiroidee, infettive o patologie maligne conosciute. Nessuno aveva una storia familiare di trombosi venosa profonda o di sindrome emorragica e non erano stati assunti farmaci ipolipemizzanti, antiplastrinici, anticoagulanti o profibrinolitici nei tre mesi precedenti l'inclusione nello studio. Tutte le donne erano in età riproduttiva e nessuna assumeva terapia ormonale. Nel presente studio i soggetti sono stati arruolati in presenza di normali valori di omocisteina (Hcy, cut-off 12 mmol/L), lipoproteina(a) [Lp(a)] (cut-off 30 mg/dl) fibrinogeno (cut-off 300 mg/dl) e proteina C reattiva (PCR, cut-off 1mg/L), in relazione ai controlli. Ciascun parametro veniva ulteriormente valutato alla fine del

periodo di osservazione. Lo studio era stato accettato dal Comitato Etico locale ed ogni soggetto aveva sottoscritto il consenso informato.

I campioni ematici erano prelevati al tempo zero (T⁰, dopo 6 settimane di regime dietetico inefficace), dopo 1 (T¹), 2 (T²), 3 (T³), 4 (T⁴), e 6 (T⁵) settimane di trattamento.

Prelievo di sangue

Ad ogni tempo prestabilito il prelievo ematico era eseguito al mattino, a riposo e digiuno, senza stasi, con un ago 19G. Il sangue veniva quindi raccolto in acido citrico-destrosio (ACD 1:9) per lo studio delle piastrine isolate; in eparina litica (1:9) per l'isolamento delle cellule mononucleate, in citrato trisodico 3,8% per il fibrinogeno e Lp(a); in EDTA per l'omocisteina, come sangue intero per il profilo lipidico e la PCR. Tutti i campioni, eccetto quelli per la preparazione delle piastrine, erano centrifugati a 1.500 x g per 15 minuti e poi conservati a -70 °C per un massimo di 10 giorni.

Isolamento delle piastrine

Il sangue citratato è stato centrifugato a 100 x g per 20 minuti a temperatura controllata per ottenere un plasma ricco di piastrine (PRP). Questo era poi separato dai 2/3 superiori del soprannatante per evitare la contaminazione delle altre cellule. Il sangue rimanente era centrifugato a 1.500 x g per 10 minuti per ottenere un plasma povero di piastrine (PPP). Le piastrine lavate sono state isolate attraverso una tecnica di centrifugazione multipla in tampone Tyrode (137mM NaCl, 2,8 mM KCl, 1mM MgCl₂, 12mM NaHCO₃, 0,4 mM Na₂HPO₄, 0,35% albumina sierica, 10 mM HEPES, 5,5 mM destrosio pH 7.4) come descritto da Mustard²². Il conteggio delle piastrine è stato eseguito su contaglobuli Coulter Counter (Coulter Ltd.Miami, Fl, USA).

Isolamento dei monociti

Le cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) ed i granulociti venivano isolati da sangue intero eparinato. Le PBMC venivano successivamente isolate con centrifugazione in Lymphoprep a 1200g x 20 min a 20°C²³. I monociti erano identificati con May-Grunwald-Giemsa e comprendevano il 19%-22% di cellule specifiche. I monociti venivano ottenuti con l'incubazione delle PBMC per 90 minuti a 37°C in un'atmosfera umidificata al 5% di CO₂ in piastre contenenti medium specifico RPMI 1640, supplementate con 2 mM di glutamina. I linfociti venivano rimossi con aspirazione effettuata con una pipetta Pasteur

calibrata e lavaggio dei dischi in tampone specifico²⁴. La preparazione purificata di cellule conteneva un minimo del 94% di monociti.

Lisato cellulare monocitario

Dopo l'isolamento, i monociti (1x10⁹ cell/l) venivano lavati in PBS ed incubati in RPMI 1640 a 37°C in CO al 5% per 6 ore. Le colture venivano preparate in presenza di lipopolisaccaride (LPS) ad una concentrazione finale di 5 ng/ml. Alla fine dell'incubazione, gli elementi cellulari venivano separati con centrifugazione a 200g x 20 min e poi lavati in tampone TRIS-NaCl (0,1 mmol/l NaCl, 0,1% di albumina serica bovina, pH 7,4). Le cellule venivano lisate nello stesso buffer aggiungendo 15 mmol/l di n-octil-d-glicopiranoside a 37°C per 15 min²⁵.

Determinazione dell'attività del TF nel lisato cellulare

L'attività procoagulante monocitaria veniva esaminata tramite specifica metodica coagulativa ad unico passaggio²⁶. 100 µl di lisato cellulare erano aggiunti a 100 ml di plasma citrato normale. Dopo incubazione per 150 sec a 37°C, venivano aggiunti 100 ml di CaCl₂ 0,025 mM. I tempi di coagulazione venivano quantificati rapportandoli con curve standard basate su diluizioni seriate di una preparazione standard di tromboplastina. I risultati venivano espressi come unità di attività TF per microgrammo di proteina determinata dal metodo Bradford²⁷.

Determinazione dell'attività del TF nel sangue intero

Dopo incubazione di sangue eparinato con LPS (5 ng/ml), le cellule mononucleate venivano isolate applicando alla sommità del campione, contenente 0,5 ml di NaCl 0,15 mol/l, 1,5 ml di Lymphoprep seguito da centrifugazione a 440 g per 15 min. Le cellule venivano raccolte e lavate con NaCl 0,15 mol/l. Al termine, le cellule venivano congelate a -20°C. L'attività del TF veniva determinata sul campione tramite metodica coagulativa a due passaggi²⁸. Tale campione veniva aggiunto ad una mistura di protrombina modificata, fattore X, fattore V e fattore II e la reazione veniva iniziata con l'aggiunta di CaCl₂ (4,0 M concentrazione finale). Dopo 3 minuti di incubazione in presenza di fibrinogeno, la trombina generata veniva misurata tramite determinazione del tempo di coagulazione. Lo standard era costituito da una preparazione purificata di TF; i dati sono stati espressi come mU/10⁶/cellule.

Determinazione del TF antigene

IL TF antigene veniva determinato nel lisato cellulare con metodo ELISA, usando anticorpi monoclonali (mAb) anti TF in accordo alle raccomandazioni del produttore (Imubind Tissue Factor, American Diagnostica)²⁹. Tutti i campioni erano testati in duplicato ed i dati espressi come pg/0.5 x 10⁹ cellule.

Analisi attivazione piastrinica

L'espressione della P-selectina a livello piastrinico (CD62p) è stata valutata con metodica citofluorimetrica attraverso la CD62p titolata con ficoeritrina (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) e CD61-Mab (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) come controllo positivo.

Le piastrine sono state immediatamente valutate dopo campionatura e trattate come precedentemente descritto¹⁸. Una parte del PRP (200 µL) è stata successivamente centrifugata a 800 x g per 5 minuti e, dopo rimozione del plasma, è stata fluorescinata. 20 µL di anticorpo monoclonale sono stati addizionati alle piastrine con incubazione per 30 minuti a temperatura ambiente, in camera oscura.

I campioni sono stati analizzati su citofluorimetro FACS-SCAN a 488 nm (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA).

In ciascun istogramma sono state incluse 50.000 piastrine per valutare la percentuale di cellule CD62p positive.

Misurazioni Plasmatiche

Il profilo lipidico (TC, HDL-C e TG) è stato determinato con metodica enzimatica-colorimetrica disponibile in commercio, secondo le istruzioni dei produttori (Roche-Hitachi, Mannheim, Germany) su spettrofotometro Beckman DU-7 (Beckman, Fullerton, CA, USA) (variazione interanalisi e intra-analisi CVs <3%). Tutti i soggetti inclusi nello studio avevano TG <400 mg/dl pertanto il colesterolo-LDL è stato calcolato applicando la formula di Friedewald³⁰. Il fibrinogeno è stato determinato nel plasma attraverso il metodo di Clauss modificato (Multifibren, Dade-Behring, Marburg, Germany; sia interanalisi, sia intra-analisi CVs <5%)³¹. L'omocisteina è stata misurata attraverso metodica HPLC con rilevazione in fluorescenza in accordo con Araki e Sako³². La Lp(a) è stata determinata con il metodo ELISA (American Diagnostica, Greenwich, CT, USA; variazioni sia interanalisi che intra-analisi CV <6%); la proteina C reattiva è stata valutata sfrut-

tando un metodo nefelometrico ad alta sensibilità (Dade-Behring, Marburg, Germany; variazioni sia interanalisi, che intra-analisi CVs <5%).

Analisi Statistica

I risultati sono riportati come valore medio ± errore standard (SEM).

Tutti i dati sono stati analizzati attraverso l'applicazione di ANOVA e il metodo di Bonferroni/Dunn è stato usato per comparazioni multiple quando sono state osservate differenze significative. Un valore di $p < 0.05$ è stato accettato come significativo. Inoltre il coefficiente di correlazione di Spearman è stato impiegato per determinare le relazioni lineari tra le variabili studiate. Tutti i calcoli sono stati realizzati usando la libreria SPSS (SPSS Inc. Chicago, IL, USA).

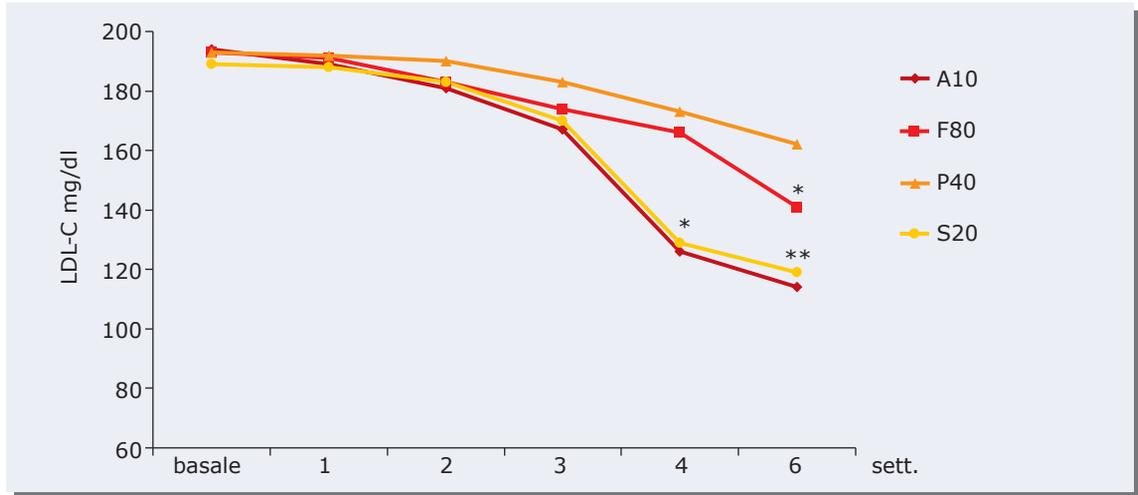
Risultati

Le caratteristiche dei pazienti e dei controlli all'inizio dello studio sono riportate nella tabella 1. Il profilo lipidico registrato nel corso dello studio è stato riportato nella figura 1 per quanto riguarda i valori colesterolo totale e LDL. I trigliceridi e le HDL non hanno mostrato variazioni significative ($p=0.211$ e 0.256 rispettivamente) durante lo studio. In condizioni basali (T⁰), il TF antigene e l'attività procoagulante erano aumentati nei monociti isolati dei soggetti ipercolesterolemici rispetto ai controlli ($33,4 \pm 7,9$ pg/0,5x10⁹ cel, $p < 0.001$ e $12,9 \pm 2,8$ U/µg cel prot, $p < 0.01$). L'attività del TF era anche significativamente incrementata nel sangue intero rispetto ai controlli ($35,6 \pm 4,9$ mU/lx10⁶ cel, $p < 0.001$). La P-sel, indice di attivazione piastrinica, era significativamente più elevata nei soggetti ipercolesterolemici rispetto ai controlli ($20,7 \pm 2,1\%$ + cel *vs* $6,9 \pm 0,9\%$, $p < 0.001$).

Gruppo trattato con Atorvastatina

L'attività del TF diminuiva significativamente nel sangue intero a T³ ($23,1 \pm 2,7$ mU/lx10⁶ cells, $p < 0.05$) (tabella 2). Nei monociti isolati, il TF antigene e l'attività erano significativamente diminuite a T⁴ ($22,1 \pm 4,5$ pg/0,5x10⁹ cells, $p < 0.05$ e $8,5 \pm 1,2$ U/mg cell protein, $p < 0.05$) (tabella 2). A T³ veniva rilevata una significativa relazione tra la riduzione di P-Sel e la diminuzione di TF su sangue intero ($r=0,52$, $p < 0.01$). A T⁵, nessuna relazione veniva invece evidenziata tra la riduzione del LDL-C e l'espressione di TF nelle cellule isolate ($r=0,12$, $p=0,178$) (tabella 3).

Figura 1. Colesterolo totale (TC) e colesterolo a bassa densità lipoproteica (LDL-C) nei pazienti trattati con atorvastatina 10 mg (A10), fluvastatina 80 mg/die (F80), pravastatina 40 mg/die (P40), simvastatina 20 mg/die (S20) al basale (T⁰) e dopo 1 (T¹), 2 (T²), 3 (T³), 4 (T⁴) e 6 (T⁵) settimane di trattamento. ANOVA e Test di Bonferroni/Dann, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs T⁰. ^ p<0.001 vs controlli.



Gruppo trattato con Fluvastatina

L'attività del TF diminuiva significativamente a T⁴ nel sangue intero (23,8±2,8 mU/lx10⁶, p<0.05) (tabella 2). L'antigene TF e l'attività erano significativamente ridotti a T⁰ nei monociti isolati (23,8±4,7 pg/0,5x10⁹ cell, p<0.05 e

8,9±1,3 U/mg cell protein, p<0.05) (tabella 2). A T⁴ veniva evidenziata una significativa relazione tra la riduzione di P-Sel e l'espressione di TF nel sangue intero (r=0,43, p<0.05). A T⁵, nessuna relazione tra la riduzione di LDL-C e l'espressione di TF nelle cellule isolate (r=0,12,

Tabella 1. Età, Indice di Massa Corporea (IMC), Pressione Arteriosa Sistolica (PAS) e Diastolica (PAD), Fibrinogeno (Fib), Omocisteina (Hcy), Lipoproteina (a) [Lp(a)], Proteina C reattiva (PCR) nei controlli e nei soggetti iperlipidemici.

	Controlli (n= 20)	Atorvastatina (n= 16)	Fluvastatina (n= 16)	Pravastatina (n= 16)	Simvastatina (n= 16)
Età (aa)	44,6±12,7	49,4±13,6	49,2±13,9	48,3±12,9	48,1±13,4
IMC (Kg/m ²)	24,1±1,3	24,7±1,9	24,8±1,7	24,6±1,7	24,8±1,6
PAS (mmHg)	129,6±12,3	128,8±10,4	129,1±10,7	133,7±8,9	132,8±11,5
PAD (mmHg)	77,6±8,2	77,1±9,7	77,5±10,6	77,8±9,8	78,8±10,4
PCR (mg/L)	0,95±0,2	1,10±0,18	1,12±0,19	1,13±0,19	1,11±0,21
Fib (mg/dl)	266,4±16,5	270,5±16,9	272,1±17,8	273,3±19,1	273,5±19,8
Hcy (mmol/L)	10,1±2,1	11,2±1,4	10,9±1,8	11,1±1,7	10,8±1,6
Lp(a) (mg/dl)	12,9±2,8	16,4±3,5	16,9±3,7	17,1±3,4	16,7±3,3

ANOVA e Test di Bonferroni/Dann, tutti p=n.s. controlli vs soggetti ipercolesterolemici

Tabella 2. P-selectina piastrinica (P-sel), Espressione di TF monocitario su sangue intero (TFa s.i.), espressione di TF monocitario su cellule isolate (TFa c.i.), Livelli di TF antigene in cellule isolate (TF Ag c.i.) durante lo studio.

		P-selectina (% + cell.)	TFa (s.i.) (mU/1x10 ⁶ cell.)	TFa (c.i.) (U/μg cell. proteina)	TF Ag (c.i.) (pg/0,5x10 ⁹ cell.)
Atorvastatina (10 mg/die) (n= 16)	T ⁰	20,8 ± 1,8	35,6 ± 4,9	13,2 ± 3,0	33,6 ± 8,2
	T ¹	17,6 ± 1,7	33,8 ± 3,5	12,9 ± 2,8	32,1 ± 7,6
	T ²	12,7 ± 1,3*	30,4 ± 2,9	11,6 ± 2,5	30,1 ± 6,4
	T ³	11,5 ± 1,2**	23,1 ± 2,7*	10,8 ± 2,1	26,2 ± 5,5
	T ⁴	9,2 ± 1,0***	21,4 ± 2,4*	8,5 ± 1,2*	22,1 ± 4,5*
	T ⁵	8,9 ± 0,9***	19,9 ± 2,3**	8,3 ± 1,1*	20,6 ± 4,2*
Fluvastatina (80 mg/die) (n= 16)	T ⁰	21,1 ± 1,9	35,6 ± 5,1	13,4 ± 3,2	33,5 ± 8,3
	T ¹	19,9 ± 1,8	34,2 ± 4,4	13,3 ± 3,0	33,4 ± 8,1
	T ²	17,4 ± 1,7	31,1 ± 3,2	12,5 ± 2,6	32,4 ± 7,2
	T ³	13,1 ± 1,5*	28,3 ± 2,7	11,3 ± 2,1	29,6 ± 6,1
	T ⁴	11,1 ± 1,4**	23,9 ± 2,8*	10,1 ± 2,0	27,2 ± 5,8
	T ⁵	10,4 ± 1,2**	21,5 ± 2,3*	8,9 ± 1,3*	22,8 ± 4,7*
Pravastatina (40 mg/die) (n= 16)	T ⁰	20,3 ± 2,0	35,5 ± 5,0	13,0 ± 3,1	33,3 ± 8,1
	T ¹	19,9 ± 1,9	33,9 ± 4,5	12,8 ± 3,0	32,6 ± 8,0
	T ²	17,2 ± 1,9	33,6 ± 3,1	12,5 ± 2,7	32,1 ± 7,6
	T ³	16,8 ± 1,4	31,4 ± 2,9	12,2 ± 2,2	31,5 ± 6,7
	T ⁴	13,1 ± 1,3*	30,8 ± 2,9	11,5 ± 1,9	30,9 ± 5,9
	T ⁵	12,8 ± 1,2*	23,8 ± 2,8*	11,3 ± 1,8	28,9 ± 5,4
Simvastatina (20 mg/die) (n= 16)	T ⁰	20,7 ± 1,9	35,8 ± 5,1	13,1 ± 2,9	33,5 ± 8,1
	T ¹	13,3 ± 1,3*	28,5 ± 3,2	12,9 ± 2,8	33,1 ± 7,9
	T ²	11,4 ± 1,2**	22,6 ± 2,8*	10,7 ± 2,1	30,6 ± 6,6
	T ³	10,7 ± 1,1***	22,2 ± 2,4*	8,3 ± 1,1*	21,6 ± 4,7*
	T ⁴	8,8 ± 0,9***	19,8 ± 2,3**	8,1 ± 1,1*	20,8 ± 4,9*
	T ⁵	8,4 ± 0,8***	19,6 ± 2,2**	7,9 ± 0,9*	19,1 ± 4,8*

ANOVA e test di Bonferroni/Dann, * p< 0.05, ** p< 0.01, p< 0.001. Ogni T vs T⁰

p=0.169), dove le modificazione del TF nel sangue intero correlavano con LDL-C (r=0,40, p<0.05) (tabella 3).

Gruppo trattato con Pravastatina

L'attività del TF diminuiva significativamente a T⁵ nel sangue intero (23,8±2,8 mU/1x10⁶ cells, p<0.05) (tabella 2). In ogni modo, l'antigene TF e l'attività non erano significativamente ridotti a T⁵ nei monociti isolati (29,9±5,4 pg/0,5x10⁹ cells, p=0.093 e 11,3±1,8 U/mg cell protein, p=0.089) (tabella 3). La P-Sel era significativamente ridotta a T⁴ (12,8%±1,4% positive cells, P<0.05) (tabella 2) Una relazione significativa veniva evidenziata, a T⁵, tra la riduzione della P-Sel e l'espressione del TF nel sangue intero (r=0,54, p<0.01). A T⁵ la riduzione del TF era significativamente correlata con la diminuzione di LDL-C (r=0,43, p<0.05), dove non si apprezzavano

relazioni tra LDL-C e TF nei monociti isolati (r=0,13, p=0.108) (tabella 3).

Gruppo trattato con Simvastatina

L'attività del TF diminuiva significativamente a T² nel sangue intero (22,6±2,8 mU/1x10⁹ cel, p<0.05) (tabella 2). Nei monociti isolati, il TF antigene e l'attività erano significativamente ridotti a T³ (21,6±4,7 pg/0,5x10⁹ cel, p<0.05 e 8,3±1,1 U/μg cell protein, P<0.05) (tabella 2). La P-Sel iniziava a ridursi già da T¹. A T² veniva rilevata una significativa relazione tra l'espressione di TF nel sangue intero e la riduzione di P-Sel (r=0,56, p<0.01). A T⁵ non veniva evidenziata alcuna significativa relazione tra la riduzione di LDL-C e l'espressione di TF nelle cellule isolate (r=0,16, p=0.280), dove i livelli di LDL-C correlavano con l'espressione di TF nel sangue intero (r=0,42, p<0.05) (tabella 3).

Tabella 3. Variazione percentuale (D) dell'espressione piastrinica della P-selectina (P-sel), colesterolo-LDL (LDL-C), espressione monocitaria di TF su sangue intero (TFa s.i.), su cellule isolate (TFa c.i.), livelli di TF antigene su cellule isolate (TF Ag c.i.) e coefficiente di correlazione (r) tra le variabili alla sesta settimana di trattamento (T⁵).

	Atorvastatina 10 mg	Fluvastatina 80 mg	Pravastatina 40 mg	Simvastatina 20 mg
a) ΔP-sel	-54	-47	-38	-56
b) ΔLDL-C	-35	-26	-23	-32
c) ΔTFa s.i.	-44	-40	-32	-45
d) ΔTFa c.i.	-37	-32	-13	-39
e) ΔTF Ag c.i.	-35	-29	-10	-38
r a/b (p)	0,37 (<.05)	0,51 (<.01)	0,60 (<.001)	0,34 (<.05)
r a/c (p)	0,59 (<.01)	0,52 (<.01)	0,54 (<.01)	0,61 (<.001)
r a/d (p)	0,11 (0.232)	0,09 (= .326)	0,08 (= .338)	0,10 (= .310)
r a/e (p)	0,07 (= .370)	0,10 (= .318)	0,10 (= .323)	0,09 (= .338)
r b/c (p)	0,40 (<.05)	0,43 (<.05)	0,43 (<.05)	0,42 (<.05)
r b/d (p)	0,12 (= .178)	0,12 (= .169)	0,13 (= .108)	0,10 (= .280)
r b/e (p)	0,11 (= .196)	0,11 (= .170)	0,13 (= .111)	0,11 (= .203)

Coefficiente di correlazione di Spearman tra le variabili. Significatività statistica p<0.05

Altri parametri

Non veniva rilevata alcuna modificazione significativa di Omocisteina (p=0.411), Lp(a) (p=0.324), CRP (p=0.316), o del fibrinogeno (p=0.098) al termine dello studio. BMI era 24,7±1,7 kg/m² vs. T⁰.

Discussione

La ricerca clinica sta affrontando la problematica delle statine come potenziali farmaci antiaterosclerotici ed antitrombotici al di là della loro azione ipolipemizzante³³. La riduzione dell'attività piastrinica e dell'espressione monocitaria potrebbero rappresentare rilevanti meccanismi di protezione vascolare indotti da questi composti³⁴. Simvastatina, fluvastatina e pravastatina hanno differenti azioni sull'attività procoagulante monocitaria in vitro; la pravastatina infatti non riduce l'espressione di TF in questo modello sperimentale¹⁵. Inoltre, tali dati indicano un'azione delle statine non legata all'effetto ipocolesterolemizzante, come suggerito in modelli animali trattati con fluvastatina³⁵. Studi in vivo hanno dimostrato invece che il trattamento dei soggetti ipercolesterolemici con simvastatina consentiva una riduzione dell'espressione del TF monocitario dopo 8 settimane⁷, mentre le altre statine non sono state estesamente studiate in tale modello.

Le piastrine ed i monociti interagiscono tra di loro in modo importante^{5,16,36} ed il nostro gruppo ha

precedentemente descritto come le varie statine riducono la funzione piastrinica con specifiche differenze per ogni molecola¹⁸. Questi dati suggeriscono la possibilità di effetti diversi sull'espressione del TF inducibile da differenti statine, legati o alla funzione piastrinica o ad un'azione diretta sui monociti. I risultati del presente studio confermano che l'attività procoagulante monocitaria risultava aumentata nei soggetti ipercolesterolemici rispetto ai controlli nel sangue intero e nelle cellule isolate (ambidue p<0.001). Inoltre, l'attività piastrinica, come testimoniato dall'espressione di P-Sel, risultava significativamente aumentata nei soggetti dislipidemici (p<0.001) e la simvastatina determinava effetti antiplastrinici prima di atorvastatina, fluvastatina, o pravastatina, in rigoroso ordine temporale, alle dosi impiegate (tabella 2). L'espressione di TF era inizialmente ridotta nel sangue intero rispetto alle cellule isolate. Inoltre, la ridotta attività procoagulante monocitaria era legata alla ridotta funzione piastrinica, come confermato dall'espressione di P-Sel. Una diretta relazione fra le variabili veniva rilevata quando l'attività piastrinica era ridotta oltre il 45% (tabella 3). Pertanto i nostri dati indicano un effetto iniziale piastrino-mediato sull'espressione di TF, che potrebbe non essere legato ad un'azione diretta sui monociti, come suggerito dai risultati sulle cellule isolate.

Alcune evidenze sperimentali indicano che anche i leucociti possono influenzare l'espressione del

TF monocitario³⁷. Comunque, essi richiedono la presenza di piastrine per influenzare l'attività procoagulante monocitaria³⁸. Dati recenti dimostrano che le piastrine stesse possono rilasciare TF durante la loro attivazione. Il TF associato alle piastrine potrebbe però essere in gran parte di origine leucocitaria, risultando dall'interazione CD15/P-Sel e dalla formazione di microparticelle attive monociti-piastrine³⁹. Comunque, nella nostra esperienza, simvastatina, atorvastatina, e fluvastatina riescono a determinare una diretta riduzione dell'attività procoagulante monocitaria indipendentemente dalla riduzione del LDL-C (cellule isolate) (tabella 3). In precedenti esperienze la pravastatina non riduceva in vitro l'espressione di TF monocitario¹⁵; inoltre noi osservavamo una ritardata azione nella modulazione dell'attività piastrinica, collegata con la riduzione del LDL-C e senza interazione con meccanismi verosimilmente colesterolo-indipendenti, rispetto ad altre statine^{17,18}. I nostri dati attuali suggeriscono che la pravastatina può essere meno attiva sui meccanismi intracellulari, come dimostrato dai risultati sulle cellule isolate.

Molte ipotesi sono state proposte per spiegare gli effetti pleiotropici delle statine¹³. Le evidenze sperimentali suggeriscono, tra le altre, un ruolo per la diffusibilità di membrana, che è ridotta per le molecole più idrofile (pravastatina) rispetto a quelle maggiormente lipofile¹⁵. In effetti, la modulazione della prenilazione proteica potrebbe giocare un ruolo rilevante nell'attivazione cellulare⁴⁰ e potrebbe quindi essere indotta solo dalle molecole o metaboliti capaci di raggiungere il compartimento intracellulare in settori diversi da quello epatico e muscolare. Inoltre, l'interferenza descritta con la Rho/Rho chinasi akt dipendente nelle cellule endoteliali è in accordo con l'ipotesi di azioni dirette non collegate esclusivamente con l'abbassamento del colesterolo serico⁴¹. Queste chi-

nasi partecipano infatti in modo rilevante anche all'attività piastrinica e monocitaria^{42,43} e potrebbero essere coinvolte nei meccanismi antiplastrinici non correlati direttamente con l'azione ipolipemizzante primaria delle statine, come già descritto in precedenza¹⁸.

Nessuna relazione significativa veniva rilevata tra la riduzione delle piastrine o dell'attività monocitaria e la PCR. Sebbene il trattamento con statine è stato associato con una riduzione dei livelli di PCR⁴⁴, nel nostro studio non veniva rilevata alcuna riduzione significativa. I nostri dati potrebbero essere legati ai valori basali normali di PCR ($p=0.486$ vs controlli) ed alla durata dello studio. Infine, nessuna relazione significativa veniva rilevata tra l'attività delle piastrine e dei monociti ed i valori di Lp(a) ($p=0.388$); inoltre le statine non influenzavano i livelli di Lp(a) nei nostri pazienti. In conclusione, i nostri dati confermano un positivo e precoce effetto di atorvastatina, fluvastatina e simvastatina sull'espressione del TF monocitario nel sangue intero. Questi risultati potrebbero essere legati ad una diretta modulazione dell'attività piastrinica prima di una significativa riduzione del LDL-C. Comunque, tali statine riducono anche il TF monocitario nelle cellule isolate. La pravastatina, alle dosi di 40 mg/die, non è capace di ridurre l'espressione di TF monocitario nelle cellule isolate dopo 6 settimane di terapia. Comunque, la pravastatina riduce l'attività procoagulante monocitaria nel sangue intero secondo una relazione diretta con la riduzione dell'attività piastrinica (P-Sel), in presenza di una significativa riduzione di LDL (tabella 3). Questi dati confermano precedenti risultati secondo cui la funzione piastrinica veniva modulata dalla pravastatina solo in relazione a meccanismi associati all'abbassamento di LDL, come il sistema dell'antiporlo Na^+/H^+ e la composizione del colesterolo di membrana¹⁸. **TiM**

Bibliografia

1. **Ross R.** Atherosclerosis. An inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 340:115-126.
2. **Falk E, Shah PK, Fuster V.** Pathogenesis of plaque disruption. In: V. Fuster, R. Ross, E.J. Topol (eds.) *Atherosclerosis and Coronary Artery Disease* 1996; Vol 2, pp. 492-510, Lippincott-Raven, Philadelphia.
3. **Nemerson Y.** Tissue Factor and Haemostasis. *Blood* 1988; 71:1-8.
4. **Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, et al.** The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 1992; 326:242-250.
5. **Østerud B.** The high responder phenomenon: enhancement of LPS-induced tissue factor activity in monocytes by platelets and granulocytes. *Platelets* 1995; 6:119-125.
6. **Davi G, Averna M, Catalano I, et al.** Increased thromboxane biosynthesis in type IIa hypercholesterolemia. *Circulation* 1992; 85:1792-1798.
7. **Ferro D, Basili S, Alessandri C, et al.** Simvastatin reduces monocyte-tissue-factor expression in type IIa hypercholesterolemia. *Lancet* 1997; 350:1222.
8. **Pekkanen J, Linn S, Heiss G, et al.** Ten-year mortality from cardiovascular disease in relation to cholesterol

- level among men with and without preexisting cardiovascular disease. *N Engl J Med* 1990; 322:1700-1707.
9. **Bolego C, Baetta R, Bellosta S, et al.** Safety considerations for statins. *Curr Opin Lipidol* 2002; 13:637-644.
 10. **Scandinavian Simvastatin Survival Study Group.** Randomized trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: The Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet* 1994; 344:1383-1389.
 11. **MAAS Investigators.** Effect of simvastatin on coronary atheroma: The Multicentre AntiAtheroma Study (MAAS). *Lancet* 1994; 344:633-638.
 12. **Heart Protection Study Collaborative Group.** MRC/BHF Heart Protection Study of cholesterol lowering with simvastatin in 20,356 high-risk individuals: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2002; 360:7-22.
 13. **Comparato C, Altana C, Bellosta S, et al.** Clinically relevant pleiotropic effects of statins: Drug properties or effects of profound cholesterol reduction? *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2001; 11:328-343.
 14. **Notarbartolo A, Davi G, Averna M, et al.** Inhibition of thromboxane biosynthesis and platelet function by simvastatin in type IIa hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; 15:247-251.
 15. **Colli S, Eligini S, Lalli M, et al.** Vastatins inhibit tissue factor in cultured human macrophages. A novel mechanism of protection against atherothrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17:265-272.
 16. **Puccetti L, Bruni F, Bova G, et al.** Role of platelets in tissue factor expression by monocytes in normal and hypercholesterolemic subjects. In vitro effect of cerivastatin. *Int J Clin Lab Res* 2000; 30:147-156.
 17. **Puccetti L, Bruni F, Bova G, et al.** Effect of diet and treatment with statins on platelet-dependent thrombin generation in hypercholesterolemic subjects. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2001; 11:378-387.
 18. **Puccetti L, Pasqui AL, Pastorelli M, et al.** Time-dependent effect of statins on platelet function in hypercholesterolemic subjects. *Eur J Clin Invest* 2002; 32:901-908.
 19. **Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults.** Executive summary of the third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert panel on detection, evaluation and treatment of high blood cholesterol in adults (adults treatment panel III). *JAMA* 2001; 285:2486-2497.
 20. **Jones P, Kafonek S, Laurora I.** Comparative dose efficacy study of atorvastatin versus simvastatin, pravastatin, lovastatin and fluvastatin in patients with hypercholesterolemia (The CURVES study). *Am J Cardiol* 1998; 81:582-587.
 21. **Ballantyne CM, Pazzucconi F, Pinto X, et al.** Efficacy and tolerability of fluvastatin extended-release delivery system: a pooled analysis. *Clon Ther* 2001; 23:177-192.
 22. **Mustard JF, Kinlough-Rathbone RL, Packham MA.** Isolation of human platelets from plasma by centrifugation and washing. *Methods Enzymol* 1989; 169:3-11.
 23. **Calmus Y, Robert A.** Increased procoagulant activity in peripheral blood mononuclear cells from patients with liver cirrhosis. *Thromb Res* 1992; 68:103-108.
 24. **Kornberg A, Blank M, Kaufman S.** Induction of tissue-factor like activity in monocytes by anti-cardiolipin antibodies. *J Immunol* 1994; 153:1328-1332.
 25. **Meszaros K, Aberle S, Dedrick R.** Monocyte tissue factor induction by lipopolysaccharide (LPS): dependence on LPS-binding protein and CD14, and inhibition by a recombinant fragment of bactericidal/permeability-increasing protein. *Blood* 1994; 83:2516-2525.
 26. **Saliola M, Lorenzet R, Ferro D, et al.** Enhanced expression of monocyte tissue factor in patients with liver cirrhosis. *Gut* 1998; 43:428-432.
 27. **Bradford MM.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dyebinding. *Annal Biochem* 1976; 72:248-254.
 28. **Østerud B.** Platelet activating factor enhancement of lipopolysaccharide-induced tissue factor activity in monocytes: requirements of platelets and granulocytes. *J Leukoc Biol* 1992; 51:462-465.
 29. **Barstad RM, Hamers MJAG, Stephens RW, et al.** Retinoic acid reduces induction of monocyte tissue factor/factor VIIa dependent arterial thrombus formation. *Blood* 1995; 86:212-218.
 30. **Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS.** Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972; 18:499-503.
 31. **Clauss A.** Rapid Physiological coagulation method in determination of fibrinogen. *Acta Haematol* 1957; 17:237-240.
 32. **Araki A, Sako Y.** Determination of free and total homocysteine in human plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography* 1987; 422:43-52.
 33. **Cortellaro M, Cofrancesco E, Arbustini E, et al.** Atorvastatin and thrombogenicity of the carotid atherosclerotic plaque: the ATROCAP study. *Thromb Haemost* 2002; 88:41-47.
 34. **Szczekliik A, Undas A, Musial J, et al.** Antithrombotic actions of statins. *Med Sci Monit* 2001; 7:1381-1385.
 35. **Baetta R, Camera M, Comparato C, et al.** Fluvastatin reduces tissue factor expression and macrophage accumulation in carotid lesions of cholesterol-fed rabbits in the absence of lipid lowering. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22:692-698.
 36. **Amirkhosravi A, Alexander M, May K, et al.** The importance of platelets in the expression of monocyte tissue factor antigen measured by a new whole blood flow cytometric assay. *Thromb Haemost* 1996; 75:87-95.
 37. **Halvorsen H, Olsen JO, Østerud B.** Granulocytes enhance LPS-induced tissue factor activity in monocytes via an interaction with platelets. *J Leukoc Biol* 1993; 54:275-282.

38. **Østerud B.** The role of platelets in decrypting monocyte tissue factor. *Semin Hematol* 2001; 38(4 suppl 12):2-5.
39. **Siddiqui FA, Desai H, Amirkhosravi A, et al.** The presence and release of tissue factor from human platelets. *Platelets* 2002; 13:247-253.
40. **Fenton JW 2nd, Jeske WP, Catalfamo JL, et al.** Statin drugs and dietary isoprenoids downregulate protein prenylation in signal transduction and are antithrombotic and prothrombolytic agents. *Biochemistry (Mosc)* 2002; 67:85-91.
41. **Eto M, Kozai T, Cosentino F, et al.** Statins prevents tissue factor expression in human endothelial cells: role of Rho/Rho-kinase and Akt pathways. *Circulation* 2002; 105:1756-1759.
42. **Retzer M, Siess W, Essler M.** Mildly oxidized low density lipoprotein induces platelet shape change via Rho-kinase-dependent phosphorylation of myosin light chain and moesin. *FEBS Lett* 2000;446:70-74.
43. **Nagata K, Ishibashi T, Sakamoto T, et al.** Rho/Rho-kinase is involved in the synthesis of tissue factor in human monocytes. *Atherosclerosis* 2002; 163:39-47.
44. **Jialal I, Stein D, Balis D, et al.** Effect of hydroxymethyl glutaryl coenzyme a reductase inhibitor therapy on high sensitive C-reactive protein levels. *Circulation* 2001; 103:1933-1955.