UNIVERSITÁ DEGLI STUDI DI CATANIA

DOTTORATO DI RICERCA IN "IPERTENSIONE ARTERIOSA E DANNO D'ORGANO CORRELATO"

XXIV CICLO

Davide Capodanno

EFFETTI FARMACODINAMICI DI DIFFERENTI REGIMI DI SOMMINISTRAZIONE DELL'ASPIRINA IN PAZIENTI CON DIABETE MELLITO DI TIPO II E CARDIOPATIA ISCHEMICA

TESI DI DOTTORATO DI RICERCA

Coordinatore
Chiar.mo Prof. Pietro Castellino

Tutor
Chiar.mo Prof. Corrado Tamburino

Anno Accademico 2010/2011

INDICE

INDICE 2

INTRODUZIONE 4

L'aspirina 4

L'aspirina in prevenzione primaria 4

L'aspirina in prevenzione secondaria 6

Resistenza all'aspirina e diabete mellito 7

RAZIONALE E SCOPO DELLO STUDIO 11

METODI 14

Disegno sperimentale e criteri di inclusione 14

Criteri di esclusione 15

Prelievi ematici 16

Aggregometria a trasmissione ottica 17

Verify-Now 17

Trombossano sierico 18

Analisi statistica 18

RISULTATI 21

Aggregometria a trasmissione ottica 22

Aggregazione piastrinica indotta dall'acido arachidonico 22

Aggregazione piastrinica indotta dal collageno 22

Aggregazione piastrinica indotta dall'ADP 23

Verify-Now 23

Trombossano sierico 24

DISCUSSIONE 25

Limiti dello studio 31

CONCLUSIONI 33

BIBLIOGRAFIA 34

TABELLA 1. Caratteristiche demografiche e cliniche di base 47

TABELLA 2. Confronto tra dosi di aspirina somministrate una volta al giorno 49

FIGURA 1 53

FIGURA 2 54

FIGURA 3 55

FIGURA 4 56

FIGURA 5 57

INTRODUZIONE

L'aspirina

L'aspirina è un inibitore irreversibile della ciclo-ossigenasi 1 (COX-1), l'enzima che catalizza la sintesi del trombossano A_2 a partire dall'acido arachidonico attraverso l'acetilazione del gruppo idrossilico del residuo di serina in posizione 529. Il trombossano A_2 lega i recettori per la trombossano/prostaglandino (TP) endoperossidasi. Questi a loro volta avviano una cascata di reazioni che esita nel cambiamento della forma della piastrina e in ultima analisi nel potenziamento dei meccanismi piastrinici di reclutamento e di aggregazione. L'aspirina dunque blocca la formazione piastrinica di trombossano A_2 e, in definitiva, riduce l'aggregazione piastrinica mediata dai recettori TP.

L'aspirina in prevenzione primaria

L'utilizzo dell'aspirina in prevenzione primaria è particolarmente controverso nei pazienti con diabete mellito. Nel 2007 l'American Diabetes Association (ADA) e l'American Heart Association (AHA) hanno prodotto un documento congiunto che raccomandava la somministrazione di una bassa dose di aspirina (75-162 mg al giorno) per la prevenzione primaria dei soggetti diabetici ad elevato rischio cardiovascolare (1). Questa pratica non è raccomandata dalle omologhe linee guida europee.

La maggior parte degli studi clinici che hanno valutato l'effetto dell'aspirina per la prevenzione primaria degli eventi cardiovascolari si è basata su popolazioni non selezionate di pazienti (2-7), mentre solo tre studi hanno posto la loro specifica attenzione sulla popolazione diabetica (8-10). Poiché questi studi non hanno fornito risultati univoci, diverse meta-analisi hanno cercato di riconciliarne il significato (11-14). In questo contesto assume particolare rilievo una meta-analisi di 9 studi clinici randomizzati eseguita con dati aggregati "patient-level" da un gruppo di esperti dell'ADA, dell'AHA e dell'American College of Cardiology Foundation (ACCF) con lo scopo ultimo di generare un documento di consenso (14). Complessivamente queste meta-analisi hanno suggerito che l'aspirina potrebbe determinare una modesta riduzione degli eventi cardiovascolari avversi (infarto del miocardio e ictus), ma i dati attualmente a disposizione sono comunque non conclusivi per raccomandarne l'uso in prevenzione primaria in tutti i pazienti con diabete mellito (14). Questa osservazione ha portato al generale consenso secondo cui una bassa dose di aspirina è raccomandata in prevenzione primaria nei pazienti diabetici ad alto rischio di eventi cardiovascolari (uomini sopra i 50 anni e donne sopra i 60 anni con un rischio di eventi avversi a 10 anni superiore al 10%), che al contempo non presentino un elevato rischio di sanguinamento. Alcuni studi in corso, come l'ASCEND (A Study of Cardiovascular Events iN Diabetes, NCT00135226) e l'ACCEPT-D (Aspirin and Simvastatin Combination for Cardiovascular Events Prevention Trial in Diabetes, ISRCTN48110081), forniranno ulteriori elementi per

comprendere il ruolo dell'aspirina in prevenzione primaria nei pazienti con diabete mellito.

L'aspirina in prevenzione secondaria

L'aspirina è il farmaco antiaggregante di scelta per la prevenzione secondaria degli eventi ischemici ricorrenti nei pazienti con manifestazioni aterotrombotiche della cardiopatia ischemica o sottoposti ad angioplastica percutanea. Il beneficio dell'aspirina nell'ambito delle sindromi coronariche acute è stato dimostrato in maniera incontrovertibile da numerosi studi condotti in pazienti con coronaropatia accertata. Due meta-analisi di studi di prevenzione secondaria eseguite dalla Antithrombotic Trialists' Collaboration, che includevano 212000 pazienti ad alto rischio (ovvero pazienti con malattia vascolare acuta o pregressa, o altre condizioni predisponenti che implicavano un aumento del rischio di malattia vascolare occlusiva), hanno supportato l'uso di una bassa dose di aspirina (15, 16). Queste meta-analisi hanno dimostrato che il benefito dei farmaci antiaggreganti orali non dipendeva dalla presenza o meno di diabete mellito (38 eventi vascolari avversi evitati ogni 1000 pazienti diabetici e 36 eventi avversi evitati ogni 1000 pazienti non diabetici), anche se l'incidenza complessiva di eventi vascolari era molto più elevata nei pazienti diabetici (15). L'aspirina è stato l'agente antiaggregante più studiato in queste meta-analisi, con dosi che spaziavano da 75 a 325 mg una volta al giorno. L'uso di una bassa dose di aspirina (75-150 mg al giorno) era efficace quanto l'uso

di dosi superiori, mentre le complicanze emorragiche diminuivano con le dosi più basse (15, 16).

Il primo studio prospettico randomizzato su larga scala che ha paragonato diversi dosaggi di aspirina è il CURRENT/OASIS 7 (Clopidogrel Optimal Loading Dose Usage to Reduce Recurrent Events-Organization to Assess Strategies in Ischemic Syndromes), che ha incluso pazienti con sindromi coronariche acute sottoposti a coronarografia entro 72 ore dall'arrivo in ospedale (17). Lo studio aveva un disegno fattoriale 2x2, e i pazienti venivano randomizzati in doppio cieco a dose alta o standard di clopidogrel per un mese e in open-label a dose alta (300-325 mg una volta al giorno) o bassa (75-100 mg una volta al giorno) di aspirina. Lo studio non ha dimostrato differenze significative in termini di efficacia tra le diverse dosi di aspirina. Era però presente un trend verso una maggiore incidenza di sanguinamenti gastrointestinali nel gruppo di pazienti che ricevevano un'alta dose di aspirina (0.38% vs 0.24%, $p = 0.051$) (17). Gli investigatori non hanno ancora rilasciato dati relativi al sottogruppo dei pazienti diabetici.

Resistenza all'aspirina e diabete mellito

Esiste un'evidenza crescente a favore dell'ipotesi di una relazione tra variabilità nella risposta agli agenti aggreganti e outcome clinici, secondo la quale la cosiddetta "resistenza" agli antiaggreganti orali potrebbe rivestire un ruolo importante nella definizione del rischio cardiovascolare. Poiché il rischio di eventi ischemici è

particolarmente elevato nei soggetti diabetici, è comprensibile un certo interesse nello studiare la modalità di risposta ai farmaci antitrombotici in questa popolazione ad alto rischio.

Nei pazienti "resistenti", l'agente antiaggregante fallisce nel bloccare il suo target specifico (ad esempio, nel caso dell'aspirina, l'enzima COX-1). La "resistenza ad un farmaco" è un reperto di laboratorio e non deve essere confuso con il "fallimento della terapia", ovvero la ricorrenza di un evento ischemico malgrado il trattamento. Diversi studi clinici hanno dimostrato l'esistenza di un'associazione tra resistenza all'aspirina e un rischio più elevato di eventi ischemici (18, 19). Questi studi tuttavia riportano prevalenze diverse in merito al fenomeno della resistenza all'aspirina. Ciò è dovuto essenzialmente a differenze che riguardano i test di aggregazione utilizzati, le definizioni di resistenza, le dosi di aspirina somministrate e le popolazioni considerate. Quando vengono utilizzati test specifici per l'enzima COX-1 (come ad esempio la determinazione del trombossano B_2 sierico o urinario, o test che usano l'acido arachidonico come agonista), la resistenza all'aspirina è un fenomeno di infrequente riscontro (20, 21). Il fatto che la prevalenza della resistenza all'aspirina sia maggiore quando si utilizzano test non specifici per il segnale mediato dalla COX-1 suggerisce chiaramente che questi test riflettono anche effetti indipendenti dalla COX-1.

La principale causa di resistenza all'aspirina individuata da test specifici per la COX-1 è la scarsa compliance del paziente. Il tipo di popolazione considerato è un

altro fattore che contribuisce a spiegare eventuali effetti ridotti dell'aspirina. Come già detto, i pazienti diabetici presentano elevati livelli di risposta inadeguata all'aspirina quando vengono utilizzati test non specifici per la COX-1. In questi pazienti si è ipotizzato che un aumento della dose di aspirina possa rappresentare un modo efficace per ridurre la resistenza. Questa ipotesi è stata supportata da una sotto-analisi dello studio ASPECT (Aspirin-Induced Platelet Effect), che ha paragonato l'effetto farmacodinamico di differenti regimi di aspirina in pazienti con e senza diabete mellito e ha mostrato una più alta percentuale di resistenza all'aspirina nei pazienti diabetici che assumevano la dose più bassa (81 mg una volta al giorno) (22). In questo studio l'aumento della dose di aspirina (162 mg e 325 al giorno) ha ridotto significativamente la reattività piastrinica dei pazienti diabetici.

Al momento non sono stati pubblicati studi mirati a stabilire l'efficacia clinica dell'aspirina e le implicazioni della resistenza all'aspirina nei pazienti diabetici con sindromi coronariche acute. Pochi studi inoltre hanno cercato di comprendere a fondo i meccanismi della resistenza all'aspirina che sono tipici dei soggetti diabetici. L'iperglicemia potrebbe rivestire un ruolo chiave per via della complessa interazione tra glicazione e acetilazione (23). La sintesi del trombossano A_2 è tipicamente aumentata nei soggetti diabetici, e uno stretto controllo metabolico è associato a riduzioni della concentrazione di trombossano A_2 (24). Ciò potrebbe essere correlato alla ridotta risposta all'aspirina osservata nei pazienti con diabete mellito e scadente controllo glicemico (25). Una elevata sintesi di trombossano A_2 potrebbe anche

essere attribuibile ad un aumento del turnover delle piastrine nei soggetti con diabete. Questo aspetto, che è centrale ai fini del presente studio, verrà ulteriormente affrontato più avanti.

L'attivazione dei recettori TP ha determinato un certo interesse nello sviluppo di nuovi inibitori farmacologici. La picotamide è un inibitore sia della trombossano A_2 sintetasi sia dei recettori TP, ed è capace di bloccare gli effetti del trombossano A_2 generati attraverso eventuali meccanismi di fuga ("escape") dalla COX-1, che potrebbero essere esaltati nei soggetti resistenti all'aspirina. Lo studio DAVID (Drug Evaluation in Atherosclerotic Vascular Disease in Diabetics) ha randomizzato pazienti diabetici con malattia arteriosa periferica (n = 1209) a ricevere o picotamide (600 mg due volte al giorno) o aspirina (320 mg una volta al giorno più placebo una volta al giorno) per 24 mesi. In questo studio l'incidenza cumulativa di morte a 2 anni (end point primario) è stata significativamente più bassa tra i pazienti trattati con picotamide rispetto a quelli trattati con aspirina (3.0% vs 5.5%, $p = 0.0474$). Nessuna differenza è stata osservata rispetto all'endpoint secondario combinato di morte ed eventi ischemici non fatali (26).

Altri nuovi agenti farmacologici che mirano alla via metabolica del trombossano A_2, come il ridogrel, il ramatroban, l'NCX4016 e il si8886/terutroban sono stati e sono oggetto di studio. Alcuni di questi sono già stati confrontati con l'aspirina in diversi scenari clinici con esito variabile, ma potrebbero rappresentare un'opzione assai interessante nel futuro per il trattamento dei soggetti diabetici (27-30).

RAZIONALE E SCOPO DELLO STUDIO

L'aspirina è dunque l'agente aggregante di prima linea per la prevenzione secondaria degli eventi cardiovascolari nei pazienti con diabete mellito di tipo II. Questi pazienti presentano un'aumentata reattività piastrinica e una risposta farmacodinamica ridotta all'aspirina rispetto ai pazienti non diabetici (31, 32). Ciò può contribuire a spiegare il loro aumentato rischio di eventi aterotrombotici ricorrenti nonostante l'assunzione di aspirina (31, 32). Come già detto, diversi meccanismi potrebbero essere coinvolti nei variabili profili di risposta farmacodinamica agli agenti antiaggreganti nei pazienti con diabete mellito di tipo II. Tra questi potrebbero rivestire un ruolo importante la ridotta sopravvivenza e l'aumentato turnover delle piastrine, con conseguente accentuata rigenerazione a partire da progenitori megacariocitici rispetto a quanto comunemente osservato nei soggetti non diabetici (33, 34).

È noto che le piastrine più giovani sono iper-reattive rispetto a quelle più mature (35, 36). L'aspirina ha un'emivita di soli 20 minuti, per cui l'accelerata trombopoiesi che caratterizza i pazienti con diabete mellito di tipo II non consente alle nuove piastrine che entrano nel torrente circolatorio di essere sufficientemente esposte all'azione dell'aspirina (34, 37, 38). Ciò potrebbe portare ad una considerevole proporzione di piastrine circolanti con attività della COX-1 non adeguatamente inibita, che continuerebbero quindi a generare elevati livelli di trombossano A_2 e

dunque a promuovere l'attivazione delle piastrine circolanti (38, 39). Complessivamente, questo potrebbe spiegare come mai la resistenza all'aspirina rappresenti una caratteristica comune nei pazienti con diabete mellito di tipo II, nei quali contribuisce ad incrementare il rischio futuro di eventi cardiovascolari avversi (31, 32, 40, 41).

La dose di aspirina raccomandata dalle linee guida AHA/ACCF per la prevenzione secondaria degli eventi cardiovascolari di natura ischemica dalle linee guida e in base a queste attualmente utilizzata nella pratica clinica negli Stati Uniti varia da 75 a 325 mg al giorno (42). Anche se studi *in vitro* hanno dimostrato che dosi di aspirina inferiori a questo intervallo sono già sufficienti a determinare una piena inibizione dell'enzima COX-1 (37), studi farmacodinamici *ex vivo* hanno suggerito che pazienti ad alto rischio, come quelli con diabete mellito di tipo II, possono andare incontro a migliori risposte farmacodinamiche con l'impiego di dosi più elevate di aspirina (22). Tuttavia, il regime posologico associato con la migliore risposta farmacodinamica nei pazienti con diabete mellito di tipo II è ancora oggetto di dibattito. Poiché le piastrine dei pazienti diabetici sono caratterizzate da un più elevato turnover, si potrebbe ipotizzare che un incremento della frequenza di somministrazione, anziché della dose dell'aspirina, rappresenti una strategia d'inibizione piastrinica più efficace nei pazienti diabetici, attraverso il blocco dell'enzima COX-1 delle piastrine di più recente generazione. Tuttavia, come diversi regimi posologici possano avere un impatto sugli effetti farmacodinamici

dell'aspirina nei pazienti con diabete mellito di tipo II è stato finora scarsamente oggetto di sperimentazione. Lo scopo del presente studio è stato quindi di comprendere se e come l'incremento della frequenza di somministrazione dell'aspirina, pur rimanendo nell'ambito del range giornaliero correntemente raccomandato dalle linee guida americane, possa determinare delle variazioni della risposta antiaggregante nei pazienti con diabete mellito di tipo II e cardiopatia ischemica.

METODI

L'oggetto della presente tesi sperimentale è uno studio prospettico, "open-label", nel quale la funzione piastrinica è stata misurata in pazienti con diabete mellito di tipo II e cardiopatia ischemica stabile di età compresa tra i 18 e i 75 anni trattati con terapia medica (insulina e/o farmaci ipoglicemizzanti orali). La diagnosi di diabete mellito di tipo II è stata posta sulla base dei criteri definiti dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (43). Tutti i pazienti avevano una malattia coronarica angiograficamente documentata. La stabilità della presentazione clinica è stata definita in base all'assenza di variazioni nella sintomatologia ischemica, di necessità di ricorrere a riospedalizzazioni o a rivascolarizzazione coronarica (percutanea o chirurgica) nel corso degli ultimi 12 mesi. La coorte oggetto dello studio è stata reclutata tra i pazienti afferenti alla Divisione di Cardiologia dell'Ospedale "Shands" di Jacksonville (Florida).

Disegno sperimentale e criteri di inclusione

I pazienti venivano considerati elegibili per lo studio se assumevano 81 mg di aspirina al giorno da almeno 7 giorni. Ai pazienti potenzialmente elegibili che assumevano una differente dose di aspirina veniva prescritto un regime di 81 mg al giorno di aspirina per almeno 7 giorni prima dell'esecuzione dei test farmacodinamici. Dopo la somministrazione di 81 mg di aspirina una volta al giorno per almeno una settimana, i pazienti partecipanti allo studio hanno modificato il loro

regime posologico di aspirina ogni settimana secondo lo schema seguente: 81 mg due volte al giorno (bid) per una settimana; 162 mg una volta al giorno (od) per una settimana; 162 mg/bid per una settimana; 325 mg/od per una settimana. I test farmacodinamici sono stati eseguiti al termine di ciascuna sequenza, per un totale di 5 punti temporali. Al termine dell'intera sequenza, i pazienti hanno ripreso il regime di aspirina originario che era stato loro prescritto prima dell'inclusione nello studio.

Criteri di esclusione

I criteri di esclusione comprendevono discrasie ematologiche o diatesi emorragiche; terapia anticoagulante orale con warfarin o acenocumarolo; recente trattamento antiaggregante (< 30 giorni) con un antagonista delle glicoproteine IIb/IIIa, una tienopiridina (ticlopidina, clopidogrel, prasugrel), cilostazolo o dipiridamolo; conta piastrinica < $100*10^6$ μL; storia di sanguinamento gastrointestinale nell'arco degli ultimi 6 mesi; storia di ictus o attacco ischemico transitorio nel corso degli ultimi 3 mesi; storia di ospedalizzazione per sindrome coronarica acuta o rivascolarizzazione coronarica (percutanea o chirurgica) nel corso degli ultimi 12 mesi; sanguinamento attivo o instabilità emodinamica; qualsiasi neoplasia attiva; creatinina sierica > 2 mg/dL; ALT > 2.5 volte il limite superiore della norma; gravidanza in atto; emoglobina glicosilata > 10%; uso di farmaci anti-infiammatori non steroidei nel corso degli ultimi 10 giorni. Lo studio si è svolto secondo le regole stabilite dalla Dichiarazione di Helsinki ed è stato approvato dal

Comitato Etico dell'Università della Florida, Collegio di Medicina, Jacksonville. Tutti i soggetti arruolati hanno firmato un consenso informato. Una commissione indipendente ha monitorato la sicurezza dei soggetti coinvolti e aggiudicato gli eventi clinici avversi.

Prelievi ematici

I prelievi ematici per ciascun test farmacodinamico sono stati eseguiti alla fine delle 5 differenti fasi di trattamento, come segue: 1) dopo almeno una settimana di 81 mg/od di aspirina; 2) dopo una settimana di 81 mg/bid di aspirina; 3) dopo una settimana di 162 mg/od di aspirina; 4) dopo una settimana di 162 mg/bid di aspirina; 5) dopo una settimana di 325 mg/od di aspirina. I pazienti che assumevano una dose singola al giorno di aspirina venivano istruiti affinchè ingerissero la compressa tra le 8.00 e le 10.00 del mattino. I pazienti che assumevano una doppia dose di aspirina venivano istruiti affinchè ingerissero le compresse tra le 8.00 e le 10.00 del mattino e le 8.00 e le 10.00 della sera. Il giorno della visita programmata ai pazienti veniva richiesto di non assumere aspirina prima dell'esecuzione del prelievo di sangue. L'aderenza alla terapia prescritta è stata verificata tramite anamnesi farmacologica e conteggio delle compresse. I prelievi ematici per i test di funzionalità piastrinica sono stati praticati da una vena antecubitale mediante un ago da 21 gauge tra le 8.00 e le 10.00 del mattino del giorno prefissato per la visita. I primi 2-4 mL di sangue sono stati scartati per evitare fenomeni di attivazione piastrinica spontanea, e i campioni sono stati processati entro 1 ora da personale specializzato di laboratorio,

che ignorava il regime di trattamento del paziente. I test di funzionalità piastrinica utilizzati sono stati l'aggregometria a trasmissione ottica, il Verify-Now "Aspirin" e la determinazione del metabolita sierico trombossano B_2.

Aggregometria a trasmissione ottica

L'aggregometria a trasmissione ottica è stata eseguita secondo protocolli standard già descritti altrove (44, 45). Brevemente, l'aggregazione delle piastrine è stata misurata utilizzando plasma ricco di piastrine e plasma povero di piastrine con il metodo turbidometrico, attraverso un aggregometro a due canali (Chrono-Log 490, Chrono-Log Corp, Havertown, PA). Per ciascun test, la trasmissione ottica è stata settata a 0% per il plasma ricco di piastrine e 100% per il plasma povero di piastrine. L'aggregazione massima delle piastrine è stata misurata dopo stimolo con acido arachidonico (1 mmol/L), collageno (2 μg/mL) e due dosi di adenosina difosfato (ADP) (5 μmol/L e 20 μmol/L).

Verify-Now

Il test Verify-Now "Aspirin" è un rapido strumento *point-of-care* a sangue intero che è stato utilizzato secondo le istruzioni della ditta produttrice (Accumetrics Inc, San Diego, CA), come descritto in precedenza (45). Brevemente, il VerifyNow mima l'aggregazione turbidometrica e usa cartucce preconfezionate che contengono acido arachidonico. Il test VerifyNow riporta i risultati in termini di "aspirin reaction

units" (ARU). I valori di ARU diminuiscono all'aumentare dell'inibizione piastrinica indotta dall'aspirina.

Trombossano sierico

La concentrazione di trombossano sierico B_2 è stata misurata utilizzando il kit TXB_2 EIA (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI) in base alle istruzioni della ditta produttrice (46). In breve, i campioni sono stati tamponati per portare le loro concentrazioni entro il range della curva standard. Non è stata eseguita alcuna ulteriore purificazione. La curva standard è stata settata mediante diluizioni seriate del trombossano sierico tra 1000 pg/mL e 7.8 pg/mL utilizzando il tampone EIA come matrice. La concentrazione di trombossano sierico dei campioni è stata calcolata mediante un adattamento logistico multiparametrico delle concentrazioni standard contro la percentuale legata sulla massima capacità legante.

Analisi statistica

Le variabili continue sono state espresse come media ± deviazione standard e sono state confrontate utilizzando il test ANOVA per misure ripetute. La normalità della distribuzione campionaria è stata valutata per le variabili continue utlizzando il test di Shapiro-Wilk. Le variabili categoriche sono state espresse come numeri e percentuale e confrontate utilizzando il test chi-quadrato, di Fischer o di Cochran Q, in base al bisogno. Una $p < 0.05$ è stata considerata statisticamente significativa.

Tutti i dati sono stati processati utilizzando il software Statistical Package of Social Sciences versione 16 (SPSS, Chicago, IL).

L'aggregazione indotta dal collageno è stata scelta per la stima del campione di questo studio. Infatti, anche se l'aggregometria a trasmissione ottica dopo stimolo con acido arachidonico di fatto rappresenta il test più specifico per valutare l'attività dell'enzima COX-1, è ben chiaro che nei pazienti aderenti alla terapia con aspirina esiste una variabilità farmacodinamica molto limitata, poiché l'attività dell'enzima COX-1 è pienamente soppressa. Pertanto questo parametro non è considerato l'ideale per testare gli effetti indotti dall'aspirina sui profili di funzione piastrinica (20, 44, 45, 47). In questo studio l'aggregazione piastrinica indotta dall'acido arachidonico è stata utilizzata come marcatore per garantire l'adesione di tutti i pazienti alla prescrizione di aspirina, dove per aderenza si è intesa un'aggregazione piastrinica massima < 20% (44, 45, 48, 49).

Il collageno attiva la posfolipasi A_2, consentendo il rilascio dell'acido arachidonico dalle membrane dei fosfolipidi, primo passo nel processo che porta al rilascio di trombossano A_2. (48, 49). L'aggregazione indotta dal collageno è stata dunque spesso usata come marcatore per definire gli effetti antiaggreganti indotti dall'aspirina e per questo considerata per il calcolo del potere statistico di questo studio (11, 15, 48, 50). Sulla base di una ipotetica deviazione standard del 20% per la vera differenza tra l'aggregazione piastrinica indotta dal collageno in base all'aggregometria a trasmissione ottica nei pazienti trattati con 81 mg/od di aspirina

versus 81 mg/bid, i calcoli si sono basati su un potere dell'80% e un livello di significatività del 5%. Usando questi parametri, è stato determinato che un campione di 20 pazienti sarebbe stato sufficiente a dimostrare una differenza del 20% in termini di aggregazione indotta dal collageno tra i pazienti trattati con 81 mg/od e quelli trattati con 81 mg/bid di aspirina.

RISULTATI

Un totale di 82 pazienti con diabete mellito di tipo II è stato preso in considerazione tra Gennaio 2009 e Aprile 2010. Di questi pazienti, 34 presentavano criteri di esclusione per la partecipazione allo studio. Dei rimanenti 48 corrispondenti ai criteri di inclusione, 36 hanno scelto di firmare il modulo di consenso informato. Di questi ultimi, 16 non hanno completato tutte e 5 le fasi di trattamento previste dal protocollo. In conclusione, un totale di 20 pazienti ha completato tutte le fasi dello studio, costituendo l'oggetto della presente analisi. La **Figura 1** riassume il processo di selezione dei pazienti all'interno dello studio.

La **Tabella 1** riporta la caratteristiche demografiche e cliniche di base della popolazione analizzata. L'età media dei pazienti era di 59 anni, il sesso era maschile nella metà dei casi e il diabete era insulino-dipendente nel 40% dei casi. I pazienti assumevano farmaci beta-bloccanti nel 55%, ACE-inibitori nel 90%, calcio-antagonisti nel 55% e statine nel 40% dei casi. La conta piastrinica media era di $241*10^3/mm^3$, l'ematocrito medio era pari a 42%, il valore medio di emoglobina glicosilata era 7.1% e la creatinina sierica media era 1.0 g/dL.

Aggregometria a trasmissione ottica

Aggregazione piastrinica indotta dall'acido arachidonico

L'aggregazione piastrinica indotta dall'acido arachidonico si è rivelata minima in tutte le fasi dello studio e non si è osservato nessun effetto significativo legato all'aumento di una dose singola (**Tabella 2**) o doppia (**Tabella 3**) di aspirina. In aggiunta, non si è osservato nessun effetto legato al frazionamento della dose di aspirina (**Tabella 4**). Tutti i valori di aggregazione piastrinica massima misurati in ogni fase dello studio e per tutti i regimi posologici si sono rivelati inferiori al 20%, suggerendo e confermando l'aderenza dei pazienti alla terapia con aspirina.

Aggregazione piastrinica indotta dal collageno

Somministrata una sola volta al giorno, l'aspirina non ha esercitato alcun effetto dose-dipendente in termini di aggregometria ottica indotta da 2 µg/mL di collageno (**Tabella 2**). Tuttavia, nei casi in cui l'aspirina veniva aumentata per mezzo di una seconda somministrazione giornaliera è stata riscontrata una differenza significativa tra 81 mg od e 81 mg bid (obiettivo primario dello studio) (**Figura 2A**), tra 81 mg od e 162 mg bid (**Figura 2B**) e tra 162 mg od e 162 mg bid (**Figura 2C**). Non è stata invece riscontrata alcuna differenza significativa in termini di effetto antipiastrinico tra 81 mg e 162 mg somministrati due volte al giorno (**Tabella 3**). Inoltre, non si è osservato alcun effetto legato alla somministrazione giornaliera refratta di dosi da 162 mg o 325 mg (**Tabella 4**).

Aggregazione piastrinica indotta dall'ADP

Nei casi in cui l'aspirina veniva somministrata in un'unica soluzione, non si è notato un effetto dose-dipendente in termini di aggregometria ottica indotta da 5 µmol/L di ADP (**Tabella 2**). Allo stesso modo, non è stato osservato un effetto dose-dipendente sull'aggregazione piastrinica dopo l'induzione con 20 µmol/L di ADP in caso di mono-somministrazione giornaliera, con l'eccezione del caso in cui i pazienti ricevevano 162 mg od rispetto a 81 mg od. Nei casi in cui la dose veniva aumentata per mezzo di una seconda somministrazione giornaliera di aspirina, non è stato notato alcun effetto significativo in termini di aggregazione piastrinica indotta da 5 o 20 µmol/L di ADP tra 81 mg od e 81 mg bid (49±13 vs 54±13, $p = 0.203$ e 66±7 vs 69±10, $p = 0.339$) tra 81 mg od e 162 mg bid (49±13 vs 50±15, $p = 0.507$ e 66±7 vs 67±14, $p = 0.847$) e tra 162 mg od e 162 mg bid (54±10 vs 50±15, $p = 0.247$ e 71±11 vs 67±14, $p = 0.225$). Non è stato inoltre notato alcun effetto tra gli effetti antipiastrinici di una doppia somministrazione di 81 mg o 162 mg (**Tabella 3**). Infine, non è stato notato alcun effetto legato al frazionamento di dosi giornaliere da 162 mg o 325 mg (**Tabella 4**).

Verify-Now

Somministrata una sola volta al giorno, l'aspirina non ha esercitato alcun effetto dose-dipendente in termini di risposta misurata dal VerifyNow (**Tabella 2**). Nei casi in cui la dose veniva aumentata per mezzo di una seconda somministrazione

giornaliera, un effetto significativo è stato riscontrato tra 81 mg od e 81 mg bid (**Figura 3A**) e tra 81 mg od e 162 mg bid (**Figura 3B**). Non è stata notata alcuna differenza significativa legata al raddoppio della dose di aspirina da 162 mg od a 162 mg bid (**Figura 3C**). Non è stato inoltre notato alcun effetto legato alla somministrazione di una doppia dose giornaliera di 81 mg o 162 mg (**Tabella 3**). Infine, non si sono riscontrate differenze legate al frazionamento di una dose di 162 mg o 325 mg (**Tabella 4**).

Trombossano sierico

I livelli di trombossano si sono ridotti in una maniera dose-dipendente ($p = 0.003$) attraverso i vari regimi posologici dello studio (**Figura 4**). In particolare, i livelli di trombossano sono diminuiti all'incremento della dose giornaliera di aspirina (**Tabella 2**). Nei casi in cui la dose veniva aumentata per mezzo di una seconda somministrazione giornaliera, un effetto significativo è stato riscontrato tra 81 mg od e 81 mg bid (107±143 vs. 34±50, $p = 0.048$) e tra 81 mg od e 162 mg bid (107±143 vs. 19±21, $p = 0.017$). I livelli di trombossano sierico sono risultati ridotti, anche se non significativamente, nel passaggio da 162 mg od a 162 bid (41±79 vs. 19±21, $p = 0.213$). Non si sono inoltre riscontrate differenze significative nei livelli di trombossano sierico tra le dosi di 81 mg e 162 mg somministrate due volte al giorno (**Tabella 3**). Infine, non si è osservato alcun effetto legato al frazionamento di dosi giornaliere di 162 mg o 325 mg (**Tabella 4**).

DISCUSSIONE

La posologia ottimale dell'aspirina per la prevenzione secondaria degli eventi ischemici cardiovascolari è attualmente oggetto di una controversia. Alcuni studi hanno suggerito il bisogno di ricorrere a diversi regimi di somministrazione personalizzati sulla base del rischio trombotico individuale del paziente (51, 52). I pazienti affetti da diabete mellito di tipo II presentano specifiche anomalie della funzionalità piastrinica, caratteristica che li rende un target ideale per stabilire se una variazione dei regimi posologici dell'aspirina può determinare un impatto significativo sui profili di risposta farmacodinamica (31, 32). Si stanno ormai accumulando le evidenze che dimostrano come marcatori farmacodinamici usati per misurare gli effetti dei farmaci antiaggreganti, compresa l'aspirina, siano associati con importanti implicazioni prognostiche, aspetti questi che sottolineano ulteriormente la necessità di perseguire un'ottimale antiaggregazione dei pazienti con cardiopatia ischemica (53, 54). Lo studio oggetto della presente tesi dimostra che l'aggiunta di una seconda dose giornaliera di 81 mg di aspirina è associata con una riduzione della reattività piastrinica rispetto all'assunzione di una singola dose di 81 mg, sulla scorta di una serie di test sensibili agli effetti piastrinici indotti dall'aspirina (aggregometria a trasmissione ottica e Verify-Now). Usando questi test non è stato notato alcun effetto dose-dipendente sulla reattività delle piastrine quando la dose è stata raddoppiata da 81 mg a 162 mg in mono-somministrazione. Complessivamente, questi risultati suggeriscono che aumentare la frequenza di somministrazione

dell'aspirina, anziché la dose, consente di ottenere effetti antiaggreganti più marcati. Queste osservazioni farmacodinamiche possono dunque dare forza all'ipotesi per cui la somministrazione di una seconda dose separata di aspirina inibisce la piastrine di recente generazione e introduzione del torrente circolatorio, potenziando quindi gli effetti antitrombotici del farmaco.

Diversi meccanismi sono stati chiamati in causa per spiegare perché i pazienti con diabete mellito di tipo II presentano un rischio maggiore di andare incontro a eventi cardiovascolari rispetto alla controparte non affetta da diabete (31, 32). L'aumentato turnover contribuisce alla determinazione di uno stato piastrinico iper-reattivo nei soggetti diabetici (33, 34). Ogni giorno, in condizioni normali, circa il 10-15% delle piastrine circolanti viene rigenerato. Rispetto ai soggetti non diabetici, i diabetici presentano un numero più elevato di piastrine giovani di grandi dimensioni e ipersensibili agli agonisti e una frazione abbondante di piastrine più mature con funzione aggregante ridotta (35, 36). L'aspirina determina una acetilazione irreversibile con conseguente inattivazione dell'enzima COX-1 presente nelle piastrine circolanti, con un'emivita di soli 20 minuti (37). Esiste quindi la possibilità teorica che una singola dose non sia sufficiente a determinare un pieno effetto inibitorio sulle piastrine generate da poco e rilasciate dal midollo osseo nel corso delle 24 ore successive all'assunzione dell'aspirina (**Figura 5**). In aggiunta, le piastrine acetilate rimangono sensibili ad altri stimoli generati da piastrine non acetilate, tra cui il trombossano (33, 34, 40). In questo contesto, questo studio ha

testato l'ipotesi secondo cui un incremento della frequenza di somministrazione del farmaco possa inibire più efficacemente le piastrine di recente generazione contribuendo quindi a migliorare gli effetti farmacodinamici indotti dall'aspirina.

Sono stati usati diversi regimi entro il range raccomandato dalle linee guide americane. Tutte le dose di aspirina e tutti i regimi di somministrazione si sono rivelati efficaci nel determinare una appropriata inibizione dell'attività della COX-1, sulla base dei risultati dell'aggregometria ottica dopo induzione con acido arachidonico. Questi risultati sono in linea con precedenti studi farmacodinamici che hanno dimostrato che basse dosi di aspirina, persino più basse di quelle comunemente usate nella pratica clinica, sono sufficienti ad inibire pienamente l'attività della COX-1 (20, 37, 44, 45, 47). Questi risultati testimoniano inoltre indirettamente a favore dell'aderenza dei pazienti al regime con aspirina. A causa di questa attesa risposta piastrinica all'acido arachidonico, il potere statistico di questo studio è stato mirato a identificare differenze più significative elicitate da test sensibili agli effetti dell'aspirina, anche se non COX-1 specifici, come l'aggregometria ottica indotta dal collageno, che possono mostrare profili di risposta farmacodinamica più variabili. Questa scelta è stata guidata dalla nozione che l'aspirina gioca un ruolo importante nella variazione della risposta piastrinica anche a stimoli diversi dall'acido arachidonico (41). Quest'ultima ha anche suggerito che l'aspirina potrebbe avere effetti indipendenti dalla COX-1, più suscettibili a variazioni del dosaggio di quanto non accada per bloccare l'attività COX-1, come

del resto mostrato da questo studio. L'attivazione delle piastrine per mezzo del collageno, in particolare, attiva la fosfolipasi A_2 con liberazione di acido arachidonico dalle membrane dei fosfolipidi e successivo rilascio di trombossano A_2. In questo studio l'incremento della dose di aspirina ha rappresentato una strategia di successo nel determinare una più marcata inibizione delle piastrine dei pazienti diabetici con cardiopatia ischemica quando veniva impiegato un regime che prevedeva una doppia somministrazione giornaliera (secondo aggregometria ottica indotta dal collageno e Verify-Now). In particolare, rispetto ad una singola somministrazione, una seconda somministrazione determina una riduzione della reattività piastrinica indipendentemente dal fatto che venga impiegata una seconda dose da 81 mg o 162 mg. L'assenza di variazioni dell'aggregazione piastrinica secondo l'aggregometria ottica indotta dall'ADP è in linea con studi precedenti condotti in pazienti diabetici (22). La scarsa sensibilità dell'aspirina nel modulare l'attivazione e l'aggregazione piastrinica mediata dall'ADP, e il ruolo centrale di questa via metabolica anch'essa iper-espressa nei soggetti diabetici, potrebbero spiegare il marcato beneficio che farmaci inibitori del recettore piastrinico $P2Y_{12}$ per l'ADP (clopidogrel, prasugrel o ticagrelor) esercitano rispetto all'aspirina nei pazienti diabetici (55).

I risultati di questo studio condotto con test sensibili all'aspirina sono in contrasto con quelli della già citata sotto-analisi dello studio ASPECT, che ha dimostrato un aumentato effetto inibitorio sull'aggregazione indotta dal collageno mediante

l'incremento della dose di aspirina da 81 mg/od a 162 mg/od o 325 mg/od, senza differenze significative tra queste due ultime dosi (22). I valori di ARU erano inoltre ridotti solo quando la dose passava a 325 mg/od. La natura "post-hoc" di quello studio e il fatto che fosse limitato a regimi in mono-somministrazione senza studiare l'effetto di un aumento della frequenza di somministrazione potrebbero spiegare questi risultati discordanti. Il presente studio rappresenta la prima evidenza disponibile che la somministrazione di una seconda dose giornaliera di aspirina è associata con migliori effetti farmacodinamici.

Un'ulteriore risultato di questo studio è legato all'osservazione di un effetto dose-dipendente dell'aspirina sulla generazione del trombossano, misurata in termini di livelli sierici di trombossano B_2. Dosi di 162 mg e 325 mg di aspirina hanno determinato un impatto più significativo sui livelli di trombossano B_2 rispetto alla dose di 81 mg, indipendentemente dal fatto che queste dosi venissero somministrate in un'unica soluzione o separate. Questi risultati apparentemente in contrasto con i dati farmacodinamici relativi all'aggregazione piastrinica indotta dal collageno e al Verify-Now potrebbero indicare un differente effetto dell'aspirina sulle piastrine in base ai loro differenti stadi di maturazione. E' stato suggerito che l'aspirina si può accumulare nel midollo osseo, dove continuerebbe ad esercitare i suoi effetti di inibizione dell'enzima COX-1 dei megacariociti (56). Di conseguenza, un effetto cumulativo dell'aspirina sui megacariociti localizzati nel midollo osseo potrebbe determinare una riduzione dose-dipendente dei livelli di trombossano. Diversamente,

una simile evenienza non si verifica quando vengono prese in considerazione le piastrine circolanti mature soggette ad un turnover più rapido.

Il dosaggio ottimale dell'aspirina nella prevenzione secondaria degli eventi cardiovascolari nei soggetti diabetici non è stato ancora del tutto definito sulla base di un grande e specifico studio clinico randomizzato. Dati provenienti da grandi registri osservazionali hanno dimostrato che bassi dosaggi (da 75 a 150 mg) sono associati con un significativo vantaggio in termine di riduzione degli effetti ischemici (15, 16). Alti dosaggi di aspirina sono associati con un incremento del rischio di sanguinamento, che oscura i vantaggi anti-ischemici (15, 16).

Un altro punto da considerare riguarda il fatto che il beneficio anti-ischemico di un'alta dose di aspirina potrebbe essere bilanciato dalla concomitante inibizione dell'enzima COX-2, con conseguente riduzione della produzione di prostaglandine I_2 (57). Recentemente, lo studio CURRENT-OASIS 7 è stato il primo trial a paragonare su larga scala un alto dosaggio (da 300 a 325 mg al giorno) e un basso dosaggio (da 75 a 81 mg) di aspirina, senza dimostrare differenze in termini di efficacia a 30 giorni tra i due regimi, mentre nel gruppo trattato con un alto dosaggio è stato osservato un trend verso un aumento significativo dei sanguinamenti gastrointestinali (17). Anche se i risultati di questo studio supportano l'ipotesi per cui una doppia somministrazione giornaliera di una bassa dose di aspirina è associata con un'aumentata risposta inibitoria piastrinica, probabilmente per l'effetto positivo sull'aumentato turnover delle piastrine osservato in pazienti con diabete mellito di

tipo II, sono necessari grandi studi clinici randomizzati per stabilire se questo approccio è davvero sicuro ed efficace.

Limiti dello studio

Questo studio pilota include un piccolo numero di pazienti, cosa che ha limitato la possibilità di eseguire un aggiustamento statistico che tenesse conto del numero di test utilizzati. Poiché sono stati paragonati 5 gruppi e sono stati effettuati 9 di 10 potenziali confronti, sarebbe stato più indicato utilizzare un valore di p più conservativo (ad esempio, 0.05/10 = 0.005) al fine di ridurre il rischio di incorrere in un errore di I tipo (ovvero accettare un risultato falsamente positivo). Tuttavia, considerando il carattere esploratorio di questa analisi, si è scelto deliberatamente di non eseguire un aggiustamento per paragoni multipli (ad esempio, la correzione di Bonferroni) al fine di evitare di incorrere in errori di II tipo (ovvero accettare un risultato falsamente negativo), perdendo dunque di vista importanti informazioni pilota di potenziale valore e meritevoli di eventuale validazione in studi dotati di un campione più numeroso. In aggiunta, questo studio ha testato 5 diverse posologie di aspirina in maniera sequenziale, senza prevedere fasi di *washout*, generando quindi la possibilità di un effetto *carry-over*. Tuttavia, la selezione della stessa coorte di pazienti per l'esecuzione di questo studio farmacodinamico aiuta a superare le multiple e imprevedibili caratteristiche che potrebbero caratterizzare la risposta individuale ad agenti antiaggreganti, che in uno studio pilota deve essere necessariamente ridotta al minimo. La durata del trattamento con ciascun regime

posologico di aspirina è stata sufficiente a consentire il turnover delle piastrine circolanti e la generazione di nuove piastrine, consentendo a quest'ultime di essere sufficientemente esposte al nuovo regime terapeutico, limitando dunque l'effetto carry-over. Infine, si potrebbe obiettare che una doppia somministrazione giornaliera potrebbe essere di maggiore beneficio in un sottogruppo di pazienti con livelli basali di turnover al di sopra di un certo limite. Tuttavia, non esistono limiti chiari per identificare questi pazienti, e a questo scopo sarebbero necessari studi dedicati. Un altro aspetto da indagare più nel dettaglio riguarda la modalità con cui è stato ottenuto il controllo della glicemia nei pazienti con diabete mellito di tipo II (uso di insulina contro uso di ipoglicemizzanti orali). Questo studio farmacodinamico supporta il razionale per cui l'aspirina dovrebbe essere somministrata due volte al giorno nei pazienti con diabete mellito di tipo II e cardiopatia ischemica, gettando le basi per studi successivi in questo filone di ricerca.

CONCLUSIONI

Differenti regimi di somministrazione dell'aspirina corrispondono a differenti effetti farmacodinamici nei pazienti con diabete mellito di tipo II e cardiopatia ischemica. In particolare, la somministrazione di una doppia, bassa dose di aspirina è associata con una più marcata inibizione piastrinica rispetto alla mono-somministrazione, mentre un effetto dose-dipendente si osserva sui livelli di trombossano sierico. Le implicazioni cliniche di una variazione della posologia dell'aspirina finalizzata al trattamento specifico del paziente diabetico meritano ulteriore approfondimento in studi dedicati.

BIBLIOGRAFIA

1. Rydén L, Standl E, Bartnik M, Van den Berghe G, Betteridge J, de Boer MJ, Cosentino F, Jönsson B, Laakso M, Malmberg K, Priori S, Ostergren J, Tuomilehto J, Thrainsdottir I, Vanhorebeek I, Stramba-Badiale M, Lindgren P, Qiao Q, Priori SG, Blanc JJ, Budaj A, Camm J, Dean V, Deckers J, Dickstein K, Lekakis J, McGregor K, Metra M, Morais J, Osterspey A, Tamargo J, Zamorano JL, Deckers JW, Bertrand M, Charbonnel B, Erdmann E, Ferrannini E, Flyvbjerg A, Gohlke H, Juanatey JR, Graham I, Monteiro PF, Parhofer K, Pyörälä K, Raz I, Schernthaner G, Volpe M, Wood D; Task Force on Diabetes and Cardiovascular Diseases of the European Society of Cardiology (ESC); European Association for the Study of Diabetes (EASD). Guidelines on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases: executive summary. The Task Force on Diabetes and Cardiovascular Diseases of the European Society of Cardiology (ESC) and of the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *Eur Heart J* 2007; 28: 88–136.

2. Peto R, Gray R, Collins R, Wheatley K, Hennekens C, Jamrozik K, Warlow C, Hafner B, Thompson E, Norton S. Randomised trial of prophylactic daily aspirin in British male doctors. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1988; 296: 313–316.

3. Anon. Final report on the aspirin component of the ongoing Physicians' Health Study. Steering Committee of the Physicians' Health Study Research Group. *N Engl J Med* 1989; 321: 129–135.

4. Hansson L, Zanchetti A, Carruthers SG, Dahlöf B, Elmfeldt D, Julius S, Ménard J, Rahn KH, Wedel H, Westerling S. Effects of intensive blood-pressure lowering and low-dose aspirin in patients with hypertension: principal results of the Hypertension Optimal Treatment (HOT) randomised trial. HOT Study Group. *Lancet* 1998; 351: 1755–1762.

5. Anon. Thrombosis prevention trial: randomised trial of low-intensity oral anticoagulation with warfarin and low-dose aspirin in the primary prevention of ischaemic heart disease in men at increased risk. The Medical Research Council's General Practice Research Framework. *Lancet* 1998; 351: 233–241.

6. Sacco M, Pellegrini F, Roncaglioni MC, Avanzini F, Tognoni G, Nicolucci A; PPP Collaborative Group. Primary prevention of cardiovascular events with low-dose aspirin and vitamin E in type 2 diabetic patients: results of the Primary Prevention Project (PPP) trial. *Diabetes Care* 2003; 26: 3264–3272.

7. Ridker PM, Cook NR, Lee IM, Gordon D, Gaziano JM, Manson JE, Hennekens CH, Buring JE. A randomized trial of low-dose aspirin in the

primary prevention of cardiovascular disease in women. *N Engl J Med* 2005; 352: 1293–1304.

8. Anon. Aspirin effects on mortality and morbidity in patients with diabetes mellitus. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study report 14. ETDRS Investigators. *JAMA* 1992; 268: 1292–1300.

9. Ogawa H, Nakayama M, Morimoto T, Uemura S, Kanauchi M, Doi N, Jinnouchi H, Sugiyama S, Saito Y; Japanese Primary Prevention of Atherosclerosis With Aspirin for Diabetes (JPAD) Trial Investigators. Low-dose aspirin for primary prevention of atherosclerotic events in patients with type 2 diabetes: a randomized controlled trial. *JAMA* 2008; 300: 2134–2141.

10. Belch J, MacCuish A, Campbell I, Cobbe S, Taylor R, Prescott R, Lee R, Bancroft J, MacEwan S, Shepherd J, Macfarlane P, Morris A, Jung R, Kelly C, Connacher A, Peden N, Jamieson A, Matthews D, Leese G, McKnight J, O'Brien I, Semple C, Petrie J, Gordon D, Pringle S, MacWalter R; Prevention of Progression of Arterial Disease and Diabetes Study Group; Diabetes Registry Group; Royal College of Physicians Edinburgh. The prevention of progression of arterial disease and diabetes (POPADAD) trial: factorial randomised placebo controlled trial of aspirin and antioxidants in patients with diabetes and asymptomatic peripheral arterial disease. *BMJ* 2008; 337: a1840.

11. Antithrombotic Trialists' (ATT) Collaboration, Baigent C, Blackwell L, Collins R, Emberson J, Godwin J, Peto R, Buring J, Hennekens C, Kearney P, Meade T, Patrono C, Roncaglioni MC, Zanchetti A. Aspirin in the primary and secondary prevention of vascular disease: collaborative meta-analysis of individual participant data from randomised trials. *Lancet*. 2009; 373: 1849–1860.

12. De Berardis G, Sacco M, Strippoli GF, Pellegrini F, Graziano G, Tognoni G, Nicolucci A. Aspirin for primary prevention of cardiovascular events in people with diabetes: meta-analysis of randomised controlled trials. *BMJ* 2009; 339: b4531.

13. Calvin AD, Aggarwal NR, Murad MH, Shi Q, Elamin MB, Geske JB, Fernandez-Balsells MM, Albuquerque FN, Lampropulos JF, Erwin PJ, Smith SA, Montori VM. Aspirin for the primary prevention of cardiovascular events: a systematic review and meta-analysis comparing patients with and without diabetes. *Diabetes Care* 2009; 32: 2300–2306.

14. Pignone M, Alberts MJ, Colwell JA, Cushman M, Inzucchi SE, Mukherjee D, Rosenson RS, Williams CD, Wilson PW, Kirkman MS; American Diabetes Association; American Heart Association; American College of Cardiology Foundation. Aspirin for primary prevention of cardiovascular events in people with diabetes. *J Am Coll Cardiol* 2010; 55: 2878–2886.

15. Anon. Collaborative overview of randomised trials of antiplatelet therapy–I: Prevention of death, myocardial infarction, and stroke by prolonged antiplatelet therapy in various categories of patients. Antiplatelet Trialists' Collaboration. *BMJ* 1994; 308: 81–106.

16. Antithrombotic Trialists' Collaboration. Collaborative meta-analysis of randomised trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients. *BMJ* 2002; 324: 71–86.

17. CURRENT-OASIS 7 Investigators, Mehta SR, Bassand JP, Chrolavicius S, Diaz R, Eikelboom JW, Fox KA, Granger CB, Jolly S, Joyner CD, Rupprecht HJ, Widimsky P, Afzal R, Pogue J, Yusuf S. Dose comparisons of clopidogrel and aspirin in acute coronary syndromes. *N Engl J Med.* 2010; 363: 930-42.

18. Snoep JD, Hovens MM, Eikenboom JC, van der Bom JG, Huisman MV. Association of laboratory-defined aspirin resistance with a higher risk of recurrent cardiovascular events: a systematic review and meta-analysis. *Arch Intern Med*. 2007; 167: 1593–1599.

19. Krasopoulos G, Brister SJ, Beattie WS, Buchanan MR. Aspirin "resistance" and risk of cardiovascular morbidity: systematic review and meta-analysis. *BMJ*. 2008; 336: 195–198

20. Gurbel PA, Bliden KP, DiChiara J, Newcomer J, Weng W, Neerchal NK, Gesheff T, Chaganti SK, Etherington A, Tantry US. Evaluation of dose-related effects of aspirin on platelet function: results from the Aspirin-Induced Platelet Effect (ASPECT) study. *Circulation*. 2007; 115: 3156 – 3164.

21. Frelinger AL III, Furman MI, Linden MD, Li Y, Fox ML, Barnard MR, Michelson AD. Residual arachidonic acid-induced platelet activation via an adenosine diphosphate-dependent but cyclooxygenase-1- and cyclooxygenase- 2-independent pathway: a 700-patient study of aspirin resistance. *Circulation*. 2006; 113: 2888–2896.

22. DiChiara J, Bliden KP, Tantry US, Hamed MS, Antonino MJ, Suarez TA, Bailon O, Singla A, Gurbel PA. The effect of aspirin dosing on platelet function in diabetic and nondiabetic patients: an analysis from the aspirininduced platelet effect (ASPECT) study. *Diabetes*. 2007; 56: 3014 – 3019.

23. Watala C, Pluta J, Golanski J, Rozalski M, Czyz M, Trojanowski Z, Drzewoski J. Increased protein glycation in diabetes mellitus is associated with decreased aspirin-mediated protein acetylation and reduced sensitivity of blood platelets to aspirin. *J Mol Med*. 2005; 83: 148 –158.

24. Davı` G, Catalano I, Averna M, Notarbartolo A, Strano A, Ciabattoni G, Patrono C. Thromboxane biosynthesis and platelet function in type II diabetes mellitus. *N Engl J Med*. 1990; 322: 1769 –1774.

25. Watala C, Golanski J, Pluta J, Boncler M, Rozalski M, Luzak B, Kropiwnicka A, Drzewoski J. Reduced sensitivity of platelets from type 2 diabetic patients to acetylsalicylic acid (aspirin): its relation to metabolic control. *Thromb Res*. 2004; 113: 101–113.

26. Neri Serneri GG, Coccheri S, Marubini E, Violi F; Drug Evaluation in Atherosclerotic Vascular Disease in Diabetics (DAVID) Study Group. Picotamide, a combined inhibitor of thromboxane A2 synthase and receptor, reduces 2-year mortality in diabetics with peripheral arterial disease: the DAVID study. *Eur Heart J*. 2004; 25: 1845–1852.

27. Anon. Randomized trial of ridogrel, a combined thromboxane A2 synthase inhibitor and thromboxane A2/prostaglandin endoperoxide receptor antagonist, versus aspirin as adjunct to thrombolysis in patients with acute myocardial infarction: the Ridogrel Versus Aspirin Patency Trial (RAPT). *Circulation*. 1994; 89: 588 –595.

28. Gresele P, Migliacci R, Procacci A, De Monte P, Bonizzoni E. Prevention by NCX 4016, a nitric oxide-donating aspirin, but not by aspirin, of the acute

endothelial dysfunction induced by exercise in patients with intermittent claudication. *Thromb Haemost*. 2007; 97: 444–450.

29. Kariyazono H, Nakamura K, Arima J, Ayukawa O, Onimaru S, Masuda H, Iguro Y, Majima HJ, Sakata R, Yamada K. Evaluation of anti-platelet aggregatory effects of aspirin, cilostazol and ramatroban on platelet-rich plasma and whole blood. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2004; 15: 157–167.

30. Chamorro A. TP receptor antagonism: a new concept in atherothrombosis and stroke prevention. *Cerebrovasc Dis*. 2009; 27(suppl 3): 20–27.

31. Angiolillo DJ. Antiplatelet therapy in diabetes: efficacy and limitations of current treatment strategies and future directions. *Diabetes Care*. 2009; 32: 531–540.

32. Ferreiro JL, Angiolillo DJ. Diabetes and anti-platelet therapy in acute coronary syndrome. *Circulation*. 2011; 123: 798-813.

33. Winocour PD. Platelet turnover in advanced diabetes. *Eur J Clin Invest*. 1994; 24(suppl 1): 34–37.

34. Di Minno G, Silver MJ, Murphy S. Monitoring the entry of new platelets into the circulation after ingestion of aspirin. *Blood*. 1983; 61: 1081–1085.

35. Watala C, Boncler M, Pietrucha T, Trojanowski Z. Possible mechanisms of the altered platelet volume distribution in type 2 diabetes: does increased

platelet activation contribute to platelet size heterogeneity? *Platelets*. 1999; 10: 52– 60.

36. Sharpe PC, Trinick T. Mean platelet volume in diabetes mellitus. *Q J Med*. 1993; 86: 739–742.

37. Patrono C. Aspirin as an antiplatelet drug. *N Engl J Med*. 1994; 330: 1287–1294.

38. Perneby C, Walle´n NH, Rooney C, Fitzgerald D, Hjemdahl P. Dose- and time-dependent antiplatelet effects of aspirin. *Thromb Haemost*. 2006; 95: 652–658.

39. Davì G, Catalano I, Averna M, Notarbartolo A, Strano A, Ciabattoni G, Patrono C. Thromboxane biosynthesis and platelet function in type II diabetes mellitus. *N Engl J Med*. 1990; 322: 1769 –1774.

40. Patrono C, Rocca B. Drug insight: aspirin resistance: fact or fashion? *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2007; 4: 42–50.

41. Angiolillo DJ, Fernandez-Ortiz A, Bernardo E, Ramírez C, Sabate´ M, Jimenez-Quevedo P, Herna´ndez R, Moreno R, Escaned J, Alfonso F, Ban˜uelos C, Costa MA, Bass TA, Macaya C. Influence of aspirin resistance on platelet function profiles in patients on long-term aspirin and clopidogrel after percutaneous coronary intervention. *Am J Cardiol*. 2006; 97: 38–43.

42. AHA/ACC Guidelines for Secondary Prevention for Patients With Coronary and Other Atherosclerotic Vascular Disease: 2006 Update. *Circulation.* 2006; 113: 2363–2372.

43. Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications, part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation *Diabet Med*. 1998; 15: 539 –553.

44. Angiolillo DJ, Shoemaker SB, Desai B, Yuan H, Charlton RK, Bernardo E, Zenni MM, Guzman LA, Bass TA, Costa MA. Randomized comparison of a high clopidogrel maintenance dose in patients with diabetes mellitus and coronary artery disease: results of the Optimizing Antiplatelet Therapy in Diabetes Mellitus (OPTIMUS) study. *Circulation*. 2007; 115: 708 –716.

45. Angiolillo DJ, Capranzano P, Goto S, Aslam M, Desai B, Charlton RK, Suzuki Y, Box LC, Shoemaker SB, Zenni MM, Guzman LA, Bass TA. A randomized study assessing the impact of cilostazol on platelet function profiles in patients with diabetes mellitus and coronary artery disease on dual antiplatelet therapy: results of the OPTIMUS-2 study. *Eur Heart J*. 2008; 29: 2202–2211.

46. Eriksson AC, Jonasson L, Lindahl TL, Hedba¨ck B, Whiss PA. Static platelet adhesion, flow cytometry and serum TXB2 levels for monitoring

platelet inhibiting treatment with ASA and clopidogrel in coronary artery disease: a randomised cross-over study. *J Transl Med*. 2009; 7: 42.

47. Tantry US, Bliden KP, Gurbel PA. Overestimation of platelet aspirin resistance detection by thrombelastograph platelet mapping and validation by conventional aggregometry using arachidonic acid stimulation. *J Am Coll Cardiol*. 2005; 46: 1705–1709.

48. Barnes MJ, Knight CG, Farndale RW. The collagen-platelet interaction. *Curr Opin Hematol*. 1998; 5: 314 –320.

49. Angiolillo DJ, Ueno M, Goto S. Basic principles of platelet biology and clinical implications. *Circ J*. 2010; 74: 597– 607.

50. Marcucci R, Gori AM, Paniccia R, Giusti B, Valente S, Giglioli C, Buonamici P, Antoniucci D, Abbate R, Gensini GF. High on-treatment platelet reactivity by more than one agonist predicts 12-month follow-up cardiovascular death and non-fatal myocardial infarction in acute coronary syndrome patients receiving coronary stenting. *Thromb Haemost*. 2010; 104: 279–286.

51. Alfonso F, Angiolillo DJ. Platelet function assessment to predict outcomes after coronary interventions: hype or hope? *J Am Coll Cardiol*. 2006; 48: 1751–1754.

52. Angiolillo DJ. Platelet function testing in clinical practice: are we ready for prime time? *Rev Esp Cardiol*. 2009; 62: 113–116.

53. Snoep JD, Hovens MM, Eikenboom JC, van der Bom JG, Huisman MV. Association of laboratory-defined aspirin resistance with a higher risk of recurrent cardiovascular events: a systematic review and meta-analysis. *Arch Intern Med*. 2007;167:1593–1599.

54. Krasopoulos G, Brister SJ, Beattie WS, Buchanan MR. Aspirin "resistance" and risk of cardiovascular morbidity: systematic review and meta-analysis. *BMJ*. 2008;336:195–198.

55. Bhatt DL, Marso SP, Hirsch AT, Ringleb PA, Hacke W, Topol EJ. Amplified benefit of clopidogrel versus aspirin in patients with diabetes mellitus. *Am J Cardiol*. 2002;90:625– 628.

56. Rocca B, Secchiero P, Ciabattoni G, Ranelletti FO, Catani L, Guidotti L, Melloni E, Maggiano N, Zauli G, Patrono C. Cyclooxygenase-2 expression is induced during human megakaryopoiesis and characterizes newly formed platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99:7634 –7639.

57. FitzGerald GA, Oates JA, Hawiger J, Maas RL, Roberts LJ II, Lawson JA, Brash AR. Endogenous biosynthesis of prostacyclin and thromboxane and

platelet function during chronic administration of aspirin in man. J Clin Invest. 1983;71:676–688.

TABELLA 1. Caratteristiche demografiche e cliniche di base

	n = 20
Età (anni±SD)	59±7
Maschi, n (%)	10 (50)
Indice di massa corporea (Kg/m^2±SD)	33±9
Fattori di rischio cardiovascolare, n (%)	
Fumo	6 (30)
Ipertensione	19 (95)
Dislipidemia	17 (85)
Diabete mellito insulin-dipendente	8 (40)
Anamnesi remota, n (%)	
Pregresso infarto del miocardio	1 (5)
Pregresso ictus cerebri	0 (0)
Pregresso bypass aorto coronarico	2 (10)
Malattia coronarica multivasale	6 (30)
Terapia medica, n (%)	
Beta-bloccanti	11 (55)
ACE inibitori	18 (90)
Calcio-antagonisti	11 (55)
Statine	
Metabolizzate dal CYP 3A4	8 (40)

Non metabolizzate dal CYP 3A4	0 (0)
Inibitori di pompa protonica	5 (25)
Dati di laboratorio	
Conta piastrinica (1,000/mm^3±SD)	241±66
Ematocrito (%±SD)	42±4
Emoglobina glicosilata (%±SD)	7.1±1.3
Creatinina sierica (g/dl±SD)	1.0±0.3

ACE = angiotensin-converting enzyme; CYP 3A4 = citocromo epatico P450 3A4

TABELLA 2. Confronto tra dosi di aspirina somministrate una volta al giorno

Test	81 mg od	162 md od	325 mg od	P			P di tendenza
				81 mg od vs. 162 mg od	81 mg od vs. 325 mg od	162 mg od vs. 325 mg od	81 mg od vs. 162 mg od vs 325 mg od
Acido arachidonico (1 mmol/L), %	2±0.9	2±0.7	2±0.7	1.000	1.000	1.000	1.000
Collageno (2 µg/mL), %	44±23	39±14	35±15	0.285	0.083	0.374	0.157
ADP (5 µmol/L), %	49±13	54±10	54±11	0.111	0.851	0.612	0.192
ADP (20 µmol/L), %	66±7	71±11	68±7	0.033	0.459	0.145	0.109
VerifyNow, ARU	455±51	432±62	431±58	0.087	0.126	0.922	0.121
Trombossano sierico B_2, pg/ml	107±143	41±79	22±21	0.008	0.030	0.328	0.008

I dati sono espressi come media±SD

TABELLA 3. Confronto tra dosi di aspirina somministrate due volte al giorno

Test	81 mg bid	162 mg bid	P
Acido arachidonico (1 mmol/L), %	2±0.5	2±1.4	0.106
Collageno (2 µg/mL), %	32±14	33±14	0.895
ADP (5 µmol/L), %	54±13	50±15	0.360
ADP (20 µmol/L), %	69±11	67±14	0.476
VerifyNow, ARU	420±41	423±52	0.777
Trombossano sierico B_2, pg/ml	34±50	19±21	0.165

I dati sono espressi come media±SD

TABELLA 4. Confronto tra dosi giornaliere somministrate in un'unica soluzione o frazionate

Test	162 mg od	81 mg bid	P	325 mg od	162 mg bid	P
Acido arachidonico (1 mmol/L), %	2±0.7	2±0.5	0.772	2±0.7	2±1.4	0.094
Collageno (2 µg/mL), %	39±14	32±14	0.060	35±15	33±14	0.490
ADP (5 µmol/L), %	54±10	54±13	0.857	54±11	50±15	0.273
ADP (20 µmol/L), %	71±11	69±11	0.343	68±7	67±14	0.751
VerifyNow, ARU	432±62	420±41	0.345	431±58	423±52	0.551
Trombossano sierico B_2, pg/ml	41±79	34±50	0.716	22±21	19±21	0.579

I dati sono espressi come media±SD

FIGURA 1

Figura 1. Processo di selezione dei pazienti all'interno dello studio

FIGURA 2

Figura 2. Confronto tra differenti regimi di aspirina (A = 81 mg una volta al giorno [od] vs 81 mg due volte al giorno [bid]; B = 81 mg od vs 162 mg bid; C = 162 mg od vs 162 mg bid) secondo i risultati dell'aggregometria a trasmissione ottica indotta dal collageno (collagen-LTA). I valori sono espressi come percentuale (%) di aggregazione piastrinica.

FIGURA 3

Figura 3. Confronto tra differenti regimi di aspirina (A = 81 mg una volta al giorno [od] vs 81 mg due volte al giorno [bid]; B = 81 mg od vs 162 mg bid; C = 162 mg od vs 162 mg bid) secondo i risultati del VerifyNow (VN-ASA). I valori sono espressi come percentuale (%) di aggregazione piastrinica.

FIGURA 4

Figura 4. Variazione dei livelli di trombossano B_2 sierico nelle diverse fasi dello studio. I livelli di trombossano B_2 sono espressi in pg/ml.

FIGURA 5

Figura 5. Rilascio circadiano di piastrine dal midollo osseo nel torrente ematico e impatto della somministrazione di una singola dose giornaliera di aspirina sulle piastrine "giovani" in pazienti con diabete mellito di tipo II.

Le piastrine dei pazienti con diabete mellito di tipo II sopravvivono meno a lungo e subiscono un maggiore ricambio. A ciò corrisponde un'esaltata generazione di megacariociti nel midollo osseo ed il rilascio di nuove piastrine iper-reattive nel torrente ematico. L'aspirina ha un'emivita di soli 20 minuti e pertanto l'accelerata trombopoiesi che caratterizza i pazienti con diabete mellito di tipo II non consente alle piastrine generate da poco e immesse nella circolazione di essere sufficientemente a contatto con l'aspirina, in particolare quando questa viene somministrata una sola volta al giorno. Ciò determina che una considerevole proporzione di piastrine circolanti presenta una mancata inibizione della cicloossigenasi-1 (COX-1). Queste piastrine continuano a generare elevati livelli di trombossano sierico e promuovono pertanto l'attivazione delle piastrine circolanti (tanto di quelle acetilate quanto di quelle non acetilate) attraverso i recettori per il trombossano (TP)

espressi in superficie. Una doppia somministrazione giornaliera di aspirina potrebbe consentire una migliore inibizione della COX-1 delle piastrine immesse da poco nel torrente circolatorio, contribuendo dunque a realizzare un blocco più ottimale dell'attivazione piastrinica nei pazienti con diabete mellito di tipo II.