



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ ผลของยาลดไขมัน atorvastatin ในการฟื้นฟูการทำงานของเซลล์
เยื่อผนังหลอดเลือด ในผู้ป่วยเบาหวานชนิดไม่พึ่งอินซูลิน และมีระดับไขมัน
ในเลือดอยู่ในเกณฑ์เฉลี่ยทั่วไปของประชากร

โดย นพ.วิโรจน์ ตันติโกสุม และคณะ

โครงการเสร็จสมบูรณ์ เมื่อ วันที่ 30 มิถุนายน 2547

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ ผลของยาลดไขมัน atorvastatin ในการฟื้นฟูการทำงานของเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือด ในผู้ป่วยเบาหวานชนิดไม่พึ่งอินซูลิน และมีระดับไขมันในเลือดอยู่ในเกณฑ์เฉลี่ยทั่วไปของประชากร

คณะผู้วิจัย

1. นพ. วิโรจน์ ดันติโกสม

2. รศ. ดร. บัณฑิต ถิ่นคำรพ

3. ผศ. จิราภรณ์ ศรีนัครินทร์

4. พญ. สิวินิต โอจงเพียร

5. รศ. นฤมล เจริญศิริพรกุล

6. ผศ. ทรงศักดิ์ เกียรติชูสกุล

สังกัด

ศูนย์หัวใจสิริกิติ์ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ภาควิชาชีวสถิติและประชากรศาสตร์

คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ภาควิชารังสีวิทยา

คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ภาควิชารังสีวิทยา

คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ภาควิชาเภสัชกรรมคลินิก

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ภาควิชาอายุรศาสตร์

คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

Randomized Trial of Atorvastatin in Improving Endothelial Function in Diabetes Without Prior Coronary Disease and Having Average Cholesterol Level

Wirote Tantikosoom, MD:

Queen Sirikit Heart Centre, Khon Kaen University.

Bandit Thinkhamrop, PhD:

Department of Biostatistics and Demography, Faculty of Public Health, Khon Kaen University.

Songsak Kiatchusakul, MD:

Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Khon Kaen University.

Narumol Jaremsiripornkul, PhD:

Clinical Pharmacy Department, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University.

Jiraporn Srinakarin, MD, Siwanit Ojongpian, MD:

Departments of Radiology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University.

บทคัดย่อ:

ผลของยาลดไขมันโอโตวาสะแตตินในการฟื้นฟูการทำงานของเซลล์เยื่อผนังหลอดเลือดในผู้ป่วยเบาหวานชนิดไม่พึ่งอินซูลินและมีระดับไขมันในเลือดอยู่ในเกณฑ์เฉลี่ยทั่วไปของประชากร

วิโรจน์ ตันติโกสม, พ.บ.* , ดร. บัณฑิต ถิ่นคำรพ**,

จิราภรณ์ ศรีนักรินทร์, พ.บ.*** , สิวินิต โอจงเพียร, พ.บ.***, นฤมล เจริญศิริพรกุล****, ทรงศักดิ์ เกียรติชูสกุล, พ.บ.*****

ยากลุ่มสะแตตินมีประโยชน์โดยตรงต่อเซลล์เยื่อผนังด้านในหลอดเลือดคือการฟื้นฟูการทำงานของเซลล์เยื่อผนังด้านในหลอดเลือด โดยผ่านกลไกที่นอกเหนือจากการช่วยลดระดับไขมันในเลือด

เป้าหมายหลักของงานวิจัยนี้เป็นการศึกษาผลของยา โอโตวาสะแตติน 20 ม.ก. ในผู้ป่วยเบาหวานชนิดไม่พึ่งอินซูลินที่มีระดับไขมันอยู่ในเกณฑ์เฉลี่ยทั่วไปของประชากร ต่อการทำงานของ เซลล์เยื่อผนังด้านในหลอดเลือด การศึกษานี้ได้คัดเลือกผู้ป่วยเบาหวานชนิดไม่พึ่งอินซูลินที่ไม่มีประวัติของโรคหัวใจและหลอดเลือดมาก่อนและมีระดับไขมันโเลสเตอรอลชนิดรวม ≤ 200 ม.ก./ด.ล. และชนิด แอล ดี แอล ≤ 140 ม.ก./ด.ล. มีผู้ป่วยได้รับ ยาหลอก จำนวน 20คน และได้ยาโอโตวาสะแตติน ขนาด 22 ม.ก. จำนวน 20คน เป็นเวลา 30 สัปดาห์ โดยทุกคนจะได้รับการตรวจ การตอบสนองของ หลอดเลือดแขน ก่อนได้รับยา และหลังจากครบระยะเวลาที่กำหนด พบว่าการตอบสนองหลอดเลือดแขน ชนิดที่พึ่งการทำงานของเซลล์ เยื่อผนังด้านในหลอดเลือด (FMD) ไม่ได้เปลี่ยนแปลงจากครั้งก่อนได้ยา ทั้งในกลุ่มที่ได้รับ ยาโอโตวาสะแตติน และยาหลอก (4.11 ± 1.05 เปลี่ยนเป็น 3.01 ± 1.27 และ 5.75 ± 1.93 เปลี่ยนเป็น 6.45 ± 1.41 , ค่า $P=0.463$ จากการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบ ANCOVA, ตามลำดับ) เช่นเดียวกับ การตอบสนองชนิดที่ไม่พึ่งการทำงานของเซลล์เยื่อผนังด้านในหลอดเลือด (NTGMD) ในขณะที่ไขมัน โเลสเตอรอลชนิดรวมและชนิด แอล ดี แอล ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ

สรุปว่าข้อมูลจากการศึกษานี้ยังไม่สนับสนุนผลดีของยาโอโตวาสะแตตินต่อการทำงานของเซลล์เยื่อผนังด้านในหลอดเลือดในผู้ป่วยเบาหวานชนิดไม่พึ่งอินซูลินที่มีระดับไขมันอยู่ในเกณฑ์เฉลี่ยทั่วไปของประชากร

คำสำคัญ : เบาหวานชนิดไม่พึ่งอินซูลิน, ยาโอโตวาสะแตติน, การทำงานของเซลล์เยื่อผนังหลอดเลือด

วิโรจน์ ตันติโกสม, บัณฑิต ถิ่นคำรพ, จิราภรณ์ ศรีนักรินทร์, สิวินิต โอจงเพียร, นฤมล เจริญศิริพรกุล, ทรงศักดิ์ เกียรติชูสกุล

* ศูนย์หัวใจสิริกิติ์ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ,

** ภาควิชาชีวสถิติและประชากรศาสตร์, คณะสาธารณสุขศาสตร์,

*** ภาควิชาเภสัชกรรมคลินิก คณะเภสัชศาสตร์,

**** ภาควิชารังสีวิทยา, คณะแพทยศาสตร์,

***** ภาควิชาอายุรศาสตร์, คณะแพทยศาสตร์, มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น 40002

Randomized Trial of Atorvastatin in Improving Endothelial Function in Diabetes Without Prior Coronary Disease and Having Average Cholesterol Level

WIROTE TANTIKOSOOM, MD*, BANDIT THINKHAMROP, PhD**, NARUMOL JARERNSIRIPORNKUL, PhD***, JIRAPORN SRINAKARIN, MD****, SIWANIT OJONGPIAN, MD****, SONGSAK KIATCHUSAKUL, MD*****

Abstract

Objective: The aim of this study was to determine whether HMGCoA reductase inhibitor with atorvastatin can modulate endothelial function in type II diabetic patients having average cholesterol and without prior cardiovascular disease.

Method: Type II diabetics, without prior cardiovascular events and total cholesterol at admission ≤ 200 mg/dL or LDL ≤ 140 mg/dL, were randomized to placebo (n=20) or atorvastatin 20 mg daily (n=22) for 30 weeks. Brachial artery endothelium-dependent dilatation or flow-mediated dilatation (FMD) and endothelium-independent dilatation or nitroglycerine-mediated dilatation (NTGMD) were measured at baseline and after thirty weeks of treatment.

Results: Baseline clinical characteristics were similar at admission in both groups. After thirty weeks of treatment, FMD did not significantly change in either the atorvastatin or placebo group (4.11 ± 1.05 to 3.01 ± 1.27 vs. 5.75 ± 1.93 to 6.45 ± 1.41 , respectively; $p=0.46$ by analysis of covariance). Similarly, NTGM did not change in either group.

Conclusion: The addition of HMGCoA reductase inhibitor with atorvastatin did not improve endothelial function in type 2 diabetes having average cholesterol without prior cardiovascular disease, despite an improvement of the lipid profile.

Key words: type 2 diabetes, endothelial dysfunction, atorvastatin

TANTIKOSOOM W, THINKHAMROP B, JARERNSIRIPORNKUL N, SRINAKARIN J, OJONGPIAN S, KIATCHUSAKUL S

* Queen Sirikit Heart Centre,

** Department of Biostatistics and Demography, Faculty of Public Health,

*** Clinical Pharmacy Department, Faculty of Pharmaceutical Sciences,

**** Department of Radiology, Faculty of Medicine,

***** Department of Medicine, Faculty of Medicine, Khon Kaen University.

Type II diabetics comprise 90% of diabetics stricken with premature atherosclerosis. Diabetes increases the relative risk of cardiovascular disease by two- to four-fold compared with the general population. A Multiple Risk Factor Intervention Trial (MRFIT) found that men with diabetes had three times the absolute risk of coronary artery disease mortality compared to a non-diabetic cohort, even after adjustment for established risk factors ⁽¹⁻²⁾. The initiation of the atherosclerotic process, the main mechanism of coronary disease, is injury to the vascular endothelium, and progressive endothelial dysfunction, which loses its ability to prevent abnormal vasoconstriction and to inhibit platelet aggregation and smooth muscle proliferation ⁽³⁾. Because endothelial dysfunction precedes the development of clinical atherosclerosis, early identification and treatment could preclude or significantly delay the development of atherosclerosis.

Patients with risk factors for coronary atherosclerosis include diabetics ⁽⁴⁻⁹⁾ but angiographically normal coronary arteries can have endothelial dysfunction, as has been observed in coronary arteries ⁽¹⁰⁻¹¹⁾ and a brachial artery ⁽¹²⁾ during assessment of vasodilator response.

Celermajer *et al.* have developed a non-invasive technique for the evaluation of endothelial function with ultrasonographic imaging of the brachial artery during reactive hyperemic (flow-mediated vasodilatation), which is correlated with coronary artery response to acetylcholine administration ⁽¹³⁻¹⁵⁾ and cardiac events ⁽¹⁶⁻¹⁷⁾.

Several clinical trials have shown that HMGCoA (3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme

A) reductase inhibitors reduce the incidence of cardiovascular events in diabetic patients with prior coronary disease, having high⁽¹⁸⁾ to average cholesterol⁽¹⁹⁻²⁰⁾. Although the inclusion of diabetics in these clinical trials has been limited, the results suggest that HMGCoA reductase inhibitors reduce the incidence of cardiovascular events in diabetics with prior coronary heart disease comparably to those without diabetes and improve endothelial function⁽²¹⁻²³⁾.

Many clinical trials of statin therapy demonstrate an improvement in cardiovascular end points and coronary stenosis that is incompletely explained by the baseline or treated low-density lipoprotein (LDL) cholesterol level⁽²⁶⁾. The beneficial effect of statins on clinical events may involve nonlipid mechanisms (lipid-independent)⁽³⁰⁾ that modify endothelial function (*e.g.* increase nitric oxide synthase – eNOS⁽²⁷⁾, reduce LDL oxidation⁽²⁸⁾ or reduce platelet aggregation⁽²⁹⁾). We aimed to determine whether atorvastatin, a strong, lipid-lowering medication would benefit endothelial function in diabetics not having high cholesterol.

PATIENTS AND METHODS

Study patients.

This was an out-patient-based trial. We recruited type II DM, classified according to W.H.O. criteria, without history of prior cardiovascular events, ranging between 35 and 60 years

of age. Patients with any of the following were excluded from the study: those having history of prior cardiovascular events (*e.g.* stroke, limb ischemia, angina or history of coronary re-vascularization), or having liver or renal failure. The study was approved by local Research Ethics Committee, and all subjects gave written, informed consent before enrollment.

Study designs.

This study was a randomized, double-blind, placebo, controlled trial with a parallel group design, done in a single center between June 2003 and February 2004. The patients were randomly assigned according to a computer generated list, masked to both patients and doctors.

An independent nurse filled and numbered the medication trays. The doctor received the trays from the study coordinator, to be used in the numbered order. Patients received either atorvastatin 20 mg or placebo once a day (at bed-time), for 30 weeks. The matching placebo tablets were supplied by Pfizer International (Thailand) Corporation.

Study protocol.

Subjects underwent a fasting blood test in the morning for measurement of their baseline lipid profile, blood sugar, liver transaminases, creatine kinase and Hemoglobin A1c. All measurements were repeated every 8 weeks. Height, weight and waist and hip circumferences

were measured at baseline. The assessment of endothelial functions were measured at baseline and at 30 weeks after treatment.

Non-invasive assessment of endothelial function.

The examinations were performed early in the morning, The patients were in a fasting state and no tobacco was allowed. They rested in a supine position for a minimum of 10 minutes before the study.

High resolution ultrasound examination of the brachial artery was performed with a 7.5 MHz transducer connected to a VIVID3 echocardiographic machine, General Electric (Thailand) Company. Increased forearm blood-flow was induced by inflating a blood pressure tourniquet around the widest part of the forearm to 200 mmHg for 5 min. Repeat brachial artery diameter and blood flow scans were obtained immediately and 1 min after tourniquet deflation. Resting brachial artery diameter and blood flow were repeated 15 min later. Sublingual nitroglycerine (400 µg) was given, and the final scan was performed after 3 min.

Flow-mediated vasodilation (FMD) was calculated as the ratio of brachial artery flow after reactive hyperemia to the baseline diameter, expressed as a percentage of change.

Nitroglycerine-mediated vasodilation (NTGMD) was calculated by an analogous method.

Statistical analysis.

The primary end point, the effect of treatment on the change of FMD and NTGMD, was assessed by analysis of co-variance (ANCOVA) adjusted for baseline measurements. The sample size was determined in order to demonstrate an absolute 3% change in FMD (assuming a standard deviation of 2.5%) in the atorvastatin group, compared with placebo ($\alpha = 0.05$ and $\beta = 0.20$; two tailed test). A p value of < 0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

Patient characteristics and safety profile.

As per the baseline characteristics of the 42 type II diabetics. The placebo had more women than the atorvastatin group. The atorvastatin group took more metformin and Thiazolidinedione than placebos (Table 1). Compliance with the study medication was $> 95\%$ in both groups. Two patients assigned to the placebo group withdrew before the end of the study for personal reasons. No adverse events or biochemical side effects occurred.

Effects on FMD and NTGMD.

At baseline, the end-diastolic brachial artery diameter, the FMD and the NTGMD, between the atorvastatin and placebo groups were similar (Table 2 and Figure 1). After the treatment, the difference of FMD between the two groups was not clinically meaningful

(difference = -2.12, 95%CI: -7.92 to 3.67, P= 0.463). Notwithstanding, we have not sufficient evidence to determine the difference between the FMD and NTGMD, as the 95% confidence intervals of the differences were wide. Compared with the placebo group, the atorvastatin treatment significantly reduced triglycerides, and total and LDL cholesterol levels, whereas there was no significant change in the HDL cholesterol level in either group (Table 3).

DISCUSSION

Among diabetics without prior coronary disease with average cholesterol, we did not find evidence of improved flow-mediation or NTG-induced vasodilatation by atorvastatin. That is, even after adjusting for known factors, other than dyslipidemia, that negatively affected vascular responses in our study (including smoking, hypertension, ACE inhibitor, aspirin, and other lipid lowering treatments). Although there were a few more male patients on diabetic medication in the atorvastatin group, after we analyzed the data with an ANCOVA, adjusted for analogous data at baseline and gender, the trend did not change. Shechter *et al.* ⁽³¹⁾ similarly showed no correlation among the percent change of FMD, gender and use of diabetic medication.

According to the Current National Cholesterol Education Program (NCEP), the Adult Treatment Panel III guideline for desirable low-density lipoprotein cholesterol in patients with

diabetes is ≤ 100 mg/dL. Many studies demonstrated favorable effects in endothelial dysfunction among aggressive lipid lowering medications in non-diabetics.

For example, Shechter *et al.*⁽³¹⁾ demonstrated that in patients with coronary disease under various lipid-lowering regimens, the FMD was significantly greater after treatment in patients with LDL cholesterol ≤ 100 mg/dL than with LDL > 100 mg/dL.

Wassmann *et al.*⁽³²⁾ demonstrated improved hyperemic forearm blood flow and decreased serum markers of oxidative stress and inflammation with 80 mg of atorvastatin in 18 non-diabetics (having a pre-treatment LDL level of 112 ± 4 mg/dL) in contrast to many trials on diabetics.

Our findings, even though we have a lower level of pretreatment LDL, are in agreement with the results from Sheu *et al.*⁽³³⁾, who demonstrated that endothelial dysfunction was not reversed after 24 weeks of 10 mg simvastatin in 21 diabetics with hypercholesterolemia.

Similarly, van Venrooij *et al.*⁽³⁴⁾ demonstrated that aggressive lipid lowering by atorvastatin in 133 type II diabetics with dyslipidemia, without a history of cardiovascular disease, did not reverse endothelial dysfunction, despite marked improvement in the lipid profile.

By contrast, Tan *et al.*⁽³⁵⁾ demonstrated the beneficial effect of 20 mg of atorvastatin on endothelial function in type II diabetes with hypercholesterolemia but this benefit has borderline clinical significance as it showed the improvement of FMD increased from 5.3 ± 2.6 at baseline to 6.5 ± 2.8 after 6 months of the atorvastatin treatment.

We also demonstrated the lack of improvement in the NTG-mediated vasodilatation in diabetics, similar to reports by Tan *et al.*⁽³⁵⁾ and van Venrooij *et al.*⁽³⁴⁾. This was associated with both availability of NO and responses to NO, which represents the permanent structural and morphologic changes of vessels in diabetes.

According to these parameters, our results support the findings of these studies vis-à-vis the irreversibility of endothelial dysfunction in well-established diabetes, in those having average cholesterol as opposed to non-diabetics or insulin resistance patients.

Study limitations

Our study had limitations:

- 1) In addition to dyslipidemia, hyperglycemia might cause increased formation of endothelial oxygen radicals⁽³⁶⁾, and eNOS dysfunction⁽³⁷⁾. In the present study, during follow-up about one-third of subjects in both groups had a fasting blood sugar over 126

mg/dL. Therefore, it is likely that hyperglycemia contributed to impaired vasoreactivity and blunted any potential beneficial effects of lipid lowering on vascular responses.

2) We did not aim to determine the effects of the drug on vascular inflammation at the cellular level by serum inflammatory marker measurement; therefore, we cannot comment on the anti-inflammatory effects of atorvastatin.

Thirty weeks of follow-up may not sufficiently demonstrate endothelial function effects. Tan KC *et al.* ⁽³⁵⁾, however, demonstrated this improvement in diabetics having dyslipidemia after 6 months of atorvastatin treatment. The questions requiring further study are:

1) Does the inclusion of early-stage diabetes (*e.g.* patients having an impaired glucose tolerance test), as in this trial, indicate the reversibility of endothelial dysfunction? and, 2) Should a higher dosage of atorvastatin be evaluated?

Conclusion

Treatment with atorvastatin did not appear to improve endothelial function in type II diabetics having an average cholesterol level without any history of cardiovascular disease despite a marked improvement of the lipid profile after treatment.

Acknowledgments

This study was supported by grants from The Thailand Research Fund, Bangkok, Thailand. The authors wish to thank Professor Pyatat Tatsanavivat MD for his input during the design and implementation, and to Mr. Bryan Roderick Hamman for assistance with the English language presentation.