

Correlazione in pazienti coronaropatici tra tocoferolo, retinolo e parametri biochimici

G. Magri¹, N. Marchese², G. Musso³, S. Canini², E. Baghino¹, C. Rapetto³, E. Bovina¹

¹Dipartimento di Patologia Clinica, Laboratorio di Chimica Clinica - USL1 P.O. di Imperia

²Laboratorio Centrale di Chimica Clinica e Microbiologia - Istituto G. Gaslini Genova

³Dipartimento di Cardiologia - USL1 P.O. di Imperia

ABSTRACT

Antioxidant vitamins in patients affected by coronary disease

Some epidemiological studies shown an association between dietary intake or high serum concentrations of alpha-tocopherol and lower rate of ischaemic heart disease. Results from clinical trials of beta-carotene supplementation, which in the man was reduced reversibly to retinol from carotene, showed no cardiovascular benefit, although several observational studies have found an inverse association between carotenoid intake or plasma level and risk of coronary hearth disease. The benefit reported in the observational studies may be due to consumption in foods rich in beta-carotene rather than the beta-carotene itself. The evidence for a cardiovascular benefit of antioxidants is strongest for Vitamin E. We investigated the role of the antioxidants more important as alfa-tocopherol, retinol and their relationship with other parameters, frequently assayed in coronary hearth disease, as Cholesterolo, AspartateAminotransferase, AlanineAminotransferase, Apolipoprotein A-I, Apolipoprotein B in patients affected by acute myocardial infarction.

RIASSUNTO

Oggetto del nostro studio è stata la variazione della vitamina E ed A nei cardiopatici. Essa gioca un ruolo importante nella regolazione dell'assimilazione dei lipidi strettamente associati alle malattie cardiovascolari. In base a quanto sopra esposto e riferendosi anche ad una recente pubblicazione di VanLente F., abbiamo voluto valutare le concentrazioni di Vitamina E ed A e le loro correlazioni con altri parametri biochimici in un gruppo di pazienti coronaropatici e in un omologo gruppo di soggetti normali. Noi abbiamo rilevato una diminuzione della concentrazione di α -tocoferolo nei pazienti coronaropatici, che non è stata trovata da VanLente nella sua pubblicazione Il rapporto della VitE con Col, che anche nel lavoro di VanLente è più elevato nei controlli che nei pazienti affetti da coronaropatia, mediante metodi di regressione logistica, il rapporto della vitamina E/Colesterolo associato alle concentrazioni di Vitamina A ai trigliceridi ha dimostrato una buona capacità di determinare il rischio di malattia coronaropatica.

INTRODUZIONE

In questi ultimi anni vi è stato un rilevante interesse sul ruolo del metabolismo dei radicali liberi perchè costituenti delle placche aterosclerotiche, che trovano origine presumibilmente dall'ossidazione delle lipoproteine a bassa densità.

Gli acidi grassi poliinsaturi negli organismi viventi si possono facilmente autoossidare: la base di questo processo è dovuta al fatto che il carbonio metilenico, situato fra due doppi legami, può formare abbastanza facilmente un radicale libero perdendo un atomo di idrogeno. Una volta formato tale radicale, seguono altre reazioni e molti prodotti reattivi possono contribuire a formare ulteriori ossidazioni.

I prodotti del processo di autoossidazione sono costituiti da idroperossidi dei lipidi; essi si scindono formando dialdeidi, la più rilevabile delle quali è la malondialdeide. Tali sostanze possono formare legami crociati fra i vari tipi di molecole, con conseguente citotossicità, mutagenicità, rottura delle membrane biologiche e/o modificazioni enzi-

matiche.

Molecole di malondialdeide possono anche polimerizzare fra loro o con altre molecole reattive, formando un pigmento insolubile, la lipofucsina, che si accumula nei tessuti durante l'invecchiamento.

Nella maggior parte dei casi, l'organismo possiede potenti meccanismi atti ad evitare l'accumulo di queste sostanze: le catalasi, le perossidasi e le superossido dismutasi distruggono queste sostanze e tengono molto bassa la loro concentrazione nei tessuti.

Un'ulteriore salvaguardia è rappresentata da molecole che interagiscono con ogni radicale libero prodotto senza dar luogo a reazioni a catena. L' α -tocoferolo (vitamina E) è una delle più importanti molecole dotate di forte potere antiossidante. Esistono, tuttavia, solo prove indirette del suo ruolo protettivo in vivo: la vitamina E è presente, nella dieta, sotto forma di una miscela di composti strettamente correlati detti tocoferoli, di cui l' α -tocoferolo viene usato come riferimento dell'attività vitaminica.

La vitamina E sembra avere un ruolo importante come

antiossidante naturale nelle membrane cellulari e nei depositi adiposi, dove reagisce con facilità con l'ossigeno molecolare e con i radicali liberi, proteggendo questi tessuti dall'azione degli acidi grassi insaturi così da impedirne la perossidazione.

Sebbene l'ipotesi di una relazione causale tra elevati livelli di colesterolo serici, placche aterosclerotiche e malattie cardiovascolari sia stata prospettata da oltre un secolo, è interessante notare come oggi esistano supporti scientifici più validi e consistenti. Simili associazioni erano state rilevate in molti studi epidemiologici, ma la relazione causale tra colesterolo e cardiopatia ischemica non è stata provata fino al completamento di "studi recenti". Anche le LDL partecipano alla progressione della placca aterosclerotica, dando origine a cellule schiumose dopo modificazioni chimiche a carico delle stesse LDL. (1)

Il processo chiave a questo riguardo sembra essere la perossidazione di acidi grassi polinsaturi nelle particelle LDL: tale reazione è inibita dagli antiossidanti, quali il beta carotene e la vitamina E. Tutti questi argomenti sono attualmente oggetto di intensa ricerca e costituiscono la base molecolare degli effetti clinici dell'abbassamento del colesterolo e dell'approccio terapeutico complementare con antiossidanti nella malattia cardiovascolare (2).

Oggetto del nostro studio è stata anche la vitamina A (retinolo), sostanza liposolubile, che regola la funzione delle glicoproteine, dei glicolipidi e dei proteoglicani. Essa viene metabolizzata sotto forma di retinolo dal carotene (provitamina A). La funzione fisiologica della vitamina A maggiormente investigata è la sua partecipazione al processo visivo. Altre funzioni riguardano la regolazione delle glicoproteine e in particolare la stabilizzazione delle lipoproteine nelle membrane della cellula e delle particelle subcellulari. Dalla letteratura è noto che vi è una scarsa mobilitazione della vitamina A dai depositi epatici; poichè non sono stati ancora chiariti i meccanismi cellulari e molecolari preposti a questo scambio, sembra utile monitorare la concentrazione di questa vitamina.

Essa infatti gioca un ruolo importante nella regolazione dell'assimilazione dei lipidi strettamente associati alle malattie cardiovascolari.

SCOPO DEL LAVORO

In base a quanto sopra esposto e riferendosi anche ad una recente pubblicazione di VanLente F. (3), abbiamo voluto valutare le concentrazioni di Vitamina E ed A e le loro correlazioni con altri parametri biochimici in un gruppo di pazienti coronaropatici e in un omologo gruppo di soggetti normali.

MATERIALI E METODI

Sono stati esaminati 25 soggetti maschi affetti da coronaropatia accertata mediante coronarografia, di età compresa tra 35 e 83 anni (media 66, mediana 69) e 25 soggetti maschi non coronaropatici, utilizzati come controlli, di età compresa tra 51 e 87 anni (media 65.6, media-

na 65.5)

L'età e la massa corporea (BMI o Body Mass Index, che esprime il peso come percentuale del peso ideale in relazione ad altezza e peso) dei due gruppi di soggetti non erano significativamente differenti.

Il siero dei pazienti è stato diviso in aliquote e conservato in freezer a -70 °C; per la determinazione quantitativa di α -tocoferolo (VitE) e Retinolo (VitA) si è usata la Cromatografia Liquida ad Alta Risoluzione (HPLC) con rivelatore UV, misurando le assorbanze a 280 nm. Le determinazioni di colesterolo totale (Col), trigliceridi (TG), aspartato amino transferasi (AST) ed alanina aminotransferasi (ALT), lipoproteine a bassa densità (LDL) e ad alta densità (HDL), apolipoproteina A-I (ApoA) ed apolipoproteina B (ApoB) ed acido urico, sono state eseguite lo stesso giorno del prelievo con metodi routinari su analizzatore automatico HITACHI 747 (Boehringer-Mannheim).

Sono stati anche calcolati: il rapporto vitamina E/colesterolo (E/C), che risulta dalla letteratura (4) un buon marcatore dello stato di questa vitamina e il rapporto ApoB/ApoA (B/A), come noto essere un buon indice di rischio di infarto miocardico. Per verificare se i livelli dei parametri esaminati erano significativamente differenti nei soggetti coronaropatici ed in quelli di controllo è stato impiegato il test non parametrico di Mann-Whitney. Per verificare la correlazione fra analiti è stato utilizzato il test dei ranghi di Spearman. Per identificare i parametri biochimici più utili a predire la presenza o meno di una coronaropatia è stato usato, come nel lavoro di Van Lente (3), il modello di regressione logistica, con la tecnica di selezione di stepwise.

Con il metodo della massima verosimiglianza sono stati stimati i coefficienti dei parametri scelti e si è ottenuta un'equazione lineare, che permette di calcolare il valore di Z.

La probabilità di coronaropatia è data dalla formula:

$$1+1e^z$$

Il vantaggio dell'analisi di regressione logistica per l'identificazione dei migliori parametri di stima della probabilità di un evento è che, al contrario di altre tecniche multivariate non richiede assunzioni di normalità omoscedasticità della popolazione in esame. Tutti i metodi statistici usati non implicano assunzioni di normalità o di omoscedasticità delle distribuzioni delle variabili. Le elaborazioni sono state eseguite mediante il programma SPSS per Windows.

RISULTATI

I livelli di vitamina E, del rapporto E/C e di HDL sono risultati significativamente inferiori nei pazienti coronaropatici in confronto con quelli dei pazienti non affetti (Tabella 1)

I valori di Apo B e del rapporto B/A sono risultati strettamente correlati con Colesterolo e Trigliceridi, sia nei soggetti affetti da coronaropatia sia in quelli non affetti (dati non mostrati). Al contrario la Vitamina E non è risultata correlata con nessun altro marcatore (Tabella 2)

Tabella 1

Confronto fra le concentrazioni dei parametri esaminati nei soggetti coronaropatici e di controllo (Test di Mann-Whitney con calcolo di "Z" e sua significatività "p")

Analiti	Z	p
Vitamina E	4.56	0.00001
Vitamina E/colesterolo	5.2	0.000001
Vitamina A	2.11	0.034
Colesterolo	0.21	0.83
Trigliceridi	0.72	0.47
Aspartatoamminotransferasi	2.36	0.018
Alanina amminotrasferasi	0.66	0.51
Lipoproteine a bassa densità (LDL)	1.19	0.23
Lipoproteine ad alta densità (HDL)	3.35	0.001
Apolipoproteina A	2.33	0.02
Apolipoproteina B	1.13	0.26
Apolipoproteina B/Apolipoproteina A	0.34	0.73
acido urico	1.42	0.16

Il modello di regressione logistica con tecnica stepwise ha permesso di individuare i fattori di rischio maggiormente associati alla presenza di coronaropatie che sono riportate in tabella 3.

La regressione individuata è risultata la seguente:

$z = -11,43 + 1,74 (\text{Vitamina E/Colesterolo}) - 0,0189 (\text{Trigliceridi}) + 0,078 (\text{Vitamina A})$

in cui la probabilità di coronaropatia, come già detto, corrisponde a

$$1 + 1e^z$$

Tabella 2

In tabella sono riportati i coefficienti di correlazione più significativi tra i livelli di vitamina E e gli altri più importanti parametri biochimici nei pazienti coronaropatici e nel gruppo di controllo con i relativi valori di significatività di correlazione (p). La vitamina E non risulta correlata con nessuno degli altri parametri

Analita	Coronaropatici		Non coronaropatici	
	coeff. correlazione	p	coeff. correlazione	p
Col	-0.16	0.43	0.39	0.02
Trigliceridi	0.24	0.25	0.28	0.18
ApoA1	0.23	0.27	0.36	0.04
ApoB	0.36	0.04	0.31	0.14

Tabella 3

Fattori di rischio individuati mediante il modello di regressione logistica con tecnica di selezione stepwise. Sono riportati i logaritmi della massima verosimiglianza e la significatività di essi (p)

Analita	Log della verosimiglianza	p
E/C	-30.08	0.00001
Trigliceridi	-14.26	0.021
VitA	-16.04	0.029

Con questo modello la capacità di classificazione media è risultata buona (90%) come si può rilevare dalla tabella 4.

DISCUSSIONE

Dal nostro studio preliminare si è evidenziato che:

a) Le concentrazioni di α -tocoferolo (Vit.E) sono apparse diminuire nei pazienti affetti da coronaropatia. (Tabella 1 e 2).

b) L' α -tocoferolo, espresso in rapporto al colesterolo sembra essere una misura efficiente dello stato vitaminico del paziente. (Tabella 3)

c) Il rapporto Vit.E/Colesterolo associato alle concentrazioni di Vitamina A e di Trigliceridi, è stato in grado di classificare in maniera corretta più del 90% dei pazienti coronaropatici. (Tabella 4)

Dalla letteratura è noto che in pazienti affetti da questa patologia è importante valutare un pannello di lipidi abbastanza ampio per monitorare la malattia, individuare un aggravamento o un miglioramento del decorso clinico. In anni più recenti si è introdotto il dosaggio delle vitamine A ed E; quest'ultimo in particolare è l'antiossidante di elezione associato alle lipoproteine a bassa densità (LDL).

Noi abbiamo rilevato una diminuzione della concentrazione di α -tocoferolo nei pazienti coronaropatici, che non è stata trovata da VanLente nella sua pubblicazione (1).

Il rapporto della VitE/Colesterolo, che anche nel lavoro di VanLente è più elevato nei controlli che nei pazienti affetti da coronaropatia, come in altre patologie (V.Fibrosi cistica) (5) risulta essere il parametro migliore per valutare lo stato vitaminico.

La valutazione del rapporto VitE/ Colesterolo insieme con le concentrazioni di VitA e dei Trigliceridi dimostrano

una buona affidabilità nel determinare il rischio di malattia coronaropatica. E' già nota l'importanza del parametro VitE/Colesterolo anche dalla letteratura (1,2), mentre per la vitamina A saranno necessarie ulteriori indagini.

La funzione fisiologica di questa vitamina è la sua partecipazione al suo processo visivo, alla regolazione delle glicoproteine, dei glicolipidi e proteoglicani, alla regolazione della riproduzione ed in particolare della crescita ossea (6). E' interessata inoltre alla sintesi degli ormoni steroidei, alla stabilizzazione delle lipoproteine presenti

Tabella 4

Classificazione dei soggetti esaminati mediante l'equazione di regressione logistica calcolata:
 $z = -11,43 + 1,74 (\text{Vitamina E}/\text{Colesterolo}) - 0,0189 \text{ Trigliceridi} + 0,078 \text{ Vitamina A}$

	osservati	predetti coronaropatici	predetti non coronaropatici	% di classificazione corretta
coronaropatici	25	23	2	92
non coronaropatici	25	3	22	88

nelle membrane cellulari e in quelle delle particelle subcellulari ed al mantenimento dell'epitelio tissutale. (7,8)

Tra i lipidi è noto che, oltre al colesterolo, i trigliceridi sono fortemente associati alla aterosclerosi come altresì dimostrato da VanLente (3) nella sua analisi della regressione logistica (Col $p=0.022$; TG $p=0.144$).

Da sperimentazioni su animali si rileva come la fibrosi e la necrosi miocardica, che interessano appunto il muscolo cardiaco, siano causate da un deficit di vitamina E; infatti la necrosi tissutale è la maggior caratteristica di questa carenza ed è accompagnata da un accumulo di lipopigmenti dovuta alla perossidazione dei lipidi. La ricerca di dati clinici correlati col deficit di vitamina E nell'uomo è stata a lungo investigata per scoprire insidiosi processi patologici. Infatti il termine subclinico o deficit biochimico può essere usato per indicare che livelli bassi di tocoferolo nel sangue umano spesso non sono necessariamente equivalenti a evidenti deficit clinici o biologici. Comunque l'approccio ideale per valutare il fabbisogno di vitamina E è quello di combinare sia metodi di determinazione dei tocoferoli plasmatici e/o serici sia misure dei lipidi circolanti come lipidi totali, esteri del colesterolo.

Ulteriori indagini su una casistica più ampia sono necessarie per una valutazione più approfondita dei parametri correlati con il rischio di malattia coronaropatica; tuttavia in questo studio preliminare viene posto in evidenza l'importanza del dosaggio delle vitamine liposolubili A ed E e l'esistenza di una evidente correlazione coi lipidi ed in

particolare con colesterolo e trigliceridi.

BIBLIOGRAFIA

1. Devlin TM: Manuale di Biochimica con aspetti clinici. Liviana Editrice S.p.A. 1989; 406-1011
2. Guidotti G: Patologia Generale. Ambrosiana Milano 1990; 162-172
3. VanLente F., Daher R., Waletzky J.A: Vitamin E compared with other potential risk factor concentrations in patients with and without coronary artery disease." Eur.J. Clin. Chem.Clin. Biochem. 1994; 32: 583-587.
4. Winklhofer BM, Shmerling D, Schimck MG, Tusehseimid PE: Short-term changes in erythrocyte -tocopherol content of vitamin E-deficient in patients with cystic fibrosis " Am.J.Clin.Nutr.1992; 55: 100-103.
5. Sokol R.J.: Vitamins A and E in cystic fibrosis. Pediatr. Pulmonol. supp1993; 9: 167-68.
6. Farrel PM, Shils ME, Young VR: Vitamin E, modern nutrition in health disease 7 th ED. LEA V. Febiger. Philadelphia 1988; 15: 340-354
7. Esterbauer H., Gebicki J., Puhl H., Jurgens G.: The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL " Free Rad.Biol.Med.1992; 13: 341-390
8. Dieber-Rotheneder M., Puhl H., Wacg G., Striegl G., Esterbauer H: Effect of oral supplementation with D-tocopherol on the vitamin E content of human low density lipoproteins and resistance to oxidation. J.Lipid Res. 1992; 32: 1325-1332