

La vitamina E in soggetti Ipercolesterolemici modifica l'espressione recettoriale dei Complessi Glicoproteici GPIIb/IIIa e GPIb?

Giuseppe Nubile¹, Adele Rulli², Corrado Romano³, Gilda Angelini⁴, Maria Odorisio⁴, Andrea Mezzetti⁵, Fabio Savini⁶

¹Laboratorio analisi G. Bernabeo Ortona (Chieti)

²Laboratorio analisi S. Camillo Chieti

³Laboratorio analisi SS. Annunziata Chieti

⁴Scuola di specializzazione Patologia Clinica Università G. D'Annunzio Chieti

⁵Patologia Medica Università G. D'Annunzio Chieti

⁶Laboratorio analisi S. Massimo Penne (Pescara)

ABSTRACT

Is the receptorial expression of glycoprotein complexes GPIIb/IIIa and GPIb modified by vitamin E administration in hypercholesterolaemic subjects?

10 patients (7F and 3M) with familiar hypercholesterolaemia have been studied, administering 600 mg/die of vitamin E for 15 days, and measuring plasma fibrinogeno and the platelets receptors GPIIb/IIIa and GPIb before and after vitamin administration. The observed differences of the mean values of the three parameters were statistically significant.

RIASSUNTO

Abbiamo studiato 10 casi (7F e 3M) con ipercolesterolemia familiare, somministrando 600 mg/die di vitamina E per 15 giorni e misurando il fibrinogeno plasmatico ed i recettori piastrinici GPIIb/IIIa e GPIb prima e dopo tale somministrazione. Le differenze tra i valori medi dei tre parametri studiati sono risultate statisticamente significative.

INTRODUZIONE

L'importanza della vitamina E come molecola antiossidante nella prevenzione delle malattie cardiovascolari è da tempo riportata in letteratura (1,2). L'alfa tocoferolo interviene su più componenti del processo emostatico con un'azione direttamente correlata alla dose somministrata: inibisce l'attività piastrinica (3), riduce i livelli plasmatici di fibrinogeno (4), aumenta i livelli del PAI 1 (5) e diminuisce l'espressione del FT nei monociti (6).

La ridotta attività piastrinica, dovuta all'azione antiossidante della vitamina E sui lipidi di membrana, si manifesta con una minore capacità di rilascio (7) e con la formazione di pseudopodi piccoli e ridotti di numero (8).

Oltre all'azione diretta sulle lipoproteine di membrana, la vitamina E ostacola la funzione piastrinica grazie al suo effetto antiossidante sulle lipoproteine del siero. È noto, infatti, che le LDL ossidate ancor più di quelle native, promuovono l'aggregazione piastrinica riducendo la fluidità della membrana piastrinica; anche le HDL ossidate agiscono in questo senso, mentre le HDL native inibiscono la risposta piastrinica incrementando la fluidità della membrana (9). Inoltre le LDL determinano una maggiore sensibilità delle piastrine agli agenti aggreganti compreso un aumento del legame del fibrinogeno alle piastrine (10).

Dalla letteratura risulta anche che al maggior legame del fibrinogeno alle piastrine, non corrisponde un aumento

della espressione piastrinica del recettore GPIIb, ma una maggiore affinità dei siti di legame per il fibrinogeno (11).

Alla luce di quanto detto di siamo proposti di studiare quale correlazione esista, nei pazienti affetti da ipercolesterolemia familiare, tra somministrazione di vitamina E ed espressione piastrinica del recettore GPIb, responsabile dell'adesione piastrinica e del complesso GPIIb/IIIa, che permette l'aggregazione piastrinica ed inoltre quale effetto ha tale vitamina sui livelli plasmatici del fibrinogeno.

PAZIENTI, MATERIALI E METODI

Abbiamo studiato 10 pazienti (7F e 3M) con ipercolesterolemia familiare (colesterolo basale: media = 274,2 mg/dL; DS = 25,5 mg/dL) afferenti in regime di Day-Hospital presso la Patologia Medica dell'Università G. D'Annunzio di Chieti nell'anno 1998, ai quali sono stati somministrati 600 mg/die per os di vitamina E per un periodo di quindici giorni.

I pazienti di volta in volta inclusi nello studio sono stati sottoposti, dopo un digiuno di 12 ore, a prelievo venoso senza laccio, nelle prime ore del mattino (12) con siringhe di plastica e ago 19G (13). I prelievi per la determinazione del fibrinogeno e dei recettori GPIb e GPIIb/IIIa sono stati eseguiti in provette con citrato di Sodio al 3,8%, in rapporto 1:10.

Il Fibrinogeno è stato determinato secondo il metodo

di Clauss con analizzatore ACL 100 della Ditta IL entro 3 ore dal prelievo ed espresso in mg/dL.

La valutazione dei recettori piastrinici è stata eseguita con citofluorimetro Win Bryte della Ditta Biorad, tarato con Beads di fluorescenza della Ditta Walter Occhiena, utilizzando anticorpi monoclonali coniugati con Istocianato di fluorosceina (FITC) della stessa Ditta. Per tale valutazione il sangue era centrifugato a 400 giri per 10 minuti, al fine di ottenere un P.R.P. (plasma ricco di piastrine), che veniva suddiviso in due aliquote, diluite con soluzione di Clay-Adams. Ciascuna aliquota veniva opportunamente agitata (vortex) e per due volte centrifugata e lavata con la stessa soluzione, risospesando quindi il pellet (bottone di piastrine) finale nella medesima soluzione, in modo da ottenere una concentrazione di piastrine pari a 50000 mm³. Le letture venivano effettuate entro 4 ore dal campionamento, dopo l'aggiunta di rispettivamente 10 microlitri di CD42b (marcatore del GPIb) e 10 microlitri di CD41a (marcatore del GPIIb/IIIa), ad un volume di 0.5 ml di sospensione piastrinica. I risultati erano espressi come "mean di fluorescenza" (MF).

L'elaborazione statistica è stata eseguita su PC IBM compatibile, con programma MINISTAT 1.1 prelevato dal Sito Sibioc. La significatività statistica delle differenze tra le medie è stata valutata con il test t di Student per dati appaiati.

RISULTATI

La Tabella 1 riporta i valori dei recettori GPIb, GPIIb/IIIa espressi come "Mean Fluorescence" (MF) e del fibrinogeno espresso in mg/dL ottenuti nel gruppo campione prima e dopo la somministrazione di vitamina E.

La distribuzione sufficientemente normale di tutti i parametri, indicata dai descrittori di curtosi e di asimmetria, ci ha consentito di utilizzare le medie e le DS quali indici

di posizione e di dispersione della distribuzione medesima (14). In seguito a somministrazione di vitamina E si osserva un aumento sistematico dei valori medi dei tre parametri studiati, in ogni caso statisticamente significativo (valori di P sempre inferiori a 0,05). La P più alta per il fibrinogeno, comunque < 0,05, è da attribuire presumibilmente ai due casi dove non si è avuto un aumento ma una diminuzione dei valori.

CONCLUSIONI

I risultati del nostro studio, avallati dalla significatività delle differenze osservate, evidenziano un aumento dell'espressione di GPIb e GPIIb/IIIa piastrinici ed un aumento della concentrazione plasmatica del fibrinogeno in seguito a somministrazione di vitamina E nel nostro gruppo campione di soggetti ipercolesterolemici.

L'aumento del fibrinogeno, in disaccordo con la letteratura, dovrà essere confermato con ulteriori studi. L'aumentata espressione dei recettori, invece, rafforza in noi la convinzione che l'espressione recettoriale piastrinica sia cosa diversa dalla sua attivazione funzionale (15). Ci sembra oltremodo importante sottolineare l'influenza esercitata dal microambiente sulle capacità funzionali dei recettori.

L'effetto antiaggregante della vitamina E è quindi il risultato di interazioni ben più complesse tra la vitamina E e le lipoproteine presenti nella membrana piastrinica, molecole in grado a loro volta di modificare l'affinità dei recettori per i ligandi.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Steiner M. Effect of alpha tocopherol administration on platelet function in man. *Thromb. Haemost.* 1983; 49: 73.
- 2) Steiner M., Glantz M., Lekos A. Vitamin E plus aspirin com-

Tabella 1

Valori di fibrinogeno (in mg/dL), GPIb e GPIIb/IIIa (come Mean Fluorescence, MF) prima e dopo somministrazione di Vitamina E (600mg/die)

Paziente	GPIb (MF)		GPIIb/IIIa (MF)		Fibrinogeno (mg/dL)	
	prima	dopo	prima	dopo	prima	dopo
BA	64	67	120	125	319	431
CMS	65	70	121	125	262	397
PAM	65	67	121	126	269	358
ML	60	66	117	123	280	380
BG	64	66	117	123	386	380
DGA	59	67	125	133	288	353
DCV	64	75	125	132	285	354
DNT	68	72	124	133	442	453
IC	64	70	125	130	446	367
SN	67	71	125	130	367	464
Media	64,0	69,1	122,0	128,0	334,4	393,7
DS	2,74	2,99	3,26	4,02	70,74	41,44
P*	0,00028		<0,00001		0,018	

*Significatività statistica delle differenze tra i valori medi (t di Student)

- pared with aspirin alone in patients with transient ischemic attacks. *Am J Clin Nutr* 1995; 62(suppl): 1381S-4S.
- 3) Jandak J., Steiner N., Richardson P.D. A Tocopherol, an effective inhibitor of platelet adhesion. *Blood*, 1989; vol.73, n.1:141-149.
 - 4) Kiserud-CE; Kierufuls-P; Hostmark-AT. Effects of various fatty acids alone or combined with vitamin E on cell growth and fibrinogen concentration in the medium of HepG2 cells. *Thromb-Res.* 1995; 80 (1): 75-83.
 - 5) Oosthuizen- W; Vorster-HH; Jerling-JC; Barnard-HC; Smuts-CM; Silvis-N; Krunger-A; Venter-CS. Both fish oil and olive oil lowered plasma fibrinogen in women with high baseline fibrinogen levels. *Thromb-Haemost* 1994; 72: 557-62.
 - 6) Crtchley-DJ; Que- BG. Copper-induced tissue factor expression in human monoytic THP-1 cells and its inhibition by antioxidants. *Circulation* 1995; 92(2): 238-43.
 - 7) Steiner M., Anastasi J. Vitamin E, an inhibitor of the platelet-release reaction. *J Clin Invest* 1976; 57: 732-737.
 - 8) Steiner N. Vitamin E: more than an antioxidant. *Clin Cardiol* 1993; 330: 1029-1035.
 - 9) Ardlie N.G., Selley M.I., Simons L.A. Platelet activation by oxidatively modified low density lipoproteins. *Atherosclerosis* 1989; 76:117.
 - 10) Di Minno G., Silver M.J., Cerbone A.M., Rainone A., Postiglione A., Mancini M. Increased fibrinogen binding to platelets from patients with familiar hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 1986; 6: 203.
 - 11) Pawlowska Z., Swiatkowska M., Krzeslowska J., Pawlicki L., Cierniewski C. S., Increased platelet-fibrinogen interaction in patients with hypercholesterolemia and hypertriglyceridemia. *Atherosclerosis* 1993; 103: 13-20.
 - 12) Nubile G., et al. Variazioni circadiane dell'aggregazione piastrinica indotta da adrenalina e collagene nell'uomo. *Boll Soc It Biol Spr* 1982; 15: 947-950.
 - 13) Levy, Toledano S; Bredoux R; Rendu F; Jeannar C; Savarian E; Dassin E. Isolament et fusion des plaquettes. Coparison de deux methodes: Filtration sur gel et centrifugation sur gradient d'albumine. Nouvelle ethod à partir de sang total: centrifugation sur gradient de metrizamide. *Nouv Rev Hematol*; 1978; 16: 367-80.
 - 14) Snedecor GW, Cochran WG, *Statistical methods*, 7th ed. Ames: The Iowa State University Press, 1980: 507pp.
 - 15) G. Nubile; C. Rucci; M.B Di Sciascio; M Nubile; F. Savini; A. Mezzetti. L'indobufene e l'acido acetilsalicilico modificano l'espressione recettoriale del complesso glicoproteico GpIIb/IIIa? *Medicina di laboratorio* 1999; 7: 23-26.