

MARKERS DI OSSIDAZIONE ED INFIAMMAZIONE

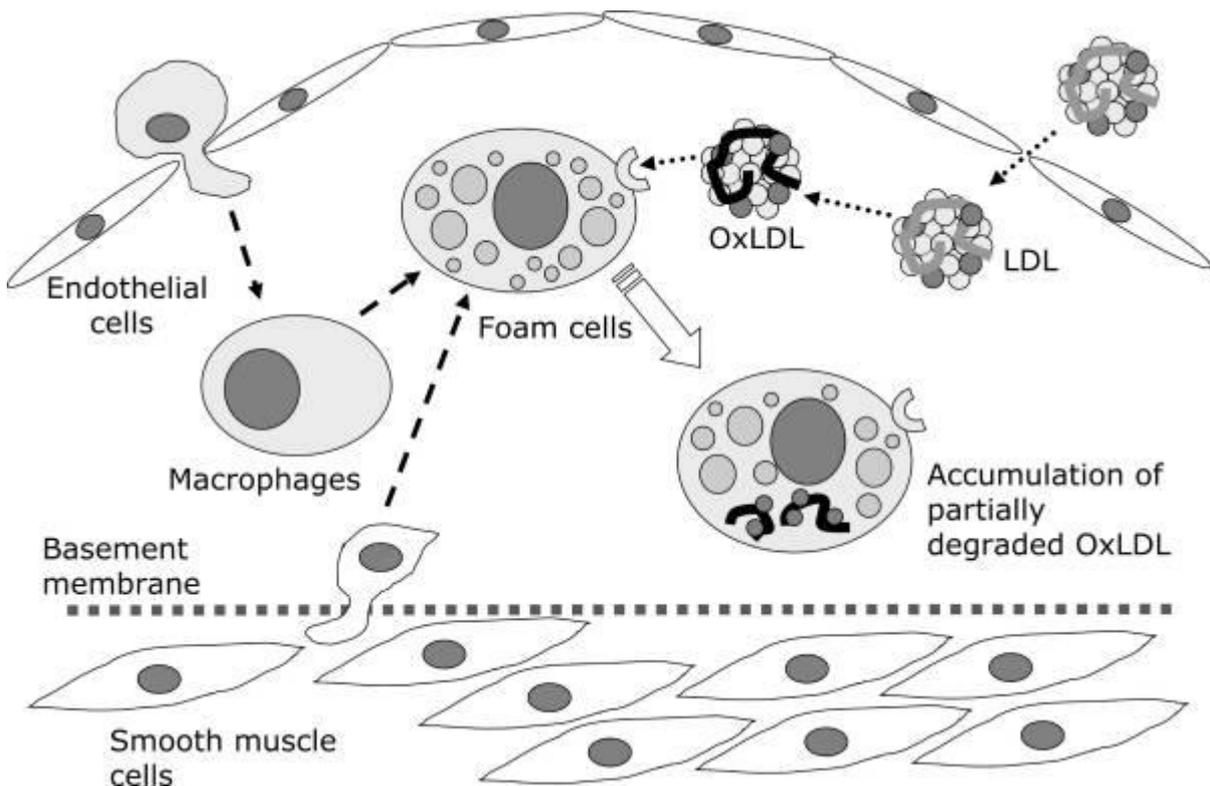
nella prevenzione del paziente

La patogenesi dell'aterosclerosi include la suscettibilità genetica e una varietà di fattori di rischio cardiovascolari ed influenze ambientali. Evidenze sperimentali sempre più solide suggeriscono che, in associazione ai fattori di rischio cardiovascolari "classici", i fenomeni infiammatori ricoprono una posizione di rilievo nella dinamica del processo aterosclerotico coronarico e delle Sindromi Coronariche Acute (SCA). Pertanto i markers sistemici di infiammazione stanno assumendo un ruolo sempre più importante nella stratificazione prognostica e nella gestione terapeutica dei pazienti con SCA. Questa risposta infiammatoria è sostenuta e/o stimolata dallo *stress ossidativo*, che può costituire la connessione tra i disturbi lipidici e l'infiammazione. Da oltre 20 anni è noto che lo stress ossidativo, in particolare l'ossidazione delle LDL, può influenzare lo sviluppo della malattia aterosclerotica e che alcuni marcatori di ossidazione delle LDL (LDL ossidate circolanti, autoanticorpi anti-LDL ossidate) potrebbero essere utili nel valutare il rischio di sviluppo di patologia nei pazienti [1-3]. Le lipoproteine a bassa densità (LDL=Low Density Lipoprotein) sono le principali proteine di trasporto per il colesterolo nel plasma umano.

Il colesterolo LDL, a volte indicato come il colesterolo "cattivo", è ancora più pericoloso quando diventa ossidato. Le LDL ossidate sono più reattive con i tessuti circostanti e possono depositarsi all'interno del rivestimento delle arterie. Macrofagi, colesterolo e altri lipidi sono i partner implicati nella formazione di placche con rischi cardiovascolari conclamati (aterosclerosi).

Gli eventi iniziali dell'aterogenesi vanno identificati nel danno dell'endotelio e nell'accumulo e modificazione (aggregazione, ossidazione

e/o glicosilazione) delle lipoproteine a bassa densità (LDL) nell'intima delle arterie, due eventi che si verificano precocemente e che si potenziano a vicenda. Penetrati nell'intima, i macrofagi fagocitano le lipoproteine modificate e, a causa dell'impossibilità di metabolizzare il colesterolo in esse contenuto, si trasformano nelle cellule schiumose (o spumose) caratteristiche delle strie lipidiche (*fatty streaks*).



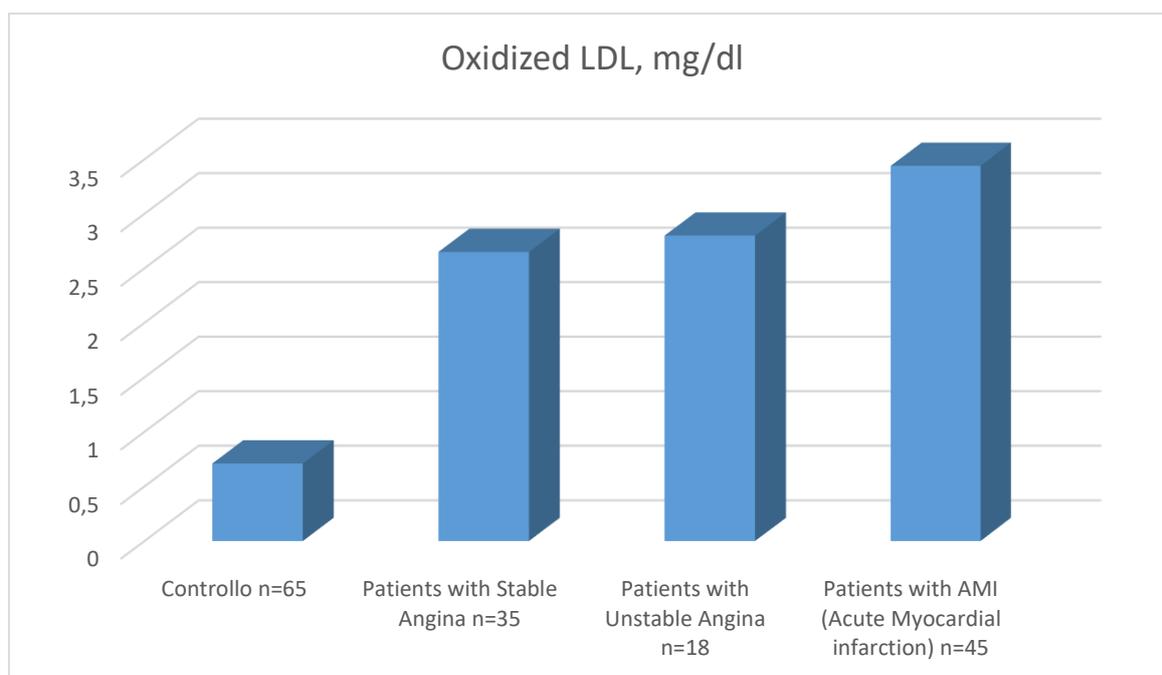
Ipotesi della “Oxidative Modification” nella patogenesi dell’aterosclerosi [4]. Nella figura sopra viene schematizzata la formazione delle cellule schiumose nelle lesioni aterosclerotiche. L’LDL nativo penetra all’interno della tonaca intima arteriosa e qui viene ossidato [OxLDL] per poi essere fagocitato dai macrofagi, che diventano Cellule Schiumose (Foam Cells) ad alto contenuto lipidico. L’OxLDL ha un’affinità inferiore rispetto ai recettori delle LDL ed un’affinità molto più alta rispetto ai recettori di cattura dei macrofagi.

Nell’ipotesi della “*modificazione ossidativa*” nella patogenesi dell’aterosclerosi descritta nella Figura, due sono gli eventi iniziali che in modo sinergico danno via alla placca aterogena:

1. **Ossidazione**, cioè modificazione, delle LDL da parte di agenti chimici altamente reattivi (stress ossidativo)

2. **Infiammazione**, processo biologico in cui avviene l'espressione di molecole di adesione sulla membrana cellulare e della secrezione di sostanze biologicamente attive e chemiotattiche come citochine, fattori di crescita e radicali liberi; queste sostanze favoriscono il richiamo e la successiva infiltrazione di leucociti (globuli bianchi), con trasformazione dei monociti in macrofagi.

In tabella vengono evidenziati i valori di LDL-ossidate correlati con gruppi di controllo e gruppi con sintomi coronariche conclamate (SCA), riportati in un importante rivista medica [5].



La comunità scientifica sta dando sempre più importanza al controllo dell'infiammazione e ossidazione per un discorso di prevenzione e longevità del paziente, sia per rischio di patologie cardiovascolari [6] che degenerative legate all'invecchiamento e all'inflammaging (cancro, Alzheimer, Parkinson etc.) [7].

I markers ad oggi riconosciuti dalla comunità scientifica per il controllo dell'infiammazione e ossidazione e la prevenzione di patologie

cardiovascolari e degenerative, che possono avere un valore aggiunto rispetto ai normali markers di routine quali pannello lipidico classico (colesterolo totale, colesterolo-LDL, colesterolo-HDL, Trigliceridi), hs-PCR, fibrinogeno, acido urico sono:

1. LDL-ossidate
2. Small-Dense LDL (sd-LDL)
3. d-ROMs
4. Lipidomica su membrana eritrocitaria

LDL-OSSIDATE

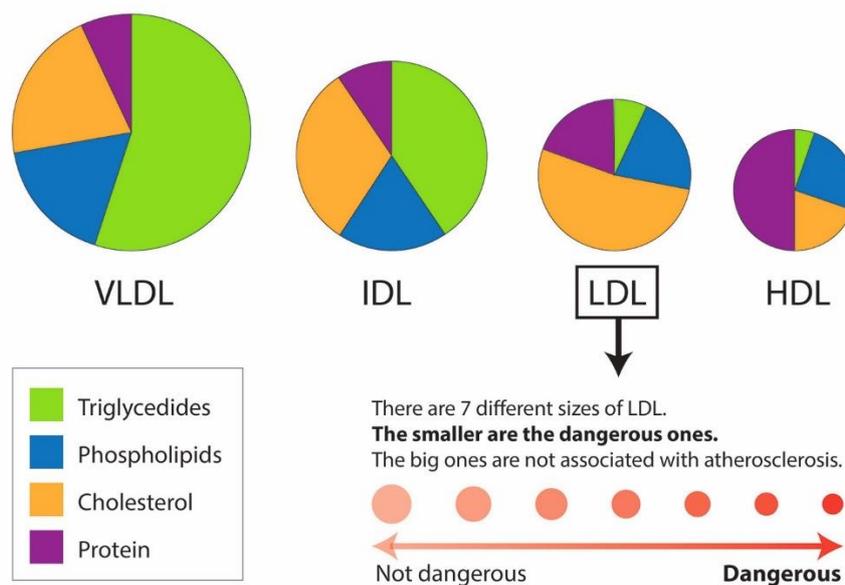
L'esame fornisce una misura precisa e quantitativa della frazione modificata (ossidata) delle LDL, che è il vero partner aterogeno da tenere sotto controllo e che **ha un valore predittivo molto più importante della conoscenza della sola frazione LDL** come riportato in due recentissime Review internazionali [6,8]. Le LDL non modificate non possono essere fagocitate dai macrofagi, e quindi la misura del solo colesterolo-LDL ci dà una informazione del substrato ossidabile, ma non ossidato.

sd-LDL

Le lipoproteine a bassa densità (LDL; Low-Density Lipoprotein) sono particelle deputate al trasporto dei lipidi in tutto l'organismo. Ciascuna particella contiene una combinazione di proteine, colesterolo, trigliceridi e molecole fosfolipidiche. Il test per le sottofrazioni delle LDL misura la percentuale delle diverse particelle circolanti, soprattutto **permette di stimare la sottofrazione piccola e densa, facilmente ossidabile.**

I test lipidici tradizionali misurano la quantità di colesterolo LDL (LDL-C) presente nel circolo ematico ma non valuta la sottofrazione delle LDL a rischio aterogeno. Molti studi hanno mostrato che l'incremento delle

particelle LDL piccole e dense (sd-LDL) è associato ad infiammazione cellulare ed aterosclerosi in maniera maggiore rispetto alle particelle LDL grandi e soffici. È probabile che l'aumentato numero di sd-LDL sia il motivo per il quale alcune persone andrebbero incontro ad attacco cardiaco nonostante i livelli di colesterolo totale e LDL-C siano perlopiù nella norma, come riportato da diversi trials clinici [8].



Nel 2013, l'Associazione Americana di Chimica Clinica (AACC), ha redatto un documento riguardante il confronto tra l'utilizzo dell'Apolipoproteina B (ApoB) e le particelle sd-LDL come indicatori di aterogenesi in confronto agli altri marcatori lipidici concludendo la loro superiorità come test predittivi per il rischio cardiovascolare rispetto al colesterolo-LDL comunemente usato [9].

d-ROMs (Reactive Oxygen Metabolites test)

Lo stress ossidativo costituisce un fattore emergente di rischio per la nostra salute perché risulta associato non solo all'invecchiamento precoce ma anche ad una lunga serie di malattie molto comuni ed invalidanti. Purtroppo, rispetto a queste condizioni morbose, lo stress ossidativo è

molto più subdolo da diagnosticare. Esprimendosi a livelli molecolari, infatti, non dà luogo a sintomi caratteristici, ma si cela dietro al quadro clinico della malattia di base. Esso, pertanto, può essere “diagnosticato” solo attraverso test biochimici. Uno dei test più efficaci è stato sviluppato dal ricercatore italiano Carratelli e oggi utilizzato in numerosi trials clinici. Il test, eseguito su plasma, ha il vantaggio di avere risposte che possono essere lette ed interpretate da un laboratorio ad un altro e ci dà una **misura reale dell’azione di agenti chimici reattivi (radicali liberi) nei confronti di materiale biologicamente attivo.**

Una recentissima pubblicazione internazionale su rivista di cardiologia ha sottolineato con uno studio condotto su 256 pazienti l’utilità del test nella prevenzione del rischio cardiovascolare. I ricercatori hanno determinato un cut off limite (395 U. Carratelli): pazienti con un d-ROMs maggiore hanno una probabilità più alta di andare incontro a patologie cardiovascolari.

LIPIDOMICA DI MEMBRANA ERITROCITARIA

Come le altre “(-)omiche” (es. genomica, proteomica) che si occupano in modo dinamico di molecole che esistono negli organismi viventi, la lipidomica permette di valutare, su diverse matrici biologiche, le unità fondamentali delle classi di acidi grassi che compongono le nostre membrane cellulari: SFA (Saturated Fatty Acids), MUFA (Mono Unsaturated Fatty Acids), PUFA (Poly Unsaturated Fatty Acids). La lipidomica studia non solo la struttura, ma anche la funzione e le variazioni (rapporti tra acidi grassi) che vengono a determinarsi in diverse condizioni fisio-patologiche, mettendo in stretta relazione le componenti di membrana con lo stato nutrizionale del paziente e con le sue disfunzioni metaboliche (cambiamenti ormonali, insulino resistenza, obesità etc.). La letteratura scientifica negli ultimi anni ha sottolineato come attraverso la lipidomica su membrana eritrocitaria (globulo rosso) **possano essere**

utilizzati degli indici molto robusti per individuare squilibri alimentari, deficit nutrizionali, disfunzioni metaboliche.

Questi indici possono essere così elencati:

1. L'**Omega-3 Index** su membrana eritrocitaria è da molti considerato uno dei principali biomarker per le patologie cardiovascolari [10-12] e recentemente correlato all'aumento di patologie oncologiche [7, 13]. L'indice è la somma dei PUFA Omega_3 (DHA + EPA, gli Omega_3 da pesce) e indica se l'apporto nutrizionale è deficitario, buono o ottimale secondo linee guida internazionali [14]. L'apporto dietetico è indispensabile e cruciale in quanto i PUFA a differenza dei SFA e MUFA non possono essere sintetizzati a livello endogeno ma devono essere assunti solamente dalla dieta, da qui la definizione, per larga parte sottovalutata, di Acidi Grassi Essenziali (EFA: Essential Fatty Acids).
2. La determinazione del **rapporto infiammatorio Arachidonico/EPA (AA/EPA)**.

L'infiammazione è un processo biologico che ci permette di difenderci da invasioni microbiche, stress esterni, e consente alle lesioni fisiche di guarire. Se, però, la risposta infiammatoria non si risolve in maniera adeguata, assume il carattere di infiammazione cronica a bassa intensità che può attaccare i nostri stessi organi e risultare uno dei primi step del rischio aterogeno. Misurare l'intensità di questa infiammazione cronica sarà nei prossimi anni uno dei tasselli indispensabili per l'applicazione della medicina integrata e il controllo di numerose patologie degenerative. Ad oggi uno dei markers robusti per misurare il nostro rapporto pro-infiammatorio è dato dallo squilibrio tra acidi grassi Omega_6 (in cui l'arachidonico è il precursore di ormoni pro-infiammatori) ed Omega_3 (in cui l'EPA è il precursore di ormoni anti-infiammatori e risolutivi

dell'inflammaging) [15]. Mentre il rapporto tra grassi saturi e insaturi va progressivamente migliorando all'interno della popolazione, il rapporto tra PUFA Omega-6 e Omega-3, la cui proporzione ideale si situa tra 4:1 e 2:1, è attualmente così squilibrato che l'ultimo rapporto della FDA statunitense parla di un rapporto medio nella comune alimentazione di ben 25:1 (in Europa siamo attorno al 15:1) [16-18]. Individuare un rapporto Arachidonico/EPA molto alto nella membrana eritrocitaria sottolinea una cascata pro-infiammatoria che non viene neutralizzata dagli Omega_3 anti-infiammatori. Tale segnale infiammatorio può essere il sintomo di carenze di PUFA Omega_3 da pesce, alimentazione satura in PUFA Omega_6 (carne rossa, prodotti da forno, oli di semi vegetali), segnali ormonali, insulinemia, disfunzioni metaboliche. Il rapporto AA/EPA nel sangue costituisce un marker forte, robusto, accreditato dalla comunità scientifica che misura l'esatto equilibrio ormonale tra infiammazione e risoluzione.



Ricerca applicata presso il Laboratorio Dr Fioroni nella prevenzione di patologie degenerative

Il laboratorio Dr Fioroni da tempo collabora con medici, centri di ricerca universitari e ospedalieri per la costruzione di database che correlino determinati markers clinici con il rischio dell'insorgenza di patologie degenerative.

Dr Fusco Antonio, Dirigente Medico - Ospedale P. Pederzoli
Dr Spina Michele, biochimico, Ph.D. in Aging and Nutrition

Nella Figura 1 viene evidenziato uno studio osservazionale retrospettivo condotto su una popolazione oncologica (n=38), una popolazione di controllo (n=30) e una popolazione con una alimentazione controllata a basso indice glicemico (n=24). La determinazione dell'Acido Arachidonico tramite Lipidomica eritrocitaria evidenzia in modo significativo come nella popolazione oncologica l'Acido Grasso Omega_6 potrebbe avere un ruolo decisivo nell'insorgenza della patologia in chiave infiammatoria. La sua determinazione e valutazione nel rischio di inflammaging è sicuramente un fattore importante nella prevenzione oncologica.

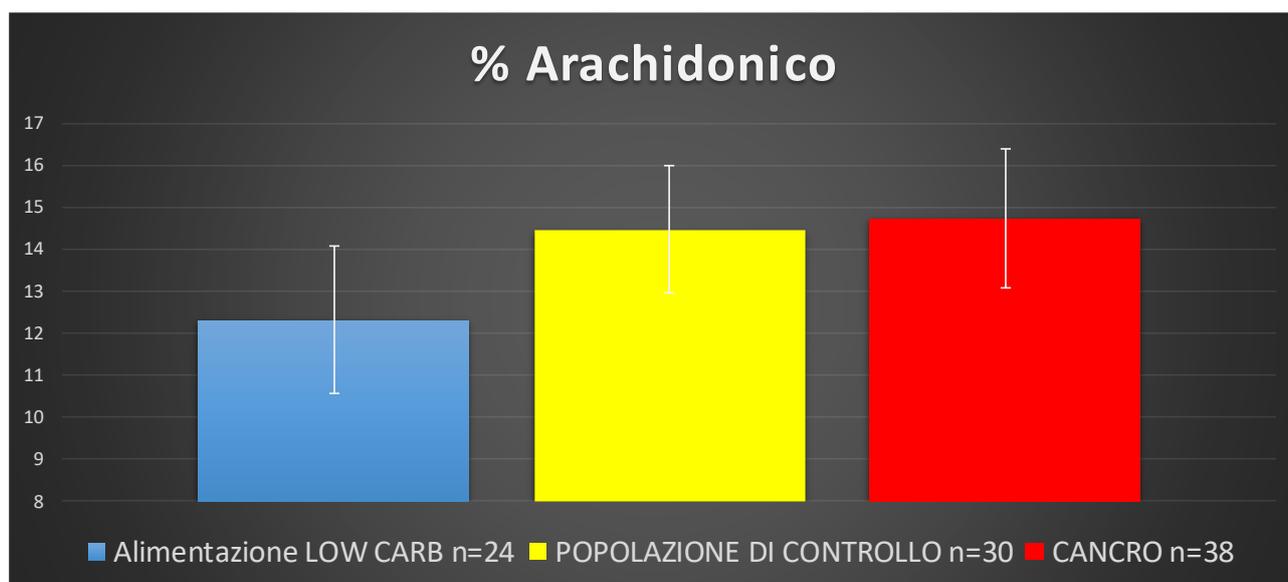


Figura 1. Determinazione dell'Acido Arachidonico tramite Lipidomica eritrocitaria. I dati sono stati costruiti in collaborazione con il Dr. Fusco, la Dr.ssa Virgili esperta in nutrizione oncologica e Dr. Cuccioloni dell'Università di Camerino. I dati sono in pubblicazione.

Nella Figura 2 viene descritto il markers di rischio pro-infiammatorio AA/EPA ottenuto dalla Lipidomica eritrocitaria su quattro popolazioni: i) alimentazione a regime controllato nel rapporto Omega_6/Omega_3 (n=24) ii) controllo (n=44) ii) cancro (n=33) iv) diagnosi di patologie neuro-infiammatorie ed autoimmuni (n=70).

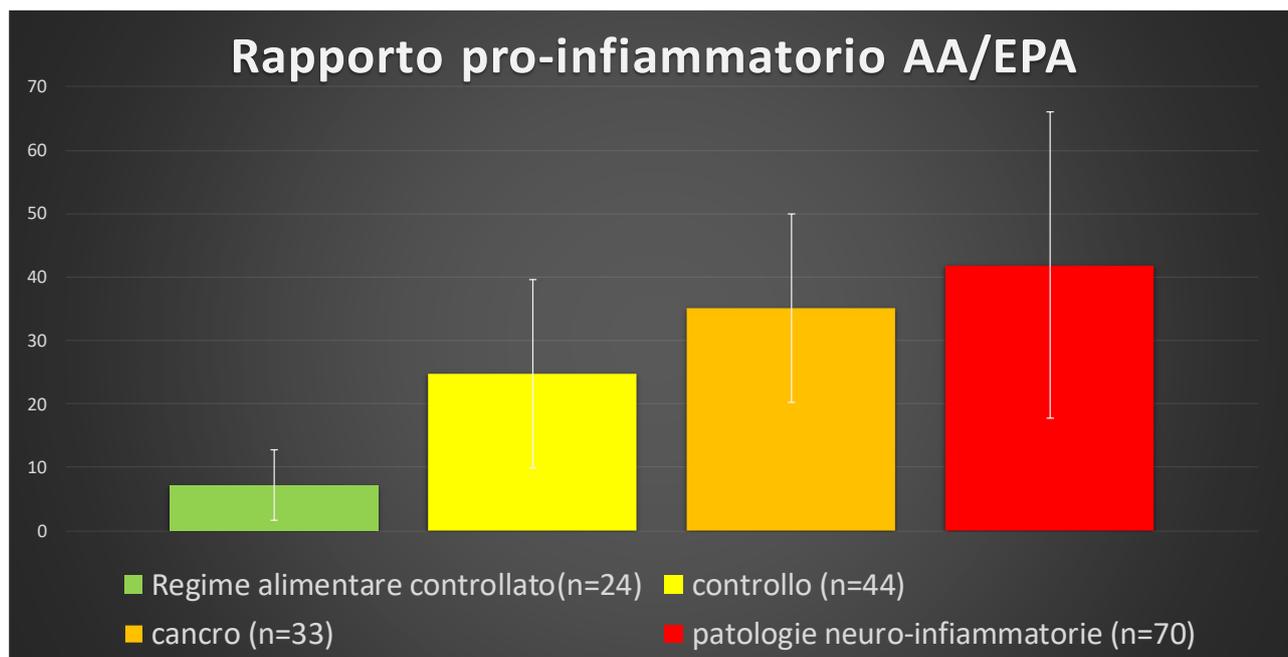


Figura 2. Determinazione del rapporto pro-infiammatorio AA/EPA tramite Lipidomica eritrocitaria in quattro popolazioni. I dati sono stati costruiti in collaborazione con il Dr. Fusco, la Dr.ssa Virgili esperta in nutrizione oncologica ed un centro di ricerca dell'Università di Camerino.

Entrambi gli studi in via di pubblicazione sottolineano come ci siano markers in grado di stimare l'inflammaging di basso grado, **darne una precisa valutazione in termini di rischio**, permettendo di agire sulla prevenzione di patologie degenerative. Questi markers avranno sempre di più una importanza strategica in ambito clinico per costruire percorsi di medicina integrata di precisione, differenziati e individuali.

Bibliografia

1. G. Lippi. **Lipidi e rischio cardiovascolare.** *Istituto di Chimica e Microscopia Clinica, Dipartimento di Scienze Morfologico-Biomediche, Università degli Studi di Verona, Verona. RIMeL / IJLaM 2005; 1*
2. **Anticorpi anti-lipoproteine a bassa densità ossidate: studi epidemiologici e potenziali applicazioni cliniche nella malattia cardiovascolare.** *Minerva Cardioangiologica 2007 Dicembre;55(6):821-37*
3. Andreja Trpkovic et al. **Oxidized low-density lipoprotein as a biomarker of cardiovascular diseases.** *Crit Rev Clin Lab Sci. 2015;52(2):70-85.*
4. Hiroyuki Itabe. **Oxidized low-density lipoprotein as a biomarker of *in vivo* oxidative stress: from atherosclerosis to periodontitis.** *J. Clin. Biochem. Nutr. | July 2012 | vol. 51 | no. 1 | 1-8*

Dr Fusco Antonio, Dirigente Medico - Ospedale P. Pederzoli
Dr Spina Michele, biochimico, Ph.D. in Aging and Nutrition

5. Holvoet et al. **Oxidized LDL and Malondialdehyde-Modified LDL in Patients With Acute Coronary Syndromes and Stable Coronary Artery Disease.** *Circulation.* 1998; 98:1487-1494
6. Alexander N. Orekhov, Igor A. Sobenin. **Modified lipoproteins as biomarkers of atherosclerosis.** *Frontiers In Bioscience, Landmark*, 23, 1422-1444, March 1, 2018
7. Francesca Perrotti et al. **Advances in Lipidomics for Cancer Biomarkers Discovery.** *Int. J. Mol. Sci.* 2016, 17, 1992;
8. Uffe Ravnskov et al. **Lack of an association or an inverse association between low-densitylipoprotein cholesterol and mortality in the elderly: a systematic review.** *BMJ Open* 2016.
9. Cole, T. et. al. (2013). **Association of Apolipoprotein B and Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy–Derived LDL Particle Number with Outcomes in 25 Clinical Studies: Assessment by the AACC Lipoprotein and Vascular Diseases Division Working Group on Best Practices.** *Clinical Chemistry* May 2013 vol. 59 no. 5 752-770
10. Carla Ferreri. **Membrana cellulare e Lipidomica.** Consiglio Nazionale delle Ricerche. Bologna
11. William S. Harris. **Omega-3 Fatty Acids and Cardiovascular Disease: A Case for Omega-3 Index as a New Risk Factor.** *Pharmacol Res.* 2007 March ; 55(3): 217–223.
12. Clemens von Schacky and William S. Harris. **Cardiovascular risk and the omega-3 index.** *Journal of Cardiovascular Medicine* 2007, 8 (suppl 1):S46–S49.
13. Sara Huerta-Yépez, Ana B. Tirado-Rodriguez, Oliver Hankinsona. **Role of diets rich in omega-3 and omega-6 in the development of cancer.** *Bol Med Hosp Infant Mex.* 2016;73(6):446---456
14. Ken D. Stark et al. **Global survey of the omega-3 fatty acids, docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid in the blood stream of healthy adults-Review.** *Progress in Lipid Research* 63 (2016) 132–152
15. Barry Sears and Camillo Ricordi. **Anti-Inflammatory Nutrition as a Pharmacological Approach to Treat Obesity.** *Journal of Obesity* Volume 2011.

Dr Fusco Antonio, Dirigente Medico - Ospedale P. Pederzoli
Dr Spina Michele, biochimico, Ph.D. in Aging and Nutrition

16. Angela M Rizzo et al. **A rapid method for determining arachidonic: eicosapentaenoic acid ratios in whole blood lipids: correlation with erythrocyte membrane ratios and validation in a large Italian population of various ages and pathologies.** Lipids in Health and Disease 2010.
17. Javier Amézaga et al. **Altered Red Blood Cell Membrane Fatty Acid Profile in Cancer Patients.** Nutrients 2018
18. Melinda Olliver et al. **Erythrocyte omega-3 polyunsaturated fatty acid levels are associated with biomarkers of inflammation in older Australians.** Journal of Nutrition & Intermediary Metabolism 5 (2016).