# UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MODENA E REGGIO EMILIA FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

Scuola di Specializzazione in Medicina Interna Direttore: Prof. Maurizio Ponz de Leon

# RETINOLEMIA E TOCOFEROLEMIA IN PAZIENTI CIRROTICI: RELAZIONE COL GRADO DI MALATTIA.

Relatore:

Tesi di Specializzazione di:

DOTT. LUCA RONCUCCI

DOTT. GIORGIO BEDOGNI

**ANNO ACCADEMICO 1998-1999** 

# Indice

0. Elenco degli acronimi usati nel testo			
1. Riassunto			
2. Introduzione			
3. Soggetti e Metodi		8	
3.1	Soggetti	8	
3.2	Valutazione clinica	9	
3.3	Retinolo e tocoferolo	9	
3.4	Analisi statistica	10	
4. Ris	12		
4.1	Effetto di età, sesso e BMI	12	
4.2	Effetto di LC	13	
4.3	Effetto di HCC	14	
5. Discussione			
5.1	Tabella 1	18	
6. Bibliografia			
7. Ringraziamenti			

# 0. Elenco degli acronimi usati nel testo

BMI Indice di massa corporea (body mass index)

CP Classificazione di Child-Pugh

CPA Classe A di Child-Pugh

CPB Classe B di Child-Pugh

CPC Classe C di Child-Pugh

HCC Epatocarcinoma (hepatocellular carcinoma)

Ht Statura (body height)

LC Cirrosi epatica (liver cirrhosis)

ROS Specie reattive dell' ossigeno (reactive oxygen species)

Wt Peso corporeo (body weight)

#### 1. Riassunto

In uno studio precedente abbiamo osservato che i livelli plasmatici di retinolo e tocoferolo tendono a decrescere per gradi crescenti di severità della cirrosi epatica (LC). Volendo verificare se i livelli plasmatici di retinolo e tocoferolo possono essere impiegati come indicatori del grado di severità della LC, abbiamo misurato retinolemia e tocoferolemia in 141 cirrotici e 48 controlli sani. Differenze statisticamente significative nei livelli plasmatici di retinolo sono state riscontrate tra i controlli (2.37 ± 0.94 μmol/L), i pazienti in classe A di Child-Pugh (CPA) (1.50  $\pm$  0.90  $\mu$ mol/L, n = 60), quelli in classe B (0.84  $\pm$  0.42  $\mu$ mol/L, n = 51; CPB) e quelli in classe C  $(0.56 \pm 0.38 \, \mu \text{mol/L}, \, \text{n} = 30; \, \text{CPC}; \, \text{p} < 0.01 \, \text{per CPA} \, vs \, \text{CPB}, \, \text{CPA} \, vs$ CPC, CPA vs controlli, CPB vs controlli, CPC vs controlli e p < 0.05 per CPB vs CPC). I pazienti con epatocarcinoma (HCC) secondario a LC presentavano valori di retinolo inferiori rispetto a quelli senza HCC  $(0.38 \pm 0.07, n = 34 vs 0.83 \pm 0.08 \mu mol/L, n = 107, p < 0.05)$ . Anche i valori di tocoferolo tendevano a decrescere con la gravità della LC ma le differenze inter-classe (CP) non erano sempre statisticamente significative. Inoltre, i livelli di tocoferolo erano simili nei pazienti con senza HCC. Età, sesso e indice di massa corporea

influenzavano la relazione tra retinolo o tocoferolo e grado di LC (p = ns). Il presente studio suggerisce che il retinolo plasmatico ha il potenziale per essere utilizzato come indicatore di severità della cirrosi epatica.

#### 2. Introduzione

I livelli plasmatici di retinolo e tocoferolo sono tipicamente inferiori nei pazienti affetti da cirrosi epatica (LC) rispetto ai soggetti sani (1-6). Il retinolo ha un ruolo fondamentale nella proliferazione cellulare e il tocoferolo agisce come scavenger di radicali liberi in vitro (7, 8). La proliferazione cellulare è una caratteristica costante della LC e la produzione di specie reattive dell' ossigeno (ROS) gioca un ruolo fondamentale nella patogenesi delle epatopatie croniche (9). La diminuzione dei livelli plasmatici di retinolo e tocoferolo che si osserva nei pazienti cirrotici potrebbe dipendere almeno in parte dal loro intervento in questi processi.

Nonostante l' evidenza di una riduzione dei livelli plasmatici di retinolo e tocoferolo nei pazienti cirrotici (1-6), scarsa attenzione è stata riservata allo studio dell' associazione tra retinolemia, tocoferolemia e grado di severità della LC. In uno studio precedente abbiamo osservato livelli inferiori di retinolo e tocoferolo in pazienti (n = 53) con LC alcolica, virale e mista (alcolica e virale) rispetto a soggetti sani (n = 32) (2). Un riscontro interessante di questo studio era che la retinolemia e la tocoferolemia tendevano a decrescere per gradi

crescenti di severità della LC, determinata sulla base della classificazione di Child-Pugh.

Comunque, era necessario l' arruolamento di un campione più ampio per testare in maniera adeguata l' ipotesi dell' associazione tra retinolemia, tocoferolemia e grado di severità della LC. Ciò è quanto si è inteso fare nel presente studio. Inoltre, eravamo interessati a stabilire la presenza di un eventuale associazione tra i livelli di retinolo e tocoferolo e la presenza di epatocarcinoma (HCC) secondario a LC.

Il presente studio mirava perciò a rispondere a due domande: *i*) retinolemia e tocoferolemia differiscono nei pazienti cirrotici con differente grado di malattia ? e, *ii*) retinolemia e tocoferolemia differiscono nei pazienti con HCC e in quelli senza HCC ?

# 3. Soggetti e Metodi

# 3.1 Soggetti

Centoquarantuno pazienti con diagnosi bioptica di LC sono stati consecutivamente arruolati presso la Medicina II del Policlinico di Modena. L'eziologia della LC era virale nel 70% dei casi, alcolica nel 10% e mista nel rimanente 20%. Quarantotto soggetti sani reclutati tra lo staff medico e tecnico della Medicina II sono stati impiegati come controlli. Il protocollo di studio era stato approvato dal Comitato Etico dell' Università di Modena e Reggio Emilia e tutti i soggetti hanno fornito il loro consenso informato. I seguenti criteri di esclusione sono stati applicati ai soggetti cirrotici: i) eziologia della LC differente da virale, alcolica o mista; ii) presenza di malattie croniche d' organo in aggiunta alla cirrosi epatica; iii) presenza di malassorbimento, come valutabile da un esame chimico-fisico delle feci; iv) consumo di alcolici non sospeso da almeno 3 mesi; v) recenti (< 3 mesi) complicanze emorragiche; vi) presenza di bilirubinemia > 51.3 μmol/L. Tutti i pazienti e i controlli seguivano una dieta libera a domicilio e i pazienti consumavano una dieta standard (isocalorica e bilanciata) durante la loro permanenza in Ospedale.

#### 3.2 Valutazione clinica

I criteri di Child-Pugh (CP) sono stati utilizzati per classificare i pazienti in tre gradi di severità crescente di LC: A (CPA), B (CPB) e C (CPC) (10). Questa classificazione, basata su albuminemia, bilirubinemia, tempo di protrombina, grado di ascite e grado di encefalopatia, è ampiamente utilizzata come indicatore di severità della LC in quanto predittiva della sua morbilità e mortalità. Il peso corporeo (Wt) e la statura (Ht) sono stati misurati secondo le indicazioni del *Manuale di Riferimento per la Standardizzazione Antropometrica* (11). L' indice di massa corporea (BMI) è stato calcolato come Wt (kg)/Ht² (m²) (12).

# 3.3 Retinolo e tocoferolo

La determinazione di retinolo e tocoferolo è stata effettuata su campioni di plasma prelevato a digiuno e conservati a - 80° C. Essi sono stati aggiunti a un doppio volume di etanolo contenente retinolo acetato e tocoferolo acetato come standard interni e a *N*-eptano a 3 volumi contenente idrossitoluene butilato (0.5 g/L).Quindi, i campioni sono stati estratti, evaporati sotto azoto e risospesi nella fase mobile (acetonitril:metilalcol, 50:50, v/v). La procedura cromatografica, effettuata utilizzando un HPLC (modello 501, Waters Associates,

Mildford, Massachusettes, USA) connesso a detector programmabile (Modello 490, Waters Associates) è descritta in maggior dettaglio altrove (2). La determinazione del retinolo e del tocoferolo è stata effettuata su corsa singola a lunghezze d' onda di 325 e 295 nm rispettivamente. Tutti i campioni sono stati analizzati entro una settimana dalla loro raccolta. Il coefficiente di variazione infrasettimanale per misurazioni ripetute di retinolo e tocoferolo con questa metodica è 1.2 e 1.5% rispettivamente (2).

#### 3.4 Analisi statistica

L'analisi statistica è stata effettuata su computer MacOS utilizzando il software Statview 5.1 (SAS Institute, Cary, NC, USA). Tutte le variabili d' interesse erano distribuite normalmente e le loro varianze intergruppo erano omogenee, come determinato dai test di Kolmogorov-Smirnov-Lilliefors e Levene rispettivamente. I confronti *post-hoc* sono stati effettuati con il test di Games-Howell. (La numerosità campionaria impiegata assicurava un *power* di 1.0 e 0.97 per i confronti intra-classe (CP) di tocoferolo e retinolo rispettivamente, con α fissato a 0.05). Le ipotesi "zero" di: *i*) nessuna associazione tra retinolemia, tocoferolemia e severità della LC e *ii*) nessuna associazione tra retinolemia, tocoferolemia e presenza di HCC, sono state testate

utilizzando un modello lineare (GLM) avente il retinolo o il tocoferolo come variabile dipendente e il grado di malattia (0: controllo, 1: CPA, 2: CPB e 3: CPC) o la presenza di HCC (0: cirrotico senza HCC, 1: cirrotico con HCC) come variabile indipendente. Il possibile effetto confondente del sesso è stato valutato attraverso la significatività della sua interazione con la variabile indipendente (CP\*sesso, HCC\*sesso). L' effetto confondente di età e BMI è stato controllato attraverso la regressione dei valori di retinolo e tocoferolo vs i valori di BMI e di età e utilizzando i residui della regressione (distribuiti normalmente) come variabile dipendente nel GLM.

#### 4. Risultati

Le variabili d'interesse dei soggetti studiati sono riportate in Tab. 1.

Le analisi preliminari dei dati non evidenziavano nessuna associazione tra l'eziologia della LC e i livelli di retinolo e tocoferolo (ANOVA, p = ns, dati non riportati). Pertanto, l'effetto dell'eziologia non è stato considerato nelle analisi successive.

## 4.1 Effetto di età sesso e BMI

La maggioranza dei pazienti arruolati era di sesso maschile, riflettendo in parte la maggior prevalenza della LC nei maschi. L' interazione CP\*sesso è stata utilizzata per controllare l' effetto confondente del sesso sui valori di retinolemia e tocoferolemia.

L' età era significativamente maggiore nei cirrotici CPC rispetto ai controlli (p < 0.05). Per controllare per l' effetto confondente dell' età, sono stati utilizzati i valori di retinolo e tocoferolo corretti per l' età.

Wt era simile nei cirrotici (p = ns) ma inferiore nei cirrotici rispetto ai controlli (p < 0.05). Similmente, BMI era simile nei cirrotici ma inferiore nei cirrotici CPB rispetto ai controlli (p < 0.05). Poiché BMI tiene in considerazione l' effetto sia di Wt che di Ht ed è un miglior indicatore della composizione corporea rispetto a Wt (12), il controllo

di queste differenze è stato effettuato utilizzando i valori di retinolo e tocoferolo corretti per BMI. La significatività statistica delle differenze inter-classe nei valori di BMI e di retinolo e tocoferolo corretti per BMI non si modificava quando i cirrotici ascitici venivano rimossi dal *dataset* utilizzato per l' analisi (dati non riportati).

# 4.2 Effetto di LC

La retinolemia era significativamente inferiore nei cirrotici (n = 141) rispetto ai controlli (1.08  $\pm$  0.77 vs 2.37  $\pm$  0.94  $\mu$ mol/L, p < 0.0001, ANOVA). Inoltre, le differenze tra i controlli e i pazienti CPA, CPB e CPC erano statisticamente significative (Tab. 1). Età, sesso e BMI non influenzavano la relazione tra retinolemia e CP in maniera significativa (p = ns).

La tocoferolemia era significativamente inferiore nei cirrotici rispetto ai controlli ( $17 \pm 6 \ vs \ 21 \pm 5 \ \mu mol/L$ , p < 0.0005, ANOVA). Mentre un trend discendente era osservabile anche per il tocoferolo tra i controlli e i pazienti CPA, CPB e CPC, le differenze tra i pazienti CPA e CPB non erano statisticamente significative (Tab. 1). Come nello studio precedente (2), la standardizzazione del tocoferolo plasmatico sui lipidi plasmatici totali non modificava questo trend e la sua significatività statistica (dati non riportati). Età, sesso e BMI non

influenzavano la relazione tra tocoferolemia e CP in maniera significativa (p = ns).

# 4.3 Effetto di HCC

Trentaquattro (24%) dei 141 pazienti cirrotici presentavano un HCC secondario alla LC (diagnosi bioptica). I livelli di retinolo erano significativamente inferiori nei cirrotici con HCC rispetto ai cirrotici senza HCC ( $0.38 \pm 0.07 \ vs \ 0.83 \pm 0.08 \ \mu mol/L, p < 0.05, ANOVA) ma i livelli di tocoferolo erano simili (<math>18 \pm 6 \ vs \ 17 \pm 5 \ \mu mol/L, p = ns, ANOVA)$ . Età, sesso e BMI non influenzavano la relazione tra retinolemia o tocoferolemia e HCC in maniera significativa (p = ns). L' interazione CP\*HCC era significativa per il tocoferolo ma non per il retinolo. Anche se questo risultato è interessante perché suggerisce la possibilità di un effetto indipendente dell' HCC sulla retinolemia, esso deve essere preso con cautela in ragione del numero relativamente basso di pazienti disponibili per quest' ultima analisi.

#### 5. Discussione

I cirrotici reclutati per il presente studio erano a dieta libera ed avevano valori simili di Wt e BMI. Pertanto, entro i limiti concessi dalla valutazione antropometrica dello stato nutrizionale, la composizione corporea di questi pazienti poteva essere ritenuta ragionevolmente simile. I pazienti non assumevano inoltre alcool da almeno 3 mesi e non presentavano colestasi di rilevanza clinica, condizioni che possono causare un deficit di retinolo e tocoferolo indipendentemente dalla LC (7, 8). Inoltre, sesso, età e BMI non influenzavano la relazione tra retinolo, tocoferolo e severità della LC.

In questi pazienti, si è evidenziata un' associazione significativa tra i livelli plasmatici di retinolo e la severità della LC (Tab. 1). Inoltre, i pazienti con HCC presentavano una retinolemia inferiore rispetto ai pazienti senza HCC. Che i livelli plasmatici di retinolo tendano a modificarsi in corso di epatopatia cronica non dovrebbe sorprendere dal momento che il 90% del retinolo corporeo è immagazzinato nel fegato (7). Comunque, la spiegazione fisiopatologica di questo riscontro potrebbe non essere così semplice. Se si può essere tentati di speculare che la relazione tra retinolemia, grado di LC e presenza di HCC rifletta un grado crescente di danneggiamento del fegato, si

deve d' altra parte considerare che i livelli plasmatici di queste vitamine sono spesso non correlati ai loro livelli tissutali, specialmente nei pazienti con HCC (13). Appare comunque d' estremo interesse il fatto che il trapianto di fegato riporti la retinolemia ai livelli normali, rinforzando la possibilità che il retinolo plasmatico possa essere utilizzato come marcatore della severità delle epatopatie croniche (5).

Un' associazione meno forte ma nondimeno interessante si è evidenziata tra i livelli plasmatici di tocoferolo e la severità della LC (Tab. 1). Comunque, la tocoferolemia era simile nei pazienti con HCC rispetto a quelli senza HCC. La vitamina E esercita un' azione protettiva nei confronti di diverse epatotossine ROS-producenti anche se gli studi di supplementazione effettuati su pazienti cirrotici non hanno evidenziato alcun beneficio sulla progressione della malattia sottostante (14-16). Contrariamente al retinolo, il tocoferolo non viene mai accumulato in grande quantità nel fegato e ciò potrebbe spiegare in parte il fatto ch' esso sia meno sensibile del retinolo alla severità della LC.

In conclusione, il presente studio dimostra che: i) i livelli plasmatici di retinolo e tocoferolo tendono a decrescere per gradi crescenti di

severità della LC, ii) il retinolo ha un maggior potenziale come indicatore di severità della LC rispetto al tocoferolo, e, iii) i livelli plasmatici di retinolo sono inferiori nei cirrotici con HCC rispetto a quelli senza HCC.

Studi longitudinali sono necessari per stabilire se questi riscontri abbiano rilevanza clinica. In particolare, si dovrebbe verificare se la retinolemia è in grado di aumentare la predittività della classificazione di Child-Pugh relativamente alla morbilità e alla mortalità della cirrosi epatica. Quest' ipotesi è attualmente oggetto d' indagine nell' ambito dello studio multicentrico italiano Dyonisos II.

	Controlli	CPA	СРВ	CPC
n	48	60	51	30
Sesso (m:f; %)	77:23	79:21	85:15	90:10
Età (anni)	$53 \pm 15$ a	$59\pm10^{~a,b}$	$60\pm9^{\mathrm{a,b}}$	63 ± 8 <sup>b</sup>
Wt (kg)	80.1 ± 12.3 a	$72.1 \pm 10.1$ b	70.0 ± 14.4 <sup>b</sup>	$70.9\pm9.8$ $^{\mathrm{b}}$
Ht (m)	1.71 ± 0.09 a	$1.65 \pm 0.07$ b	$1.66 \pm 0.09^{\ a,b}$	$1.66\pm0.07$ a, b
BMI (kg/m²)	$23.5\pm3.6$ <sup>a</sup>	$21.8 \pm 2.6$ b	$21.0 \pm 3.7$ a, b	$21.4 \pm 3.3^{a,b}$
Retinolo (µmol/L)	$2.37\pm0.94$ d	1.50 ± 0.90 °	$0.84 \pm 0.42$ f	$0.56 \pm 0.38$ <sup>g</sup>
Tocoferolo (µmol/L)	21 ± 5 °	18 ± 6 b	18 ± 5 b	15 ± 5 °

 $<sup>^{</sup>a,b,c}$  I valori che non presentano lo stesso *superscript* sono significativamente differenti a un livello di p < 0.05 o  $^{d,e,f,g}$  a un livello di p < 0.01 per CPA vs CPB, CPA vs CPC, CPA vs controllo, CPB vs controllo, CPC vs controllo e a un livello di p < 0.05 per CPB vs CPC.

### 5.1 Tabella 1

#### 5.1 Tabella 1

Caratteristiche antropometriche e livelli plasmatici di retinolo e tocoferolo nei controlli e nei cirrotici. I valori sono espressi come media ± SD. Abbreviazioni: CPA = cirrotico in classe A di Child-Pugh; CPB = cirrotico in classe B di Child-Pugh; CPC = cirrotico in classe C di Child-Pugh; Wt = peso corporeo; Ht = statura; BMI = indice di massa corporea.

#### 6. Bibliografia

- 1. Clot P, Tabone M, Arico S, Albano E. Monitoring oxidative damage in patients with liver cirrhosis and different daily alcohol intake. *Gut* 1994;35:1637-43.
- 2. Rocchi E, Borghi A, Paolillo F, Pradelli M, Casalgrandi G. Carotenoids and liposoluble vitamins in liver cirrhosis. *J. Lab. Clin. Med.* 1991;**118**:176-85.
- 3. Ward RJ, Peters TJ. The antioxidant status of patients with either alcohol-induced liver damage or miopathy. *Alcohol Alcohol*. 1992;27:359-65.
- 4. Bell H, Bjorneboe A, Eidsvoll B, Norum KR, Raknerud N, Try K, et al. Reduced concentration of hepatic alpha-tocopherol in patients with alcoholic liver disease. *Alcohol Alcohol*. 1992;27:39-46.
- 5. Janczewska I, Ericzon BG, Eriksson LS. Influence of orthopic liver transplantation on serum vitamin A levels in patients with chronic liver disease. *Scand. J. Gastroenterol.* 1995;30:68-71.
- 6. Kanematsu T, Kawano T, Sugimachi K. Blood concentration of thirteen vitamins in cirrhotic patients. *Nutrition* 1989;5:179-82.

- 7. Basu TK, Dickerson JW. Vitamin A. In: Basu TK, Dickerson JW, editors. *Vitamins in human health and disease*. Wallingford, UK: CAB International; 1996. p. 148-77.
- 8. Basu TK, Dickerson JW. Vitamin E. In: Basu TK, Dickerson JW, editors. *Vitamins in human health and disease*. Wallingford, UK: CAB International; 1996. p. 214-27.
- 9. Pietrangelo A. Metals, oxidative stress and hepatic fibrogenesis. Sem. Liver Dis. 1996;16:13-30.
- 10. Pugh NRH, Murray-Lyon IM, Dawson JL, Pietroni MC, Williams R. Transection of oesephagus for bleeding oesophageal varices. *Br. J. Surg.* 1973;**60**:646-9.
- 11. Battistini N, Bedogni G, editors. Manuale di Riferimento per la Standardizzazione Antropometrica (edizione italiana). Milano: EDRA; 1992.
- 12. Garrow JS, Webster J. Quetelet' s index (w/h²) as a measure of fatness. *Int. J. Obes.* 1985;9:147-53.
- 13. Rocchi E, Seium Y, Camellini L, Casalgrandi G, Borghi A, D'Alimonte P, et al. Hepatic tocopherol content in primary

hepatocellular carcinoma and liver metastases. *Hepatol*. 1997;**26**:67-72.

- 14. Sokol RJ. Vitamin E. In: Ziegler EE, Filer LJ jr, editors. *Present knowledge in nutrition*. Washington: ILSI Press; 1996. p. 130-6.
- 15. Pascoe GA, Reed DJ. Vitamin E protection against chemical-induced cell injury. II Evidence for a threshold effect of alphatocopherol in prevention of adryamicin toxicity. *Arch. Biochem. Biophys.* 1987;256:159-66.
- 16. de la Maza MP, Petermann M, Bonout D, Hirsch S. Effects of long-term vitamin E supplementation on alcoholic cirrhotics. *J. Am. Coll. Nutr.* 1995;14:192-6.

# 7. Ringraziamenti

Desidero ringraziare il Prof. Nino Carlo Battistini (Cattedra di Alimentazione e Nutrizione Umana) per la fiducia e l' autonomia che mi ha sempre accordato in questi 13 anni di appassionante lavoro insieme sulla nutrizione nel sano e nell' ammalato; il Dott. Athos Borghi (Medicina II) per l' insostituibile attività tutoriale clinica svolta negli 11 anni in cui ho frequentato, prima da studente e poi da specializzando, la "Semeiotica Medica"; infine il Prof. Emilio Rocchi (Medicina II) per la disponibilità a servirmi della sua casistica e della sua esperienza in campo di vitaminologia clinica per realizzare il presente studio.