



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
FIRENZE

FLORE

## Repository istituzionale dell'Università degli Studi di Firenze

### **Reactive metabolites of oxygen, lipid peroxidation, total antioxidant capacity and vitamin E in essential arterial hypertension.**

Questa è la Versione finale referata (Post print/Accepted manuscript) della seguente pubblicazione:

*Original Citation:*

Reactive metabolites of oxygen, lipid peroxidation, total antioxidant capacity and vitamin E in essential arterial hypertension / V.DIGIESI; C.OLIVIERO; V.GIANNÒ; M.ROSSETTI; C.FIORILLO; A.ORADEI; M. LENUZZA; P. NASSI. - In: LA CLINICA TERAPEUTICA. - ISSN 0009-9074. - STAMPA. - 148:(1997), pp. 515-519.

*Availability:*

This version is available at: 2158/324164 since:

*Terms of use:*

Open Access

La pubblicazione è resa disponibile sotto le norme e i termini della licenza di deposito, secondo quanto stabilito dalla Policy per l'accesso aperto dell'Università degli Studi di Firenze (<https://www.sba.unifi.it/upload/policy-oa-2016-1.pdf>)

*Publisher copyright claim:*

(Article begins on next page)

La  
C l i n i c a  
T e r a p e u t i c a

ARTICOLI  
ORIGINALI

Vincenzo Digiesi\* - Ciro Oliviero° - Valeria Giannò\*  
Mauro Rossetti° - Claudia Fiorillo°°  
Alessandro Oradei\*\* - Mauro Lenuzza\* - Paolo Nassi°°

Università degli Studi di Firenze  
Istituto di Medicina interna e immunoallergologia \*  
Dipartimento di Scienze Biochimiche°°  
Azienda ospedaliera Careggi di Firenze°  
Dipartimento di Laboratorio  
Università Cattolica del Sacro Cuore di Roma\*\*  
Istituto di Chimica e Chimica Clinica

## Metaboliti reattivi dell'ossigeno, perossidazione lipidica, capacità antiossidante totale e vitamina E nell'ipertensione arteriosa essenziale

**Key words:** Reactive oxygen species - Antioxidants - Hypertension

Alle specie reattive dell'ossigeno è stato attribuito un ruolo nella patogenesi di molte malattie, comprese quelle cardiocircolatorie. I fattori ossidanti ed antiossidanti sono stati studiati anche nell'ipertensione arteriosa essenziale (IAE) ed è stato sostenuto che i radicali superossidi hanno un ruolo determinante nella patogenesi dell'ipertensione spontanea del ratto (10) e che le specie ossidanti hanno un ruolo coadiuvante anche nella patogenesi dell'IAE nell'uomo (6). Particolare importanza è attribuita all'antagonismo e all'inattivazione indotta dal radicale superossido sulla vasodila-

tazione da monossido di azoto. La NADPH ossidasi dei granulociti neutrofili è stata riscontrata, nell'IAE, normale (13) o aumentata, specie nelle forme gravi (12); la produzione di radicali liberi dell'ossigeno dai granulociti neutrofili è aumentata (6, 9, 11) specie nelle forme gravi di IAE (12), ma non dai fagociti di sangue intero, in condizioni di riposo o stimolati (14). I livelli plasmatici di perossidi lipidici sono più alti nell'IAE (6, 11, 16), le lipoproteine LDL contengono maggiore quantità di perossidi lipidici ed acidi grassi insaturi (5) e sono più suscettibili all'ossidazione in vitro e ossi-

Questa ricerca è stata finanziata in parte con fondi del Ministero dell'Università e della ricerca scientifica e tecnologica.

date più rapidamente in vivo (8), gli eritrociti sono più suscettibili alla perossidazione lipidica (16). Per quanto riguarda le vitamine dotate di azione antiossidante, nell'IAE la vitamina E è normale nel siero (15), diminuita negli eritrociti (6) e nelle lipoproteine LDL (8); la vitamina C è diminuita nel siero (1, 2, 15).

Scopo di questa ricerca è misurare nel plasma la concentrazione di metaboliti reattivi dell'ossigeno, di alcuni prodotti della perossidazione lipidica e della vitamina E e la capacità antiossidante totale in soggetti affetti da IAE, al fine di evidenziarne una eventuale variazione rispetto a soggetti normali, comparabili per età e sesso.

## PAZIENTI E METODI

Sono stati studiati 2 gruppi di soggetti: il gruppo I formato da 15 soggetti senza malattie di rilievo, 8 maschi e 7 femmine, di età compresa fra 40 e 70 e di valore medio ( $\pm$  ES)  $50,3 \pm 3$  anni, con pressione arteriosa (valore medio  $\pm$  ES) sistolica  $130 \pm 3$  e diastolica  $78 \pm 3$  mmHg; il gruppo II formato da 15 soggetti affetti da IAE (7 di stadio 1 e 8 di stadio 2 secondo la classificazione OMS), senza alcuna terapia, 8 maschi e 7 femmine, di età compresa fra 40 e 70 e di valore medio  $50,9 \pm 4$  anni, con pressione arteriosa sistolica  $161,3 \pm 4$  e diastolica  $99,5 \pm 3$  mmHg.

Nessuno dei soggetti esaminati era affetto da altre malattie di rilievo e le comuni indagini di laboratorio riguardanti le funzioni ematologica, renale ed epatica, il metabolismo glicidico ed idroelettrolitico erano normali, ad eccezione in alcuni soggetti affetti da IAE con lieve ipercolesterolemia e/o ipertrigliceridemia.

Nei soggetti in esame sono stati misurati nel plasma:

a) i metaboliti reattivi dell'ossigeno con metodo spettrofotometrico (d-ROMS test, Diacron), i risultati sono stati espressi in unità convenzionali, il valore di 1 U. corrisponde ad una concentrazione di perossido di idrogeno di  $0,08$  mg%;

b) i livelli di malondialdeide e di 4-idrossi-al-

chenali con metodo spettrofotometrico (LPO-586, Bioxytech);

c) la capacità antiossidante totale con metodo spettrofotometrico (TAS test, Randox);

d) la concentrazione di vitamina E con metodo HPLC (3).

La pressione arteriosa è stata misurata, in tre giorni diversi, con sfigmomanometro Riva-Rocci, al braccio destro, al soggetto in posizione seduta, dopo un periodo di riposo di 5 minuti ed il valore considerato è stato la media aritmetica delle tre misure, sia della pressione arteriosa sistolica che della diastolica. Per la valutazione statistica è stato usato il test del t di Student per campioni indipendenti. Un valore di  $P < 0,05$  è stato accettato come statisticamente significativo.

## RISULTATI

I radicali liberi dell'ossigeno nel plasma sono risultati (valore medio  $\pm$  ES) nel I gruppo  $249,2 \pm 23,34$  U. e nel II gruppo  $334,75 \pm 21,58$  U. Differenza statisticamente significativa ( $p < 0,01$ ) è risultata fra i due gruppi.

I prodotti plasmatici della perossidazione lipidica (malondialdeide e 4-idrossialchenali) sono risultati nel I gruppo  $8,09 \pm 0,92$  nmol/ml e nel II gruppo  $10,73 \pm 0,74$  nmol/ml. La differenza fra questi gruppi è risultata statisticamente significativa ( $p < 0,05$ ).

Esaminando singolarmente i casi si osserva peraltro che esistono casi di IAE che presentano valori normali di radicali liberi dell'ossigeno o di prodotti della perossidazione lipidica. Generalmente i valori normali si osservano in soggetti con IAE iniziale ed insorta in età meno avanzata.

La vitamina E plasmatica è risultata nel I gruppo  $10,98 \pm 0,44$   $\mu$ g/ml e nel II gruppo  $10,37 \pm 0,55$   $\mu$ g/ml. Nessuna differenza fra questi gruppi è risultata statisticamente significativa. La capacità plasmatica antiossidante totale è risultata nel I gruppo  $0,94 \pm 0,04$  e nel II gruppo  $1,03 \pm 0,05$  mmol/L, risultando così non statisticamente differente fra i due gruppi.

## DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

In questa ricerca è stato osservato che i soggetti con IAE hanno un aumento statisticamente significativo nel plasma dei radicali liberi dell'ossigeno e dei prodotti della perossidazione lipidica rispetto a soggetti senza patologia di rilievo di età compresa fra 40 e 70 anni. Analizzando singolarmente i casi si osserva però che esistono soggetti con IAE che hanno nel plasma valori normali di radicali liberi dell'ossigeno o di prodotti della perossidazione lipidica; ciò avviene generalmente in soggetti di età più giovanile con IAE di minor durata o meno grave.

I prodotti della perossidazione lipidica sono pertanto risultati, di regola, diversi nei soggetti con IAE rispetto ai normali, analogamente a quanto osservato da altri autori (6, 11, 16). Pertanto l'IAE appare rappresentare un fattore di facilitazione di produzione di radicali liberi dell'ossigeno. L'aumento di tali radicali sarebbe dannoso nell'IAE in quanto determinerebbe aumento di degradazione di prostaciclina e del fattore endoteliale di rilascio (4) e aumento della perossidazione lipidica delle lipoproteine a bassa densità con aumento ed accelerazione dell'aterosclerosi (5).

L'ischemia relativa in cui si trovano le cellule degli organi nell'IAE, a causa soprattutto dell'aumento delle resistenze periferiche, dovrebbe essere fattore capace di causare un aumento di produzione di radicali liberi.

Nelle cellule aerobiche si può produrre radicale superossido nel sistema mitocondriale di trasporto degli elettroni, a causa dell'insufficiente riduzione dell'ossigeno; l'enzima xantina ossidasi può essere sorgente di radicali superossidi, come avviene nella riperfusione di tessuti ischemici.

Anche l'aumento della pressione all'interno dei vasi potrebbe avere un ruolo nella produzione di specie reattive dell'ossigeno danneggiando soprattutto le cellule endoteliali. I radicali liberi proverrebbero anche dai granulociti neutrofili attivati (6, 9, 11).

L'ipertensione arteriosa potrebbe essere quindi un fattore facilitante la produzione di radicali liberi dell'ossigeno i quali determinerebbero aumen-

to dei prodotti della perossidazione lipidica in rapporto ai fattori antiossidanti presenti ed alla situazione del metabolismo lipidico.

La misurazione nel sangue in soggetti con IAE dei fattori ossidanti o antiossidanti appare pertanto utile, accanto all'esame degli altri fattori metabolici di regola esaminati nell'IAE, al fine di valutare gli eventuali danni che l'aumento delle sostanze ossidanti o la diminuzione di quelle antiossidanti potrebbero recare all'organismo. Ciò al fine di correggere, se possibile, con terapia dietetica o farmacologica l'eventuale alterazione presente, progetto che attualmente è oggetto di ricerche in corso.

## RIASSUNTO

Alle specie reattive dell'ossigeno è stato attribuito un ruolo nella patogenesi di molte malattie, comprese quelle cardiocircolatorie fra cui anche l'ipertensione arteriosa.

Scopo di questa ricerca è misurare nel plasma i radicali liberi dell'ossigeno, alcuni prodotti della perossidazione lipidica, la capacità antiossidante totale e la vitamina E in soggetti affetti da ipertensione arteriosa essenziale (IAE) senza alcuna terapia dietetica o farmacologica, al fine di evidenziarne una eventuale variazione rispetto a soggetti normali.

Sono stati studiati 2 gruppi di soggetti: il I formato da 15 soggetti senza malattie di rilievo, 8 maschi e 7 femmine, di età compresa fra 40 e 70 anni e di valore medio  $50,3 \pm 3$  anni, con pressione arteriosa (valore medio  $\pm$  E.S.) sistolica  $130 \pm 3$  e diastolica  $78 \pm 3$  mmHg; il II formato da 15 soggetti affetti da IAE (7 di stadio 1 e 8 di stadio 2, secondo la classificazione OMS), senza alcuna terapia, 8 maschi e 7 femmine, di età compresa fra 40 e 70 e di valore medio  $50,9 \pm 4$  anni, con pressione arteriosa sistolica  $161,3 \pm 4$  e diastolica  $99,5 \pm 3$  mmHg.

Nessuno dei soggetti esaminati era affetto da altre malattie di rilievo e le comuni indagini di laboratorio riguardanti le funzioni ematologica, renale ed epatica, il metabolismo glicidico ed idro-elettrolitico erano normali, ad eccezione in alcuni soggetti affetti da IAE con lieve ipercolesterolemia e/o ipertrigliceridemia.

Nei soggetti in esame sono stati misurati nel plasma:  
a) i metaboliti reattivi dell'ossigeno con metodo spettrofotometrico (d-ROMS test, Diacron);  
b) i livelli di malondialdeide e di 4-idrossi-alchenali con metodo spettrofotometrico (LPO-586, Bioxytech);  
c) la capacità antiossidante totale con metodo spettrofotometrico (TAS test, Randox);  
d) la concentrazione di vitamina E con metodo HPLC (3)

I radicali liberi dell'ossigeno nel plasma sono risultati (valore medio  $\pm$  ES) nel I gruppo  $249,2 \pm 23,34$  e nel II gruppo  $334,75 \pm 21,58$  U. con differenza statisticamente significativa fra i due gruppi ( $p < 0,01$ ).

I prodotti plasmatici della perossidazione lipidica (malondialdeide e 4-idrossialchenali) sono risultati nel I gruppo  $8,09 \pm 0,92$  nmol/ml e nel II gruppo  $10,73 \pm 0,74$  nmol/ml con differenza statisticamente significativa ( $p < 0,05$ ).

Esaminando singolarmente i casi si osserva peraltro che esistono casi di IAE che presentano valori di radicali liberi dell'ossigeno e di prodotti della perossidazione lipidica nell'ambito della norma, generalmente in soggetti con IAE iniziale, insorta in età meno avanzata e di minor durata.

La capacità plasmatica antiossidante totale e la concentrazione plasmatica di vitamina E non sono risultate statisticamente differenti fra i due gruppi di soggetti esaminati.

Lipertensione arteriosa, attraverso vari meccanismi quali l'ischemia cronica e l'aumento della pressione intravasale potrebbe costituire un fattore facilitante la produzione di radicali liberi dell'ossigeno i quali determinerebbero aumento dei prodotti della perossidazione lipidica in rapporto ai fattori antiossidanti presenti ed alla situazione del metabolismo lipidico. Inoltre essi inattiverebbero la prostaciclina ed il NO, con conseguente aumento delle resistenze periferiche e dell'ipertensione arteriosa.

La misurazione nel sangue in soggetti con IAE dei fattori ossidanti o antiossidanti appare pertanto utile, accanto all'esame degli altri fattori metabolici di regola esaminati nell'IAE, al fine di valutare gli eventuali danni che l'aumento delle sostanze ossidanti o la diminuzione di quelle antiossidanti potrebbero recare all'organismo. Ciò al fine di correggere, se possibile, con terapia dietetica o farmacologica l'eventuale alterazione presente.

## SUMMARY

### REACTIVE OXYGEN METABOLITES, LIPID PEROXIDATION PRODUCTS, TOTAL ANTIOXIDANT CAPACITY AND VITAMIN E IN ESSENTIAL ARTERIAL HYPERTENSION

Free radical oxidative stress has been implicated in the pathogenesis of a variety of human diseases.

The purpose of this study was to explore the degree of oxidative stress in essential arterial hypertension (EAH). The study groups consisted of fifteen untreated EAH patients (WHO stages 1 and 2), aged 40 to 70 years, and fifteen, age and sex matched, normal controls. The levels of typical peroxidation products such as malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals (with the LPO-586 test, Bioxytech), free radicals and other reactive oxygen metabolites (ROMs) (with the d-ROMs test, Diacron), vitamin E (with HPLC method) and total antioxidant capacity (with the TAS test, Randox) were determined in the plasma of all subjects. Compared to the control group EAH patients exhibited significantly higher ROMs levels ( $334.7 \pm 21.6$  vs  $249.2 \pm 23.3$  Units, means values  $\pm$  S.E.M.), and of lipid peroxidation products ( $10.7 \pm 0.7$  vs  $8.09 \pm 0.9$  nmol/ml). It must be noted that such increases were not observed in all EAH patients, but above all in those less young or with more severe hypertension.

On the other hand no significant difference was found between EAH patients and normal controls as regards vitamin E concentration and total antioxidant capacity.

These results suggest that EAH patients, in spite of their normal antioxidant defences, are proner than normotensive subjects to oxidative stress because of an increased ROMs production. This could result in an inactivation of prostacyclin and NO, hence an enhancement of peripheral vascular resistance and an increase of hypertension. Another consequence might be an increased lipid peroxidation of low density lipoproteins, a condition which is known to be associated with accelerated atherosclerosis.

The study of oxidant and antioxidant factors seems therefore useful in EAH patients in order to evaluate oxidative stress and to correct, if possible, the observed abnormalities with dietetic or pharmacologic therapy.

## BIBLIOGRAFIA

1. Bulpitt C.J.: *Vitamin C and blood pressure*. J. Hypertens. 8: 1071-1075, 1980.
2. Ceriello A., Giugliano D., Quatraro A., Lefebvre P.J.: *Anti-oxidants show an anti-hypertensive effect in diabetic and hypertensive subjects*. Clin. Sci. 81: 739-742, 1991.
3. Erikson T., Soerensen B.: *High performance liquid chromatography of vitamin E*. Acta Pharmac. Sued. 14: 478-484, 1977.
4. Gryglewski R.J., Palmer R.M., Moncada S.: *Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor*. Nature 320: 454-456, 1986.
5. Keidar S., Kaplan M., Shapira C., Brook J.G., Aviram M.: *Low density lipoprotein isolated from patients with essential hypertension exhibits increased propensity for oxidation and enhanced uptake by macrophages: a possible role for angiotensin II*. Atherosclerosis 107: 71-84, 1994.
6. Kumar K.V., Das U.N.: *Are free radicals involved in the pathobiology of human essential hypertension?* Free Radic. Res. Commun. 19: 59-66, 1993.
7. Kuznetsov N.S., Abulela A.M., Neskromnyi V.N.: *The comparative evaluation of the efficacy of tocopherol acetate in the combined treatment of patients with hypertension and diabetes mellitus*. Vrach. Delo 9-12: 133-136, 1994.
8. Maggi E., Marchesi E., Ravetta V., Falaschi F., Finardi G., Bellomo G.: *Low-density lipoprotein oxidation in essential hypertension*. J. Hypertens. 11: 1103-1111, 1993.
9. Mehta J.L., Lopez L.M., Chen L., Cox O.E.: *Alterations in nitric oxide synthase activity, superoxide anion generation and platelet aggregation in systemic hypertension, and effects of celiprolol*. Am. J. Cardiol. 74: 901-905, 1994.
10. Nakazono K., Watanabe N., Matsuno K., Sasaki J., Sato T., Inoue M.: *Does superoxide underlies the pathogenesis of hypertension?* Proc. Natl. Acad. Sci. 88: 10045-10048, 1991.
11. Prabha P.S., Das U.N., Koraktar R., Sagar P.S., Ramesh G.: *Free radical generation, lipid peroxidation and essential fatty acids in uncontrolled essential hypertension*. Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids 41: 27-33, 1990.
12. Sagar S., Kallo I.J., Kaul N., Ganguly N.K., Sharma B.K.: *Oxygen free radicals in essential hypertension*. Mol. Cell. Biochem. 111: 103-108, 1992.
13. Seifert R., Hilgenstock G., Fassbender M., Distler A.: *Regulation of the superoxide-forming NADPH oxidase of human neutrophils is not altered in essential hypertension*. J. Hypertens. 9: 147-153, 1991.
14. Soska V., Zechmeister A., Siegelova J., Lojek A.: *Free oxygen radicals in patients with hypertension*. Cas. Lek. Cesk. 130: 645-647, 1991.
15. Tse W.Y., Maxwell S.R., Thomason H., Blann A., Thorpe G.H., Waite M., Holder R.: *Antioxidant status in controlled and uncontrolled hypertension and its relationship to endothelial damage*. J. Hum. Hypertens. 8: 843-849, 1994.
16. Uysal M., Bulur H., Sener D., Oz H.: *Lipid peroxidation in patients with essential hypertension*. Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol. 24: 474-476, 1986.

Prof. Vincenzo Digiesi. Via Cairoli, 18 - Firenze  
Dott. Ciro Oliviero. Via di Filetto, 11/C - Scarperia (Fi)  
Dott. Valeria Giannò. Via di Peretola, 272 - Firenze  
Dott. Mauro Rossetti. Via Dati, 1 - Firenze  
Dott. Claudia Fiorillo. Via da S. Giovanni, 1/C - Firenze  
Dott. Alessandro Oradei. Via Properzio, 32 - Roma  
Dott. Mauro Lenuzza. Via Lambruschini, 44 - Firenze  
Prof. Paolo Nassi. Via Duprè, 5 - Fiesole

Lavoro ricevuto il 2 settembre 1997.