

M. COCCHI¹, L. TONELLO¹,
G. CAPPELLO¹, S. BOSI²,
A. CREMONESI², F. CASTRIOTA²,
M. MERCANTE², G. TAROZZI³,
D. BOCHICCHIO⁴,
G. DELLA CASA⁴, G. CARAMIA⁵

PROGRESS IN NUTRITION
VOL. 10, N. 1, 48-52, 2008

TITLE

Membrane platelet fatty acids: a model of biochemical characterisation of the ischemic cardiovascular disease, through an Artificial Neural Network interpretation

KEY WORDS

Platelet, stearic acid, stearic/oleic ratio, artificial neural network, myocardial ischemia

PAROLE CHIAVE

Piastrine, acido stearico, rapporto stearico/oleico, reti neurali artificiali, ischemia miocardica

¹ DIMORFIPA - Università di Bologna, Centro di Biologia Molecolare, Fondazione "Villa Maria"

² "Villa Maria Cecilia" Hospital, Cotignola, Ravenna

³ Dipartimento di Scienze della Sanità Pubblica, Università di Modena e Reggio Emilia

⁴ C.R.A. - Istituto Sperimentale per la Zootecnia - Sezione Operativa di Modena

⁵ Primario Emerito Azienda Ospedaliera Materno Infantile G. Salesi, Ancona

Indirizzo per la corrispondenza:
Prof. Massimo Cocchi
E-mail: massimo.cocchi@unibo.it

Acidi grassi delle piastrine: un modello di tipizzazione biochimica della cardiopatia vascolare ischemica nell'interpretazione di una Rete Neurale Artificiale

Summary

During the last 30 years, a huge research has been performed about the markers involved in the atherogenetic process and in the fatty acid thrombogenic effect. More recently many studies have been made on the biochemical aspects of the saturated fatty acids with respect to the cardiovascular risk, in particular, the Stearic Acid (SA). Because of the peculiar characteristic of the platelets in the control of the thrombogenic risk, we have investigated the platelet fatty acid profile in three groups of subjects: supposed healthy (n=60), ischemic (n= 50). The aim of the study was to understand which of the fatty acids could be evaluated as markers of the ischemic cardiovascular pathology and to have the possibility to classify the subjects using the artificial neural network (ANN) system. The results highlight the peculiar position of the Oleic Acid, Linoleic Acid and Arachidonic Acid. Particularly it has been underlined the possibility to modify the platelet stearic and oleic acid to obtain a better saturation index (Stearic/Oleic ratio). This could bring to a better control of the cardiovascular risk.

Riassunto

Negli ultimi 30 anni, sono stati sviluppati numerosi studi alla ricerca di Markers coinvolti nel determinismo della patologia Atero-genetica e della tendenza trombo-genetica degli acidi grassi. Recenti e numerosi studi hanno riletto in chiave biochimico-nutrizionale l'influenza degli acidi grassi saturi sul rischio cardio-vascolare atero-genetico rivalutando, in positivo, il ruolo dell'Acido Stearico (AS). Identificando nelle Piastrine un tessuto di particolare interesse relativamente alla composizione in acidi grassi nel loro ruolo critico nel controllo del processo emo-coagulativo e, quindi, dell'eventuale rischio trombo-genetico, abbiamo ritenuto di indagare il profilo degli acidi grassi piastrinici in un gruppo di Soggetti con diagnosi di Cardiopatia Vascolare Ischemica (n=50), confrontato con un gruppo di Soggetti supposti sani (n=60). L'obiettivo era quello di identificare gli eventuali Acidi Grassi che potevano essere considerati markers tipizzanti la patologia. I valori misurati sono stati analizzati con diverse metodologie, sia di tipo statistico tradizionale che più avanzate. I risultati ottenuti pongono in posizione peculiare l'Acido Oleico (AO), l'Acido Linoleico (AL) e l'Acido Arachidonico (AA).

Introduzione

Una vasta ricerca scientifica ha affrontato lo studio degli acidi grassi valutati in più frazioni bio-umorali dell'organismo umano (fosfolipidi plasmatici, esteri del colesterolo, eritrociti, ecc.) al fine di individuare il coinvolgimento delle diverse componenti acide, in particolare di quelle sature, sul determinismo del fenomeno aterogenico e di quegli aspetti della emo-coagulazione che inducono il rischio trombotico (1-12).

Relativamente al suddetto aspetto si è molto indagato sul ruolo dell'Acido Palmitico, dell'AS sul versante degli Acidi Grassi Saturi; dell'AO, AL ed AA sul versante degli Acidi Grassi Insaturi. Per ciascuno di questi si è cercato di individuare le responsabilità negative e positive rispetto alla complessa fenomenologia che caratterizza la Patologia Cardiovascolare nei suoi risvolti ischemici.

Materiali e metodi

Lo studio in oggetto è stato condotto reclutando 50 pazienti (17 femmine e 33 maschi, età media: 68.00, DS: \pm 9.50) con diagnosi di Patologia Cardiovascolare Ischemica confermata mediante intervento emodinamico e 60 soggetti (22 femmine e 38 maschi, età media: 33.97, DS: \pm 12.40) supposti sani.

Preparazione del campione ematico

Campioni di sangue (10/12 ml), per l'estrazione delle piastrine, sono stati ottenuti per prelievo dalla vena ante cubitale dei soggetti patologici e dei soggetti normali. In tutti i casi, il campione ematico ha subito un trattamento anti-coagulante con EDTA (Vacutainer, England). Le Piastrine sono state preparate essenzialmente come descritto da Iida et al (13).

Quantificazione del profilo degli acidi grassi dei fosfolipidi piastrinici

La quantificazione degli acidi grassi dei fosfolipidi piastrinici è stata ottenuta mediante gas-cromatografia con colonna capillare avendo eseguito precedentemente la purificazione delle frazioni lipidiche mediante TLC in accordo con Passi et al (14).

Valutazione ed analisi statistico-matematica dei parametri indagati

Gli Acidi Grassi dei 2 gruppi sono stati confrontati utilizzando diversi metodi statistici: si è effettuata l'Analisi della Varianza (1-way ANOVA), l'Analisi Discriminante nella forma Standard e Stepwise (sia Backward che Forward).

Si è altresì indagato il campione utilizzando una Rete Neurale Artificiale

di tipo Self Organizing Map (Kohonen Neural Network) (15, 16) e mediante la realizzazione di un Albero di tipo Classification Tree secondo il modulo *Multivariate exploratory technique* del software *Statistica 6* [(StatSoft, Inc. (2004). STATISTICA (data analysis software system), version 6. www.statsoft.com)].

Risultati

L'Analisi della Varianza ha evidenziato differenze significative fra i parametri investigati secondo quanto riportato nella tabella 1.

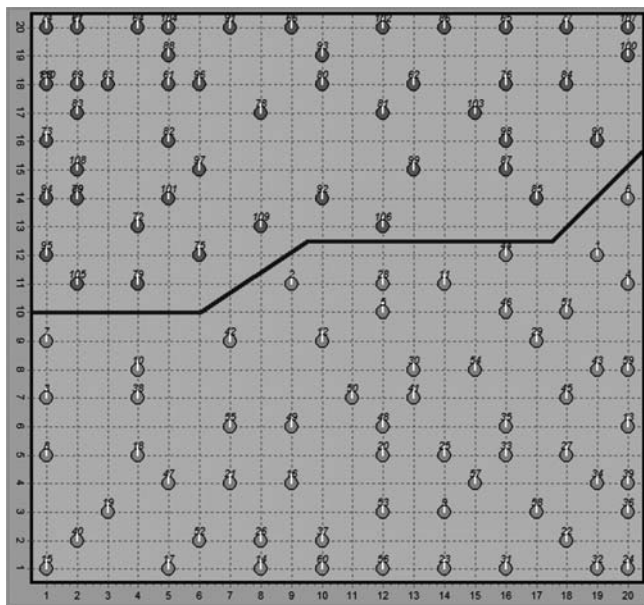
L'Analisi Discriminante ha raggiunto un'accuratezza, sensibilità e specificità del 100% sia con approccio Standard che con approccio di tipo Stepwise. Tuttavia, nella forma standard ha utilizzato tutti 11 gli acidi grassi; nella forma Forward Stepwise ha escluso solamente l'Acido Palmitoleico; nella forma Backward Stepwise sono stati necessari solo i seguenti 3 acidi grassi: AO, AL ed AA. Si è quindi deciso di concentrare l'attenzione dello studio su questi 3 acidi grassi.

Al fine di analizzare più approfonditamente i risultati ottenuti e di avere un diverso punto di vista, si è costruita una Rete Neurale Artificiale di tipo Self Organizing Map (SOM) o Rete di Kohonen. Alla SOM sono stati somministrati solamente i valori degli acidi grassi (AO, AL, AA) di tutti i soggetti indagati in forma na-

Tabella 1 - L'analisi della varianza ha evidenziato differenze significative fra i parametri investigati

Acidi Grassi	Normali (m±DS)	Patologici (m±DS)	p
C14:0	0.87±0.59	0.34±0.26	< 0.01
C16:0	20.68±2.15	23.32±3.17	< 0.01
C16:1	1.48±0.71	0.74±0.54	< 0.01
C18:0	11.23±3.00	17.65±2.50	< 0.01
C18:1 n9	22.19±2.08	17.48±2.14	< 0.01
C18:1 n7	1.82±0.64	1.04±0.46	< 0.01
C18:2 n6	19.41±2.69	10.51±3.44	< 0.01
C18:3 n3	0.48±0.17	0.59±0.30	< 0.05
C20:3 n3	2.11±0.76	0.73±0.42	< 0.01
C20:4	14.06±2.41	15.17±3.01	< 0.05
C22:6 n3	2.09±0.80	1.87±0.70	n.s.

Figura 1 - Suddivisione dei soggetti patologici e normali secondo la SOM: nella parte in alto della mappa sono presenti tutti i soggetti patologici, nella parte in basso i soggetti sani. La linea che attraversa la mappa clusterizza in modo netto le due categorie di soggetti



scosta, cioè senza specificare i casi patologici e quelli non patologici. La SOM, dopo l'addestramento, ha distribuito i diversi soggetti in una superficie (mappa). I diversi soggetti mappati si sono posizionati a seconda della loro condizione: i soggetti sani nella parte inferiore ed i soggetti patologici in quella superiore. Osservata una evidente tendenza della rete alla formazione di due clusters, si è sovrapposta una linea nera di demarcazione che ne evidenzia la suddivisione. Il risultato finale è riportato nella figura 1.

Al fine di confermare il risultato suggerito dalla SOM, si è realizzato un Albero di Classificazione. Detto Albero è stato costruito utilizzando l'intero profilo degli acidi grassi caratterizzante la composizione piastriatica di tutti i soggetti con, in aggiunta rispetto alla SOM, l'informazione della classificazione patologica. L'albero ha ritenuto sufficienti, al fine di ottenere accuratezza, sensibilità e specificità del 100%, l'utilizzo di 2 soli acidi grassi: acido Oleico e acido Linoleico. La SOM e l'Albero sono concordi nell'affermare che la Patologia si caratterizza per ridotti valori di AO e AL.

Conclusioni

L'evidenza sperimentale ottenuta conferma che è possibile, attraverso l'analisi degli acidi grassi delle pia-

strine, confermare la diagnosi di Patologia Cardiovascolare Ischemica. La chiara suddivisione fra popolazione normale e patologica ci consente di supporre che qualunque individuo presenti un profilo di acidi grassi piastrinici tale da collocarlo nell'area degli individui patologici, possa essere considerato ad alto rischio di patologia cardiovascolare ischemica.

La conferma del ruolo dominante e determinante di AO, AL ed AA, trova ampio riscontro nella letteratura internazionale (17-34) in riferimento al determinismo della Patologia Cardiovascolare Ischemica. Sono note, infatti, le molteplici attività dell'AO e dell'AL nelle diverse funzioni che regolano il comportamento piastrinico nonché il ruolo dell'AA sul fenomeno dell'aggregazione piastrinica. Nella sperimentazione condotta è risultato evidente come venga meno l'effetto protettivo dell'AO e AL e come conseguentemente l'AA possa esercitare eventuali influenze negative sull'omeostasi funzionale della piastrina. È opinione degli autori, anche in base alle molteplici valutazioni che sono state effettuate in altre ricerche su diversi gruppi di popolazioni, relativamente al profilo degli acidi grassi delle piastrine, che le condizioni individuate nella patologia cardiovascolare ischemica siano più riconducibili ad una espressione genetica che a significative influenze del modello alimentare. Rimane

tuttavia chiaro e confermato che un comportamento alimentare che privilegi l'uso sistematico di olio di oliva e del suo patrimonio anti-ossidante possa risultare efficace nel controllo positivo dei fattori di rischio individuati quantomeno in tutti quegli individui che nella SOM trovano un collocamento più vicino alla normalità o comunque borderline. Per la valutazione di questo aspetto potrebbe risultare determinante l'individuazione di un coefficiente di saturazione che dia migliore comprensione del rischio e della possibilità, quindi, di un intervento nutrizionale mirato.

Bibliografia

1. Renaud S. Dietary fats and arterial thrombosis. *Thromb Res* 1974; 4(0): suppl 1: 25-35.
2. Marckmann P, Sandstrom B, Jespersen J. Effects of total fat content and fatty acid composition in diet on factor VII coagulant activity and blood lipids. *Atherosclerosis* 1990; 80: 227-33.
3. Kwon JS, Snook JT, Wardlaw GM, Hwang DH. Effects of diets high in saturated fatty acids, canola oil, or safflower oil on platelet function, thromboxane B2 formation, and fatty acid composition of platelet phospholipids. *Am J Clin Nutr* 1991; 54: 351-8.
4. Thaulow E, Erikssen J, Sandvik L, Stormorken H, Cohn PF. Blood platelet count and function are related to total and cardiovascular death in apparently healthy men. *Circulation* 1991; 84: 613-7.
5. Renaud S, Dumont E, Godsey F, et al. Dissimilar responses of platelets to dietary stearic and palmitic acids. *Am J Clin Nutr* 1994; 60: 1059S.
6. Hornstra G, Kester AD. Effect of the dietary fat type on arterial thrombosis tendency: systematic studies with a rat model. *Atherosclerosis* 1997; 131: 25-33.
7. Hunter KA, Crosbie LC, Weir A, Miller GJ, Dutta-Roy AK. A residential study comparing the effects of diets rich in stearic acid, oleic acid, and linoleic acid on fasting blood lipids, hemostatic variables and platelets in young healthy men. *J Nutr Biochem* 2000; 11: 408-16.
8. Hunter KA, Crosbie LC, Horgan GW, Miller GJ, Dutta-Roy AK. Effect of diets rich in oleic acid, stearic acid and linoleic acid on postprandial haemostatic factors in young healthy men. *Br J Nutr* 2001; 86 (2): 207-15.
9. Yli-Jama P, Meyer HE, Ringstad J, Pedersen JI. Serum free fatty acid pattern and risk of myocardial infarction: a case-control study. *J Int Med* 2002; 251 (1): 19-28.
10. German JB, Dillard CJ. Saturated fats: what dietary intake? *Am J Clin Nutr* 2004; 80 (3): 550-559.
11. Thijssen MA, Mensink RP. Small differences in the effects of stearic acid, oleic acid, and linoleic acid on the serum lipoprotein profile of humans. *Am J Clin Nutr* 2005; 82: 510-6.
12. Thijssen MA, Hornstra G, Mensink RP. Stearic, oleic, and linoleic acids have comparable effects on markers of thrombotic tendency in healthy human subjects. *J Nutr* 2005; 135: 2805-11.
13. Iida R, Takeyama N, Iida N, Tanaka T. Characterization of overt carnitine palmitoyltransferase in rat platelets, involvement of insulin on its regulation. *Mol Cell Biochem* 1991; 103: 23-30.
14. Passi S, Stancato A, Aleo E, Dmitrieva A, Littarru GP. Statins lower plasma and lymphocyte ubiquinol/ubiquinone without affecting other antioxidants and PUFA. *Biofactors* 2003; 18 (1-4): 113-24.

15. Kohonen T. Self-Organized formation of topologically correct feature maps. *Biological Cybernetics* 1982; 43:10.
16. Kohonen T. *Self Organizing Maps*. Berlin: Springer-Verlag, 1995 (1st ed), 1997 (2nd ed).
17. Hiroyasu I, Shinichi S, Utako U, et al. Linoleic acid, other fatty acids, and the risk of stroke. *Stroke* 2002; 33(8): 2086-93.
18. Adama O, Wolframb G, Zöllnerb N. Influence of dietary linoleic acid intake with different fat intakes on arachidonic acid concentrations in plasma and platelet lipids and eicosanoid biosynthesis in female volunteers. *Annals of Nutrition & Metabolism* 2003; 47: 31-6.
19. Barradas MA, et al. The effect of olive oil supplementation on human platelet function, serum cholesterol-related variables and plasma fibrinogen concentrations: a pilot study. *Nutrition Research* 1990; 10 (4): 403-11.
20. Nunez, J Randon, C Gandhi, A Siafaka-Kapadai, MS Olson, Hanahan DJ. The inhibition of platelet-activating factor-induced platelet activation by oleic acid is associated with a decrease in polyphosphoinositide metabolism. *J Biol Chem* 1990; 265 (30): 18330-8.
21. Kris-Etherton PM, Vikkie M, Janice AD. Effects of dietary stearic acid on plasma lipids and thrombosis. *Nutrition Today*, June 93.
22. Simpson HCR, Barker K, Carter RD, Cassels E, Mann JI. Low dietary intake of linoleic acid predisposes to myocardial infarction. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1982; 285 (6343): 683-84.
23. Valek J, Hammer J, Kohout M, Grafnetter D, Vondra K, Topinka V. Serum linoleic acid and cardiovascular death in postinfarction middle-aged men. *Atherosclerosis* 1985; 54 (1): 111-8.
24. Laaksonen DE, Nyssonen K, Niskanen L, Rissanen TH, Salonen JT. Prediction of cardiovascular mortality in middle-aged men by dietary and serum linoleic and polyunsaturated fatty acids. *Arch Intern Med* 2005; 165 (2): 193-9.
25. Kelly FD, Sinclair AJ, Mann NJ, Turner AH, Abedin L, Li D. Short-term diets enriched in stearic or palmitic acids do not alter plasma lipids, platelet aggregation or platelet activation status. *Eur J Clin Nutr* 2002; 56 (6): 490-9.
26. Thijssen MA, Hornstra G, Mensink RP. Stearic, oleic, and linoleic acids have comparable effects on marker of thrombotic tendency in healthy human subjects. *J Nutr* 2005; 135 (12): 2805-11.
27. Smith RD, Kelly CN, Fielding BA, et al. Long-term monounsaturated fatty acid diets reduce platelet aggregation in healthy young subjects. *Br J Nutr* 2003; 90 (3): 597-606.
28. Silva KD, Kelly CN, Jones AE, et al. Chylomicron particle size and number, factor VII activation and dietary monounsaturated fatty acids. *Atherosclerosis* 2003; 166 (1): 73-84.
29. Schwab US, Maliranta HM, Sarkkinen ES, Savolainen MJ, Kesäniemi YA, Uusitupa MI. Different effects of palmitic and stearic acid-enriched diets on serum lipids and lipoproteins and plasma cholesteryl ester transfer protein activity in healthy young women. *Metabolism* 1996; 45 (2): 143-9.
29. Aro A, Jauhiainen M, Partanen R, Salminen I, Mutanen M. Stearic acid, trans fatty acids, and dairy fat: effects on serum and lipoprotein lipids, apolipoproteins, lipoprotein(a), and lipid transfer proteins in healthy subjects. *Am J Clin Nutr* 1997; 65 (5): 1419-26.
30. Ding EL, Hutflless SM, Ding X, Girotta S. Chocolate and prevention of cardiovascular disease: a systematic review. *Nutr Metab (Lond)* 2006 3; 3: 2.
31. Hunter KA, Crosbie LC, Weir A, Miller GJ, Dutta-Roy AK. A residential study comparing the effects of diets rich in stearic acid, oleic acid, and linoleic acid on fasting blood lipids, hemostatic variables and platelets in young healthy men. *J Nutr Biochem* 2000; 11 (7-8): 408-16.
32. Thomas A, Sanders B, Oakley FR, Cooper JA, Miller JA. Influence of a stearic acid-rich structured triacylglycerol on postprandial lipemia, factor VII concentrations, and fibrinolytic activity in healthy subjects. *Am J Clin Nutr* 2001; 73: 715-21.
33. Apostolov K, Barker W, Catovsky D, Goldman J, Matutes E. Reduction in the stearic to oleic acid ratio in leukemic cells - a possible chemical marker of malignancy. *Blut* 1985; 50 (6): 349-54.
34. Worman CP, Barker W, Apostolov K. Saturation index of blood cell membrane fatty acids before and after IFN treatment in hairy cell leukemia. *Leukemia* 1987; 1 (4): 379-82.