

M. MALAVOLTA¹, R. GIACCONI¹,
 F. PIACENZA¹, C. CIPRIANO¹,
 L. COSTARELLI¹, S. PIERPAOLI¹,
 A. BASSO¹, P. ORLANDONI²,
 F. LATTANZIO³,
 E. MOCCHEGIANI¹

Nutrizione e infiammazione: le basi di un alterato rapporto tra rame e zinco plasmatico nell'anziano

PROGRESS IN NUTRITION
 VOL. 13, N. 1, 48-54, 2011

TITLE

Nutrition and inflammation: the basis for an altered plasma copper to zinc ratio in elderly

KEY WORDS

Copper, zinc, ageing

PAROLE CHIAVE

Rame, zinco, invecchiamento

¹Centro di Nutrizione e Invecchiamento, Polo Scientifico e Tecnologico, Istituto Nazionale di Ricovero e Cura per Anziani (INRCA), Ancona, Italia

²Centro Regionale di Nutrizione Artificiale, INRCA, Ancona, Italia

³Direzione Scientifica, INRCA, Ancona, Italia

Indirizzo per la corrispondenza:

Dr. Marco Malavolta
 Centro di Nutrizione e Invecchiamento,
 Polo Scientifico e Tecnologico,
 INRCA, Ancona, Italia
 E-mail: m.malavolta@inrca.it

Summary

As the proportion of older individuals within the population is increasing rapidly in Italy, there is substantial interest in biomarkers capable to predict functional decline and mortality in elderly and to suggest potential preventive strategies. Among the different biomarkers that in these years raised particular scientific interest in gerontological and geriatric research, the plasma copper to zinc ratio seems particularly intriguing. Indeed, high levels of this ratio seem to be strongly associated with mortality in the oldest old and in patients affected by cardiovascular diseases or cancer. It has been hypothesized that a chronic inflammatory status as commonly found in elderly subjects, as well as deleterious changes in dietary habits might contribute to increase the values of this biomarker. In this manuscript we followed-up for 3 years a population of elderly subjects (n.302, age range 60-100) confirming that copper to zinc ratio is a strong predictor of mortality in elderly. Its direct correlation with C reactive protein and inverse correlation with dietary intake of zinc as well as serum albumin suggest that nutritional and inflammatory factors synergically interact to explain the levels of this biomarker. Potential preventive intervention strategies on the basis of these results are discussed.

Riassunto

In considerazione dell'aumento proporzionale del numero di anziani nella popolazione italiana, l'interesse verso biomarcatori in grado di predire il declino funzionale e la mortalità nell'anziano, nonché di suggerire eventuali strategie preventive, sta rapidamente aumentando. Tra i diversi biomarcatori che hanno suscitato un recente interesse scientifico, il tra rapporto rame e zinco plasmatico sembra particolarmente interessante. Alti valori di questo rapporto sembrano, infatti, fortemente associati alla mortalità nella popolazione molto anziana e in pazienti affetti da malattie cardiovascolari e cancro. Si suppone che l'aumentare dello stato di infiammazione cronico caratteristico del soggetto anziano e che cambiamenti deleteri nelle abitudini alimentari possano contribuire a determinare un aumento del valore di questo biomarcatore. In questo lavoro abbiamo seguito una popolazione (n. 302) di età compresa tra i 60-100 anni per circa 3 anni ed abbiamo confermato che all'interno di questo ran-

ge di età il rapporto tra rame e zinco plasmatico si conferma quale fattore predittivo di mortalità. La sua correlazione diretta con la proteina C reattiva e le correlazioni inverse con l'assunzione giornaliera di zinco dalla dieta e con l'albumina suggeriscono che una concomitanza di fattori nutrizionali e infiammatori contribuiscono ad aumentare i livelli di questo biomarcatore. Possibili strategie di intervento sulla base di questi risultati sono argomento di discussione.

Introduzione

L'invecchiamento demografico è uno dei processi che desta maggiore preoccupazione nei paesi industrializzati non solo per le conseguenze che esso avrà sulla struttura e sulla composizione delle popolazioni interessate, ma anche e soprattutto per le implicazioni di natura sociale ed economica.

Questo fatto ha suscitato un rinnovato interesse verso l'individuazione di biomarcatori in grado di predire il declino funzionale e la mortalità nell'anziano, nonché di suggerire eventuali strategie in grado di prevenire tale declino funzionale (1). I biomarcatori circolanti sono sicuramente quelli che riscuotono il maggior interesse perché possono essere determinati a partire da un semplice prelievo di sangue. Tra questi, quelli che sembrano essere particolarmente utili nel predire fenomeni di mortalità, fragilità o disabilità nell'anziano sono generalmente associati allo stato infiammatorio, quali

l'interleuchina-6 (IL-6), la proteina C reattiva (CRP) e la velocità di eritro-sedimentazione (ESR), allo stato nutrizionale, come ad esempio l'albumina, o anche allo stato ormonale, quali il Fattore di crescita insulino-simile (IGF-1) e il deidroepiandrosterone (DHEA) (2-8). Recentemente, è stato suggerito che il rapporto tra rame e zinco plasmatico possa essere uno dei fattori maggiormente predittivi di mortalità nel soggetto molto anziano (9). Questo rapporto è anche stato associato alla mortalità in pazienti affetti da malattie cardiovascolari (10, 11) e cancro (12, 13). Questi risultati non sono sorprendenti se si considera che la regolazione dell'omeostasi del rame e dello zinco ha importanti ricadute sulle funzioni immunitarie (14-15) e gioca un ruolo centrale o putativo nello sviluppo delle più importanti malattie associate all'età quali malattie cardiovascolari (16-17), cancro (18), diabete di tipo 2 (19) e Alzheimer (20). Tuttavia, non è ancora chiaro se il valore

predittivo di questo biomarcatore è limitato alla popolazione anziana e quali sono le basi biologiche, fisiologiche o comportamentali che determinano un innalzamento dei livelli di Cu/Zn con conseguente aumento del rischio di mortalità. Con questo lavoro si è cercato di stabilire l'utilità del rapporto tra rame e zinco plasmatico quale fattore predittivo di mortalità nella popolazione anziana (età > 60 anni) e si è cercato di investigare le basi biologiche, fisiologiche e comportamentali alla base di un innalzamento di questo rapporto.

Materiali e Metodi

Popolazione e follow-up

Il presente studio include n. 302 soggetti (144 maschi e 158 femmine) di età compresa tra i 60 e i 100 anni. Tutti i soggetti soddisfavano come criterio di inclusione una vita indipendente che non richiedeva assistenza giornaliera o supporto di

personale specializzato) e non assumevano integratori alimentari. Sono stati esclusi soggetti con diabete, malattie autoimmuni, malattie neurodegenerative, presenza di patologia cardiovascolare grave o instabile, infezioni delle vie urinarie o respiratorie, cancro, malattia di Chron, acro dermatite enteropatica, malattie renali e epatiche, ulcerazioni gravi della pelle e disturbi neuro-endocrini. La coorte consisteva di soggetti residenti nelle marche tra la zona di Ancona, Cingoli e Jesi. Tutti i partecipanti vivevano in casa propria e non presentavano forme di demenza. Sono stati esclusi dallo studio anche soggetti che facevano uso di anticonvulsivi, antidepressivi, antibiotici, antimetaboliti e farmaci ipoglicemizzanti. A tutti i partecipanti è stato somministrato un questionario per ottenere informazioni riguardo la loro storia clinica, l'assunzione di farmaci e abitudini personali quali fumo e assunzione di alcool. I questionari sono stati verificati e controllati dai rispettivi medici di famiglia. Lo studio è stato approvato dal Comitato Etico dell'INRCA e tutti i soggetti hanno dato il loro consenso informato allo studio. La coorte è stata seguita per 3 anni raccogliendo i dati di mortalità depositati al comune di residenza. I certificati di morte sono stati esaminati per escludere soggetti deceduti a causa di fatalità non direttamente imputabili a pa-

tologie o invecchiamento. I campioni di sangue sono stati raccolti dopo digiuno notturno e parte del campione è stata mandata al laboratorio analisi dell'INRCA per lo screening dei parametri ematici e biochimici di routine (ematocriti, profilo lipidico, infiammatorio, marcatori epatici, cardiaci e tumorali). La proteina C reattiva è stata determinata utilizzando il kit CardioPhase hsCRP (Dade Behring Inc., USA). La sensibilità della determinazione è 0.01 mg/dl. Il range di normalità era di 0.03-10 mg/dl.

Stima dell'apporto di zinco con la dieta

L'apporto nutrizionale di zinco è stato valutato attraverso un questionario semi-quantitativo costruito per meglio caratterizzare l'apporto nutrizionale di zinco nell'anziano (21). I dati dell'apporto alimentare di zinco sono stati ottenuti attraverso un questionario di frequenza con 53 "items" rappresentativi delle maggiori categorie alimentari e con particolare attenzione ai cibi ricchi di zinco. Nel questionario veniva indicato il consumo di ciascun item (mai o meno di una volta al mese, occasionale, frequente, giornaliero) e la quantità (nulla, poco, medio, abbondante). Per ottenere una variabile continua è stato assegnato un punteggio da 1 a 4 per la

frequenza e da 0 a 3 per la quantità. Il prodotto "frequenza x quantità" è stato poi moltiplicato per il contenuto di zinco di ciascun "item" stimato dalle tabelle di composizione degli alimenti Europee e dell'USDA al fine di ottenere una variabile continua (AZD) in grado di stimare l'apporto di zinco con la dieta.

Determinazione dei livelli plasmatici di rame e zinco

I livelli plasmatici di zinco e di rame da cui è stato poi calcolato il rapporto Cu/Zn sono stati determinati con un ICP-MS Thermo X II Series (Thermo Electron Corporation, Waltham, MA, USA) seguendo la nota applicativa (AN_EO604) suggerita dal fornitore con piccoli adattamenti (9).

Analisi statistica

Per chiarire la relazione tra Cu/Zn e rischio di mortalità e per categorizzare i soggetti all'interno di precisi valori soglia, è stata effettuata un'analisi mediante albero decisionale. L'albero decisionale è stato sviluppato utilizzando quale algoritmo il "Chi-squared Automatic Interaction Detector" (CHAID). Per sviluppare l'albero sono state inserite le presenti regole di "stop": minimo numero di casi per il nodo "padre" = 80, minimo numero di

casi per il nodo “figlio” = 10, alpha = 0.05 per lo splittaggio del nodo e l’unione delle categorie. I criteri di convergenza per il CHAID sono stati: Epsilon = 0.001 e 100 come numero massimo di iterazioni prima di stoppare il processo. L’analisi di sopravvivenza è stata effettuata mediante metodo di Kaplan-Meier applicando Log-Rank test per il confronto tra le curve. L’analisi di regressione di Cox è stata anche effettuata per confermare la permanenza dell’as-

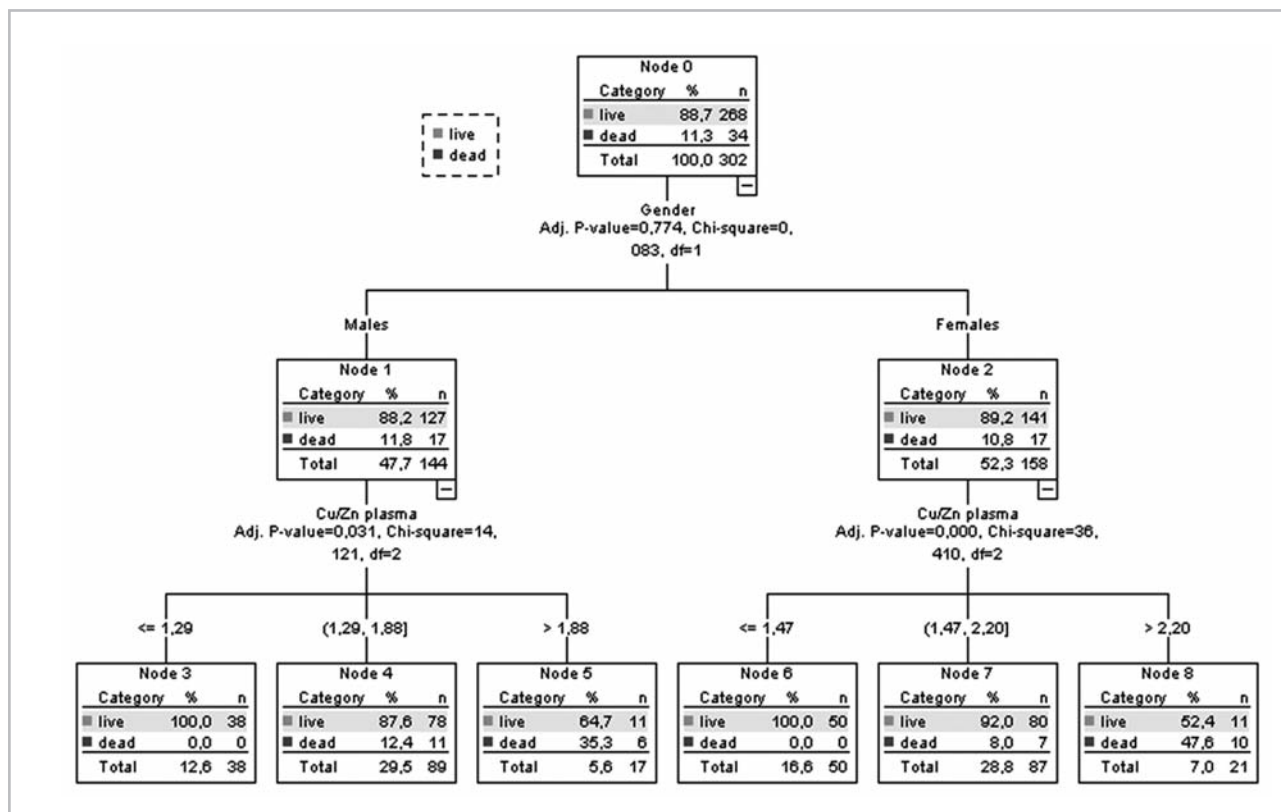
sociazione con la mortalità anche in presenza di fattori confondenti.

Risultati

L’analisi eseguita mediante albero decisionale aveva lo scopo di identificare dei valori di soglia di Cu/Zn plasmatico in grado di determinare differenze significative nella mortalità a 3 anni nella presente popolazione. Per questa analisi è stata quindi utilizzata la sola

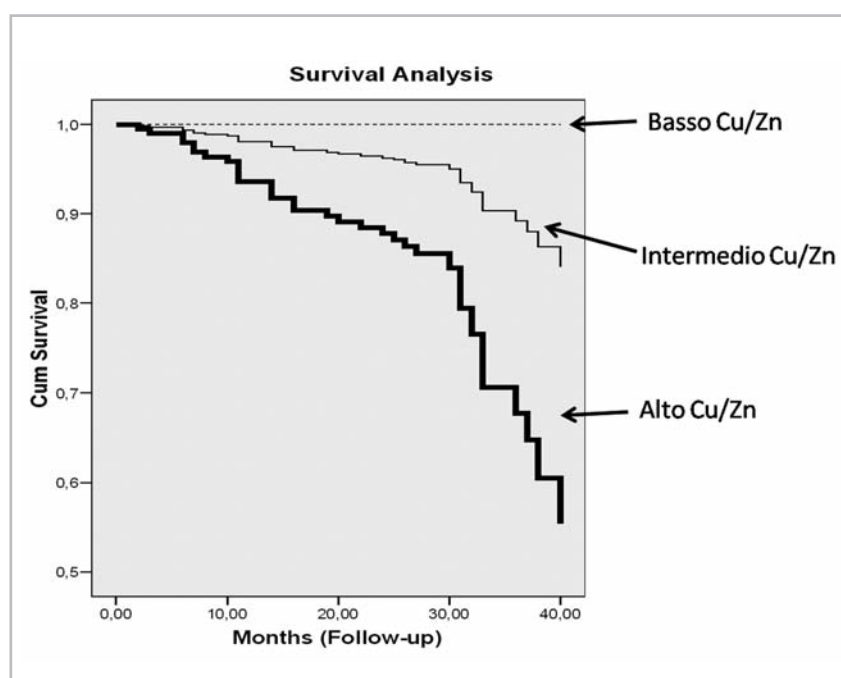
variabile Cu/Zn ed è stata forzata la suddivisione in base al genere (maschi o femmine) quale prima variabile. Come illustrato in figura 1 il primo nodo, che è stato forzato suddivide la popolazione in base al genere. Non è stata osservata in questo caso una differenza significativa tra maschi e femmine per quanto riguarda la mortalità, ma va comunque precisato che questo nodo è stato forzato come impostazione dell’albero decisionale. Tuttavia, la variabile Cu/Zn defi-

Figura 2 - Analisi del rischio di mortalità mediante albero decisionale sviluppato con algoritmo CHAID



nisce un ulteriore nodo sia nei maschi che nelle femmine. In base a questa suddivisione sono stati identificati tre sottogruppi all'interno dei maschi e delle femmine caratterizzati ciascuno da valori di Cu/Zn bassi, intermedi e alti. Il primo sottogruppo, che presenta valori di Cu/Zn ≤ 1.29 nei maschi e ≤ 1.47 nelle femmine, è caratterizzato da soggetti che sono rimasti vivi nei successivi tre anni. Nei sottogruppi con valore di Cu/Zn intermedi è stato osservato il 12.4% di mortalità nei maschi e l'8% nelle femmine. Infine, nel sottogruppo con valori di Cu/Zn > 1.88 nei maschi e > 2.20 nelle femmine si è registrato il 35.3% di mortalità nei maschi e il 47.6% nelle femmine. Mantenendo questa suddivisione all'interno di un'analisi di sopravvivenza effettuata mediante Kaplan-Meier si conferma che l'esistenza di una forte differenza nella sopravvivenza in base al sottogruppo di appartenenza. Il confronto tra le curve di sopravvivenza (Fig. 2) è, infatti, risultato estremamente significativo ($p < 0.0000001$) con il Log Rank test. La significatività permaneva anche dopo analisi della sopravvivenza utilizzando il modello di regressione di Cox e includendo l'età e altri fattori confondenti (BMI, fumo, alcool, ipertensione, iperlipidemia, presenza di una lieve patologia cardiovascolare, uso di farmaci non considerati come criterio di esclu-

Figura 2 - Analisi di sopravvivenza mediante Kaplan-Meier sui gruppi di soggetti identificati dall'albero decisionale sviluppato con algoritmo CHAID. Basso Cu/Zn include i maschi con valori inferiori o uguali a 1,29 e le femmine con valori inferiori o uguali a 1,47. Alto Cu/Zn include i maschi con valori superiori a 1,88 e le femmine con valori superiori a 2,20. Intermedio Cu/Zn include valori di Cu/Zn compresi tra 1,29 e 1,88 per i maschi e compresi tra 1,47 e 2,20 per le femmine



sione) come covariate (dati non mostrati). La tabella delle correlazioni (Tab. 1) effettuata sulle variabili normalizzate in base alla tra-

sformazione logaritmica mostra come il rapporto Cu/Zn sia inversamente proporzionale all'apporto di zinco con la dieta (AZD) e al-

Tabella 1 - Fattori correlati con Cu/Zn e rispettivo coefficiente di Pearson

	Ln(AZD)	Ln(Albumin)	Ln(CRP)
Pearson Correlation	-0.176	-0.444	0.195
P	0.010	< 0.001	0.001

* Tutte le variabili sono state normalizzate mediante trasformazione logaritmica. AZD = apporto di zinco con la dieta; CRP = proteina C reattiva

l'albumina, mentre risulta direttamente proporzionale alla proteina C reattiva (CRP).

Discussione

Questo studio conferma l'importanza del biomarcatore Cu/Zn plasmatico quale "predittore" di mortalità nella popolazione anziana. Il valore predittivo di questo biomarcatore sembra indipendente dal genere, sebbene i valori di soglia che definiscono un aumento del rischio di mortalità siano differenti tra maschi e femmine. Questa differenza trova il suo razionale in una differenza fisiologica, per cui, in condizioni normali i valori di Cu/Zn sono più alti nelle femmine rispetto ai maschi (9). Un aspetto rilevante di questo lavoro è che la popolazione studiata comprendeva anche soggetti "anziani giovani" con un'età inferiore ai 70 anni e che i gruppi utilizzati per l'analisi di sopravvivenza mediante Kaplan-Meier sono stati scelti mediante un albero decisionale e non attraverso una semplice suddivisione in percentili. Questa procedura identifica gli individui che appartengono a un determinato gruppo o categoria di rischio sulla base di un algoritmo, per cui l'identificazione delle categorie "Cu/Zn basso", "medio" e "alto" è stata effettuata dal CHAID. Da questa suddivisione emerge che va-

lori di Cu/Zn superiori a 1,88 nei maschi e 2,20 nelle femmine potrebbero definire importanti valori soglia per individuare soggetti fragili ad alto rischio di mortalità. Questi dati sono in accordo con i risultati ottenuti precedentemente su un gruppo di anziani di età superiore ai 70 anni (9) dove però la suddivisione in gruppi veniva effettuata in base a percentili per diverse classi di età. L'individuazione di valori "soglia" presentata per la prima volta in questo manoscritto apre la strada ad un possibile contesto clinico di questo biomarcatore. Inoltre, la presenza di una correlazione tra Cu/Zn e alcuni fattori nutrizionali (assunzione giornaliera di zinco e albumina) e infiammatori (proteina C reattiva) suggerisce possibili strategie preventive atte a ridurre l'incidenza di eventi fatali prematuri nella popolazione anziana. La presenza di deficit nutrizionali di zinco in una percentuale di circa il 10-20% della popolazione anziana è già stata dimostrata precedentemente (22). La presenza di questo deficit sembra quindi uno dei fattori che contribuisce all'innalzamento del valore di Cu/Zn attraverso un abbassamento della zinchemia plasmatica. L'impatto della dieta e delle abitudini alimentari è ulteriormente rinforzato dalla correlazione tra Cu/Zn e albumina. Infatti, una riduzione dell'albumina plasmatica costituisce di per sé un importante

fattore di rischio, nonché "predittore" di mortalità nella popolazione anziana (23). Tuttavia, anche la presenza di eventi che determinano l'aumento dello stato infiammatorio è strettamente correlata al valore di Cu/Zn. Infatti, durante un processo infiammatorio esistono fenomeni di compensazione che determinano sia un incremento di rame plasmatico (11) e una diminuzione della zinchemia (24). In ogni caso, l'individuazione di un rapporto tra rame e zinco superiore ai valori soglia indicati da questo lavoro suggerisce di effettuare sul soggetto un'approfondita indagine dello stato nutrizionale e infiammatorio. Qualora sia dimostrato un deficit nutrizionale, sarebbe potenzialmente possibile correggere tale biomarcatore e eventualmente ridurre il rischio di mortalità correggendo la dieta o attraverso una supplementazione con zinco. Al contrario, se non vengono riscontrati deficit nutrizionali ma è presente una componente infiammatoria si dovrebbero approfondire le indagini diagnostiche per individuare la presenza di eventuali patologie che hanno determinato l'incremento dello stato infiammatorio e praticare una terapia adeguata. In ogni caso, uno screening preliminare per testare i livelli di questo biomarcatore potrebbe fornire un valido supporto per l'approccio clinico sul paziente anziano. Ulteriori studi su differenti

popolazioni sono tuttora in corso per confermare la validità e la rilevanza clinica di questo biomarcatore, non solo come semplice “predittore” di mortalità, ma anche quale importante fattore associato alla fragilità nell’anziano.

Bibliografia

- Goulding MR, Rogers ME, Smith SM. Public health and aging: trends in aging - United States and worldwide. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2003; 52 (6): 101-6.
- Alley DE, Crimmins E, Bandeen-Roche K, Guralnik J, Ferrucci L. Three-year change in inflammatory markers in elderly people and mortality: the Invecchiare in Chianti study. *J Am Geriatr Soc* 2007; 55(11): 1801-7.
- Heikkilä K, Ebrahim S, Rumley A, Lowe G, Lawlor DA. Associations of circulating C-reactive protein and interleukin-6 with survival in women with and without cancer: findings from the British Women’s Heart and Health Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007; 16 (6): 1155-9.
- De Martinis M, Franceschi C, Monti D, Ginaldi L. Inflammation markers predicting frailty and mortality in the elderly. *Exp Mol Pathol* 2006; 80 (3): 219-27.
- Zakai NA, Katz R, Jenny NS, Psaty BM, Reiner AP, Schwartz SM, Cushman M. Inflammation biomarkers and cardiovascular risk in the elderly: the Cardiovascular Health Study. *J Thromb Haemost* 2007; 5: 1128-35.
- Erikssen G, Liestøl K, Bjørnholt JV, Stormorken H, Thaulow E, Erikssen J. Erythrocyte sedimentation rate: a possible marker of atherosclerosis and a strong predictor of coronary heart disease mortality. *Eur Heart J* 2000; 21 (19): 1614-20.
- Campbell AJ, Diep C, Reinken J, McCosh L. Factors predicting mortality in a total population sample of the elderly. *J Epidemiol Community Health* 1985; 39 (4): 337-42.
- Leng SX, Cappola AR, Andersen RE, et al. Serum levels of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and dehydroepiandrosterone sulfate (DHEA-S), and their relationships with serum interleukin-6, in the geriatric syndrome of frailty. *Aging Clin Exp Res* 2004; 16 (2): 153-7.
- Malavolta M, Giacconi R, Piacenza F, et al. Plasma copper/zinc ratio: an inflammatory/nutritional biomarker as predictor of all-cause mortality in elderly population. *Biogerontology* 2010; 11 (3): 309-19.
- Leone N, Courbon D, Ducimetiere P, Zureik M. Zinc, copper, and magnesium and risks for all-cause, cancer, and cardiovascular mortality. *Epidemiology* 2006; 17 (3): 308-14.
- Reunanen A, Knekt P, Mamiemi J, Maki J, Maatela J, Aromaa A. Serum calcium, magnesium, copper and zinc and risk of cardiovascular death. *Eur J Clin Nutr* 1996; 50: 431-7.
- Cunzhi H, Jiexian J, Xianwen Z, Jingang G, Shumin Z, Lili D. Serum and tissue levels of six trace elements and copper/zinc ratio in patients with cervical cancer and uterine myoma. *Biol Trace Elem Res* 2003; 94 (2): 113-22.
- Diez M, Cerdán FJ, Arroyo M, Balibrea JL. Cancer. Use of the copper/zinc ratio in the diagnosis of lung cancer. 1989; 63(4): 726-30.
- Maggini S, Wintergerst ES, Beveridge S, Hornig DH. Selected vitamins and trace elements support immune function by strengthening epithelial barriers and cellular and humoral immune responses. *Br J Nutr* 2007; 98 Suppl 1: S29-35.
- Chandra RK. Nutrition and the immune system: an introduction. *Am J Clin Nutr* 1997; 66 (2): 460S-463S.
- Altakin E, Coker C, Sisman AR, Onvural B, Kuralay F, Kirimli O. The relationship between trace elements and cardiac markers in acute coronary syndromes. *J Trace Elem Med Biol* 2005; 18 (3): 235-42.
- Leone N, Courbon D, Ducimetiere P, Zureik M. Zinc, copper, and magnesium and risks for all-cause, cancer, and cardiovascular mortality. *Epidemiology* 2006; 17 (3): 308-14.
- Zuo XL, Chen JM, Zhou X, Li XZ, Mei GY. Levels of selenium, zinc, copper, and antioxidant enzyme activity in patients with leukemia. *Biol Trace Elem Res* 2006; 114 (1-3): 41-53.
- Mocchegiani E, Giacconi R, Malavolta M. Zinc signalling and subcellular distribution: emerging targets in type 2 diabetes. *Trends Mol Med* 2008; 14 (10): 419-28.
- Mocchegiani E, Bertoni-Freddari C, Marcellini F, Malavolta M. Brain, aging and neurodegeneration: role of zinc ion availability. *Prog Neurobiol* 2005; 75 (6): 367-90.
- Kanoni S, Dedoussis GV, Herbein G, et al. Assessment of gene-nutrient interactions on inflammatory status of the elderly with the use of a zinc diet score - ZINCAGE study. *J Nutr Biochem* 2010; 21 (6): 526-31.
- Mocchegiani E, Giacconi R, Costarelli L, et al. Zinc deficiency and IL-6 - 174G/C polymorphism in old people from different European countries: effect of zinc supplementation. *ZINCAGE study. Exp Gerontol* 2008; 43 (5): 433-44.
- Corti MC, Guralnik JM, Salive ME, Sorkin JD. Serum albumin level and physical disability as predictors of mortality in older persons. *JAMA* 1994; 272 (13): 1036-42.
- Liuzzi JP, Lichten LA, Rivera S, et al. Interleukin-6 regulates the zinc transporter Zip14 in liver and contributes to the hypozincemia of the acute-phase response. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 May 10;102(19):6843-8.