

INTRODUZIONE

1. Fibrosi Cistica

La fibrosi cistica (FC) è la malattia congenita, cronica, evolutiva, trasmessa con meccanismo autosomico recessivo, più frequente nella popolazione caucasica: ne è affetto un neonato ogni 2500-2700 nati vivi. Nel mondo ne sono colpite oltre 70.000 persone. Grazie ai progressi della ricerca e delle cure, i bambini che nascono oggi con questa patologia hanno un'aspettativa media di vita di 40 anni ed oltre, mentre non superavano l'infanzia cinquant'anni fa, quando la malattia è stata scoperta e si è cominciato a curarla (Freedman and O'Sullivan, 2009).

In Italia vengono diagnosticati circa 200 nuovi casi all'anno; secondo i dati del Registro Nazionale Fibrosi Cistica, i malati in vita al 31/12/2004 erano 4099 e 1742 (42% del totale) avevano più di 18 anni (172 di questi aveva superato i 40 anni). Sempre nel 2004 l'età alla diagnosi era entro gli 8 mesi di vita per il 50% dei malati, ed era invece in età adulta per circa l'8%. Oggi si stima che i malati siano in realtà molti di più, tenuto conto che vi sono ancora limiti nel loro riconoscimento, particolarmente per le forme meno classiche della malattia e nelle regioni dove non si attua screening neonatale.

I portatori sani del gene CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator), il gene la cui mutazione è causa della malattia, in Italia sono circa 2 milioni e mezzo (un portatore sano ogni 25 persone circa). E' una malattia che colpisce indifferentemente maschi e femmine e ha un decorso diverso da un malato all'altro (fondazione per la ricerca sulla fibrosi cistica).

1.1 Cause e trasmissione ereditaria

La fibrosi cistica è causata da una mutazione nel gene che codifica per la proteina CFTR localizzata nella membrana apicale delle cellule epiteliali ed espressa anche in molte cellule del sangue (Riordan et al. 1989). Nonostante CFTR funzioni principalmente come canale del cloro, possiede anche molti ruoli regolatori, tra cui l'inibizione del trasporto di sodio attraverso il canale del sodio epiteliale, la regolazione dei canali dell'ATP, la regolazione del trasporto intracellulare delle vescicole, l'acidificazione degli organuli intracellulari e l'inibizione dei canali del cloro endogeni calcio-attivati (Reisin et al, 1994; Schwiebert et al. 1995; Stutts et al, 1995; Vankeerberghen et al, 2002; Mehta et al, 2005).

Il gene che codifica la proteina CFTR è stato localizzato nel 1989 sul braccio lungo del cromosoma 7 (Riordan et al. 1989). Affinchè vi sia malattia occorre che entrambi i geni della coppia CFTR sul cromosoma 7 siano mutati. All'alterazione della proteina consegue un'anomalia del trasporto di sali che determina principalmente una produzione di secrezioni per così dire "disidratate": il sudore ha una concentrazione molto alta di sodio e cloro, 4-5 volte il normale, il muco è denso e vischioso ("muco viscido", da cui il nome in passato di "mucoviscidosi") e tende ad ostruire i dotti nei quali viene a trovarsi. Nel pancreas le secrezioni stagnanti possono formare delle specie di cisti e il tessuto circostante tende ad infiammarsi, indurirsi e diventare fibrotico: di qui il nome di fibrosi cistica (il nome originale è in realtà "fibrosi cistica del pancreas", anche se il pancreas è solo uno degli organi colpiti).

La malattia coinvolge numerosi organi ed apparati: l'apparato respiratorio, dalle prime vie aeree al tessuto polmonare, il pancreas nella produzione di enzimi digestivi, il fegato, l'intestino e l'apparato riproduttivo, soprattutto i dotti deferenti nei maschi.

La malattia può manifestarsi precocemente, in età neonatale o nelle prime settimane o mesi di vita, con gravità diversa, in alcuni casi in correlazione a particolari mutazioni geniche.

Ad oggi sono state identificate più di 1500 mutazioni del gene CFTR. La più frequente in tutte le popolazioni è la mutazione $\Delta F508$ (delezione dell'aminoacido fenilalanina in posizione 508). La frequenza relativa delle mutazioni è molto variabile in relazione all'area geografica.

In base al tipo di mutazione si hanno diversi effetti sulla proteina CFTR: alcune mutazioni fanno sì che essa non venga prodotta affatto, altre permettono che venga prodotta una proteina poco funzionante o ridotta in quantità. Però non di tutte le mutazioni si conosce l'effetto ultimo sulla proteina CFTR e quindi sulle loro conseguenze cliniche.

Le mutazioni di cui si conosce l'effetto sulla proteina CFTR sono state suddivise in classi (da I a V) (O'Sullivan and Freedman, 2009). Le mutazioni appartenenti alle classi I, II e III alterano maggiormente il destino della proteina, non consentendone del tutto la produzione (classe I) o producendo una proteina molto difettosa (classe II e III); quelle di classe IV consentono la sintesi di una proteina difettosa ma capace di svolgere seppure in piccolissima misura la sua funzione; quelle di classe V permettono la produzione di una certa quota, anche se piccola, di proteina normale.

Si conoscono gli effetti delle mutazioni sul pancreas: le mutazioni di classe I, II e III determinano insufficienza pancreatica; quelle di classe IV e V permettono (con qualche eccezione) che il pancreas funzioni normalmente.

Non si conoscono invece ancora sufficientemente le relazioni fra le mutazioni e l'interessamento di altri organi oltre al pancreas, in particolare gli effetti delle mutazioni sul polmone. Dal momento che le mutazioni di classe I, II, III provocano un difetto maggiore nella proteina CFTR, si può ritenere in linea di massima che provochino maggiori sintomi a livello polmonare. Ma si è visto che

gli effetti genetici sul singolo malato dipendono, oltre che dall'interazione nella coppia di mutazioni CFTR che costituiscono il genotipo, nel caso le due mutazioni siano di classi diverse, anche dall'influsso dei geni modificatori delle mutazioni del gene CFTR, di recente scoperti. Questi geni possono aggravare o alleggerire l'effetto delle mutazioni CFTR (Drumm et al, 2005; Collaco et al. 2008; Blackman et al 2006).

1.2 Manifestazioni ed evoluzione

La fibrosi cistica produce secrezioni dense che danneggiano particolarmente l'apparato respiratorio e quello digestivo. I sintomi più comuni sono tosse ricorrente, ripetute infezioni delle vie aeree, diarrea persistente e magrezza (o difficoltà di crescita nell'infanzia). Questi sintomi non sono specifici della fibrosi cistica, per questo spesso viene confusa con altre malattie. Vi sono grandi differenze da caso a caso nel livello di interessamento dei vari organi e nell'evoluzione della malattia e quindi nell'entità dei sintomi e nell'età della loro insorgenza, in dipendenza dal tipo di mutazioni del gene CFTR ma anche dall'effetto dei geni modificatori, nonché dallo stile di vita, dalla precocità o meno delle cure e dal grado di aderenza ad esse.

APPARATO RESPIRATORIO

Bronchi e polmoni sono interessati da bronchiti e broncopolmoniti ricorrenti, sostenute da batteri, in particolare *Pseudomonas aeruginosa* (Rosenfeld 2003) e *Staphylococcus aureus*. L'infezione e l'infiammazione cronica dei polmoni determina un progressivo loro deterioramento, con declino graduale della funzionalità respiratoria fino all'insufficienza respiratoria (limitazione critica dell'assunzione di ossigeno e di eliminazione di anidride carbonica nel sangue).

Anche la parte più alta dell'albero respiratorio, naso e seni paranasali, può manifestare sintomi: rinosinusite cronica, poliposi nasale e talora mucocele (occlusione e dilatazione di qualche seno paranasale).

APPARATO DIGESTIVO

Il pancreas è interessato in circa l'85% dei malati di fibrosi cistica. I suoi condotti sono ostruiti e gli enzimi che produce non giungono nell'intestino per digerire i cibi. Questa disfunzione causa diarrea con perdita di grassi e malnutrizione, che si manifesta nell'infanzia con difficoltà di crescita in peso e in altezza, e nell'adolescenza con pubertà ritardata. Nei malati in età più avanzata il progredire del danno pancreatico può portare ad una mancata produzione di insulina; pertanto alcuni soggetti possono sviluppare diabete e avere necessità di terapia con insulina per controllare i livelli di zucchero nel sangue. Questo accade molto raramente nei bambini con fibrosi cistica. In circa il 10-15% dei bambini che nascono con fibrosi cistica si verifica fin dalla nascita un'ostruzione intestinale chiamata ileo da meconio. La mancata emissione di meconio nei primi giorni di vita con conseguente occlusione intestinale è la manifestazione clinica più precoce della FC; segni clinici caratteristici sono l'emissione di feci abbondanti, untuose, maleodoranti, e la crescita stentata nonostante il bambino mangi molto. Nei casi più gravi, non trattati adeguatamente possono evidenziarsi complicanze secondarie a malassorbimento di vitamine liposolubili e/o prolasso rettale. E' necessario intervenire urgentemente, anche chirurgicamente, per rimuovere il blocco e normalizzare il funzionamento intestinale e, se non viene prontamente diagnosticato e trattato, può esporre il neonato a resezioni intestinali anche molto estese. L'ostruzione intestinale, dovuta a secrezioni intestinali dense e occludenti, può manifestarsi anche in età successive e addirittura rappresentare una condizione che conduce alla diagnosi.

In una certa quota di persone con fibrosi cistica si può avere in varia misura interessamento del fegato, con ristagno di bile densa nei condotti biliari e in un ristretto numero di casi questa complicanza determina cirrosi epatica con ipertensione portale: il problema può essere grave e rendere necessario un trapianto di fegato.

ALTRI ORGANI INTERESSATI

Una sudorazione particolarmente abbondante (nella stagione calda e negli episodi febbrili) può portare alla sindrome da perdita di sali, perché il sudore della persona con fibrosi cistica contiene un eccessivo contenuto di sale. La perdita acuta di sali con il sudore può essere un quadro grave che ha necessità di diagnosi e intervento immediato nel bambino piccolo.

Le persone con fibrosi cistica hanno tendenza a sviluppare con il passare del tempo disturbi alle ossa, che sono deboli e povere di calcio (osteoporosi): possono esserne causa condizioni di malnutrizione o frequenti cicli di terapia cortisonica per il controllo dei sintomi polmonari.

La fibrosi cistica non altera le capacità sessuali: può però determinare problemi di fertilità. Nella maggior parte degli uomini con fibrosi cistica i condotti che portano lo sperma all'esterno sono ostruiti (atresia bilaterale congenita dei dotti deferenti) e questo provoca infertilità. Nelle donne con fibrosi cistica invece possono verificarsi irregolarità del ciclo mestruale e maggiori difficoltà ad avviare una gravidanza, ma questo riguarda una modesta percentuale di donne.

La fibrosi cistica "classica" è quella che associa sintomi respiratori e intestinali. Questi sintomi compaiono in genere nei primi mesi o primi anni di vita. Ci possono però essere forme che non danno sintomi per anni oppure sintomi limitati solo ad alcuni organi. Sono in genere forme con andamento più mite. Alcune di queste forme sono dette "atipiche". L'infertilità da ostruzione o

assenza dei dotti deferenti senza altre manifestazioni della malattia è una forma "atipica" di fibrosi cistica. Fibrosi cistica atipica è considerata anche una forma di pancreatite cronica ricorrente senza insufficienza pancreatica e senza o con modesti sintomi associati alla forma classica.

1.3 Previsioni sull'evoluzione

In base alle attuali conoscenze, nella maggior parte dei soggetti affetti da fibrosi cistica la durata della vita dipende dall'evoluzione della malattia polmonare. Questa evoluzione dipende da un insieme di fattori, che sono solo in parte genetici, mentre risultano assumere sempre maggiore importanza i fattori non genetici. Fattori genetici sono il tipo di mutazioni del gene CFTR presenti nel genotipo del malato, il tipo di geni "modificatori" che influiscono in maniera positiva o negativa sull'azione del gene CFTR; mentre fattori non genetici sono le cure che vengono praticate e il livello di aderenza ad esse, l'ambiente in cui la persona con fibrosi cistica vive e lo stile di vita che adotta. Data la grande varietà di combinazioni di questi fattori, ogni malato è diverso dall'altro e un'accurata previsione individuale dell'andamento della malattia non ha oggi sufficienti basi scientifiche.

1.4 Diagnosi

La diagnosi di fibrosi cistica si fa in base al test del sudore che misura la concentrazione di cloro nel sudore. Una concentrazione superiore ad una certa soglia (60 milliequivalenti di cloro per litro dopo i 6 mesi e 50 milliequivalenti nei primi mesi di vita) orienta decisamente alla diagnosi. Valori di cloro inferiori

ai 40 milliequivalenti (30 nei primi mesi di vita) escludono la malattia, pur con qualche rara eccezione (LeGrys et al. 2007). Valori intermedi (detti anche "borderline") non sono conclusivi perché possono includere sia soggetti sani sia malati ed è quindi necessario ricorrere all'analisi genetica. E' un test che si esegue in centri specializzati e che, se eseguito correttamente, è altamente affidabile. Il test viene prescritto dal medico che sospetta la malattia in base ai sintomi (tosse ricorrente, infezioni respiratorie ripetute, diarrea, crescita scarsa, perdita di sali).

Un metodo utile nel riconoscere individui affetti da fibrosi cistica è la misurazione della differenza di potenziale transepiteliale nasale (NPD) (De Boeck et al, 2006; Farrell et al, 2008).

La diagnosi di fibrosi cistica oggi in Italia si fa soprattutto in base a procedure di screening della malattia, piuttosto che in base ai sintomi. Le procedure di screening sono quelle descritte di seguito.

SCREENING NEONATALE

Si esegue oggi nella maggior parte delle regioni italiane. Tutti i neonati vengono sottoposti ad un test eseguito attraverso il prelievo di una goccia di sangue nella quale viene misurato il tripsinogeno immunoreattivo (IRT). Se l'IRT ha un valore oltre la soglia di normalità, questo suggerisce danno pancreatico e si pone il sospetto di malattia e sulla stessa goccia di sangue essiccato si attua il test genetico: questo è conclusivo per la diagnosi se si individuano due mutazioni CFTR. La conferma definitiva o l'esclusione della diagnosi viene comunque affidata al test del sudore, con richiamo del neonato a 20-30 giorni di vita (Therrell et al. 2005; Comeau et al. 2007). Lo screening alla nascita porta ad avere diagnosi di malattia molto precocemente e questo permette di avviare il più presto possibile il programma di controlli e cure che hanno migliorato nettamente la vita dei malati.

SCREENING PRENATALE (IN CORSO DI GRAVIDANZA)

Alcuni centri di medicina privata offrono la possibilità alle coppie della popolazione generale, anche se non hanno storia di particolari malattie genetiche in famiglia e anche se non vi sono ragioni per sospettare la presenza di una specifica malattia, la possibilità di indagare lo stato di salute del feto attraverso una serie di test genetici. Questi test vengono fatti durante la gravidanza, attraverso un prelievo sul feto stesso (villocentesi o amniocentesi). Tra le malattie genetiche di cui viene offerto il test, c'è la fibrosi cistica.

Se non ci sono ragioni particolari di sospetto, non è opportuno eseguire il test per fibrosi cistica sul feto, perché non dà risultati sicuri nel caso di coppie che non siano sicuramente portatrici; inoltre la risposta spesso viene data in un'epoca avanzata della gravidanza. Solo le coppie che sanno di essere coppie di portatori hanno una risposta sicura dal test genetico. Per questo, per prevenire il rischio di avere figli affetti da fibrosi cistica, si suggerisce di eseguire il test per verificare se i genitori siano portatori del gene CFTR prima dell'avvio della gravidanza (test preconcezionale).

DIAGNOSI PRENATALE

E' indicata e dà un risultato sicuro nelle coppie di portatori del gene della fibrosi cistica, che hanno un rischio elevato di avere un bambino con fibrosi cistica (25% di rischio ad ogni gravidanza). Si esegue attraverso prelievo di villo coriale (villocentesi) in decima settimana di gravidanza. Sul villo prelevato viene applicato il test genetico per fibrosi cistica (analisi delle mutazioni del gene CFTR di cui sono portatori i genitori).

SCREENING GENETICO

Un qualsiasi soggetto della popolazione generale che intende avere figli e vuol sapere se è portatore della mutazione può effettuare il test genetico per fibrosi

cistica.

Se dal test risulta portatore o portatrice, è importante che anche il partner esegua il test genetico. Se entrambi risultano portatori possono ricorrere, in caso di gravidanza, alla diagnosi prenatale per fibrosi cistica (vedi sopra) che può indicare con certezza se il feto è o non è affetto da fibrosi cistica.

E' particolarmente importante che faccia il test genetico chi ha parenti con fibrosi cistica o parenti portatori del gene CFTR perché ha maggiori probabilità rispetto alla popolazione generale di essere portatore del gene CFTR.

Il test genetico può anche portare alla diagnosi di presenza di malattia: questo succede quando identifica nel corredo genetico della persona due mutazioni del gene CFTR invece che una sola. Questo test non è però da usare come primo test per la diagnosi: è utile solo per conferma in quanto il primo test per la diagnosi è quello del sudore (vedi sopra).

1.5 Terapie

La fibrosi cistica è una patologia che colpisce in modo variabile vari organi e sistemi dell'organismo. Le terapie vengono impostate e monitorate presso centri specializzati. In base ad una legge nazionale (legge 548/1993) ogni regione d'Italia dispone di un centro specializzato per fibrosi cistica. Il centro regionale dispone di un team multidisciplinare di personale specializzato nella patologia: medici, infermieri, fisioterapisti, dietiste, assistenti sociali, psicologi, consulenti per particolari complicanze.

Le terapie attuali per la fibrosi cistica consistono principalmente in:

FISIOTERAPIA E RIABILITAZIONE RESPIRATORIA: per rimuovere dalle vie respiratorie il muco che le ostruisce e favorisce le infezioni. Sono a

disposizione varie tecniche di rimozione (o drenaggio) delle secrezioni e il trattamento deve essere individualizzato in base all'età e alle condizioni respiratorie del soggetto, tenendo conto della compatibilità di tale terapia con le attività complessive del soggetto. Particolare attenzione viene dedicata all'educazione ad uno stile di vita aperto con attitudine al movimento e allo sport: l'esercizio fisico favorisce infatti uno sviluppo armonico della persona malata, facilita la rimozione delle secrezioni e l'efficacia della funzione respiratoria.

AEROSOLTERAPIA: per fluidificare il muco o somministrare antibiotici per controllare infezioni respiratorie croniche.

ANTIBIOTICOTERAPIA: per via orale o per via endovenosa, a cicli o per periodi molto prolungati, anche in continuazione (soprattutto per via inalatoria), per eliminare o contenere la carica e l'aggressività dei batteri: particolarmente *Pseudomonas aeruginosa* e *Stafilococco aureo*, ma anche altri. Gli antibiotici vengono selezionati sulla base dell'isolamento dei batteri tramite le colture di sputo che ogni paziente esegue periodicamente e sulla sensibilità specifica che tali batteri mostrano nelle prove in vitro (antibiogramma).

NUTRIZIONE: alimentazione sostenuta, ipercalorica, ricca di grassi associata a somministrazione di enzimi pancreatici ad ogni pasto, in sostituzione di quelli non prodotti dal pancreas, e integrata da vitamine liposolubili. Supplementazione con cloruro di sodio, specie nel bambino piccolo, nella stagione calda e nell'esercizio fisico sostenuto.

ALTRE TERAPIE: l'infiammazione polmonare prevede qualche ciclo di terapia con cortisonici o altri farmaci antinfiammatori. Il cortisone è particolarmente

impiegato nella complicanza "aspergillosi broncopolmonare allergica". Negli adolescenti e negli adulti l'interessamento del pancreas può provocare anche diabete, che si cura con iniezioni quotidiane di insulina. Le varie complicanze hanno trattamenti specifici: fluidificazione del contenuto intestinale nelle sindromi ostruttive, fluidificazione della bile nell'epatopatia, trattamenti per contrastare l'osteoporosi. Per gli adulti che desiderano avere figli, l'infertilità maschile può essere trattata con tecniche di procreazione medicalmente assistita. In caso di malattia polmonare molto avanzata, con insufficienza respiratoria irreversibile, il trapianto di polmoni offre la possibilità di allungare l'aspettativa di vita.

2. Acidi grassi

2.1 Chimica e metabolismo degli acidi grassi

Gli acidi grassi (AG) sono componenti essenziali della maggior parte dei lipidi nei sistemi biologici dove, a livello cellulare, rappresentano una rilevante fonte di energia e soprattutto svolgono importanti ruoli strutturali e funzionali.

Sono composti caratterizzati dalla formula R-COOH, dove R indica una catena alchilica costituita da atomi di carbonio ed idrogeno. Praticamente tutti gli acidi grassi presenti negli organismi superiori contengono un numero pari di atomi di carbonio.

Uno dei criteri di classificazione degli AG si basa sulla lunghezza della catena, cioè sul numero degli atomi di carbonio in essa contenuti.

Gli AG presenti nei lipidi ematici e tissutali degli organismi superiori, e in particolare dei mammiferi, sono del tipo a catena lunga.

TIPO	NUMERO DEGLI ATOMI DI C
A catena corta	2-8
A catena media	10-16
A catena lunga	16-26

Inoltre gli acidi grassi possono essere saturi, cioè senza doppi legami, o insaturi, contenenti uno o più doppi legami. Gli acidi grassi che contengono un solo legame insaturo sono definiti acidi grassi monoenoici o monoinsaturi, mentre quelli che ne hanno due o più sono definiti polienoici o poliinsaturi.

I doppi legami di un acido grasso polienoico non sono fra loro né adiacenti né coniugati in quanto queste condizioni faciliterebbero processi di ossidazione; in genere infatti i doppi legami sono separati da tre atomi di carbonio, ossia è

interposto un gruppo metilenico (-CH₂) tra due doppi legami (nella sequenza =CH-CH₂-CH=). Questo fatto determina una maggior protezione contro l'ossidazione, sia di tipo autossidativo che perossidativo.

La posizione dell'ultimo doppio legame di un acido grasso viene definita secondo due principali sistemi di numerazione: il sistema Δ in cui la numerazione inizia dal gruppo carbossilico, ed il sistema ω o n in cui la numerazione inizia dall'atomo di carbonio più lontano dal gruppo carbossilico. Nella nomenclatura Δ gli acidi grassi sono abbreviati indicando il numero degli atomi di carbonio, il numero e la posizione dei doppi legami. Ad esempio l'acido palmitoleico si abbrevia 16:1 Δ⁹. Secondo questa nomenclatura il numero dopo Δ sta a indicare la posizione del primo doppio legame a partire dal gruppo carbossilico.

Seguendo il sistema di numerazione n o ω l'acido palmitoleico è abbreviato in 16:1 ω⁷. Questo sta ad indicare che l'acido grasso ha 16 atomi di carbonio, e l'ultimo doppio legame insaturo è situato 7 atomi di carbonio lontano dal carbonio ω, cioè dal gruppo -CH₃ terminale.

Gli acidi grassi insaturi vengono divisi in quattro classi a seconda della posizione dell'ultimo doppio legame:

CLASSE	ACIDO GRASSO CAPOSTIPITE
(n)ω ⁷	16:1 acido palmitoleico
(n)ω ⁹	18:1 acido oleico
(n)ω ⁶	18:2 acido linoleico
(n)ω ³	18:3 acido α-linolenico

Gli acidi grassi di ciascuna famiglia vengono biosintetizzati a partire da un acido grasso capostipite.

Un acido grasso di una determinata classe o serie tuttavia non può venir biotrasformato in un acido grasso appartenente ad un'altra classe.

Lo scheletro carbonioso di un acido grasso saturo è di solito in forma lineare perché questa è la conformazione più stabile. Gli AG insaturi presentano invece angolature stabili in quanto i doppi legami, sempre in configurazione –cis, non possono ruotare. Per effetto di interventi tecnologici industriali o di trasformazioni metaboliche in animali ruminanti, si possono produrre derivati di AG insaturi con doppi legami a configurazione trans.

In generale le cellule dell'organismo umano, ed in genere dei mammiferi non ruminanti, contengono una quantità di acidi grassi insaturi circa doppia rispetto ai saturi; la composizione varia tuttavia in modo notevole da tessuto a tessuto e, entro certi limiti, dipende anche dal tipo di grasso assunto con la dieta.

L'uomo, oltre a ricavare acidi grassi dai lipidi alimentari, è in grado di sintetizzare acidi grassi insaturi a lunga catena, monoenoici e polienoici. Tuttavia i mammiferi non possono sintetizzare tutti i tipi necessari di acidi grassi polienoici, alcuni dei quali devono essere introdotti con la dieta: questi acidi grassi sono detti *essenziali* (AGE). L'acido linoleico (LA, 18:2 n-6) e l'acido α -linolenico (α -LNA, 18:3 n-3) sono gli AGE più importanti.

L'acido linoleico è essenziale per mantenere uno stato di salute ottimale, in quanto da esso derivano acidi grassi più insaturi e a catena più lunga che svolgono ruoli biologici fondamentali, sia come precursori di mediatori lipidici (eicosanoidi), sia in quanto componenti strutturali e modulatori di attività enzimatica.

In particolare gli acidi grassi poliinsaturi sono infatti necessari per mantenere il normale stato funzionale delle membrane cellulari e per ottenere un buon accoppiamento della fosforilazione ossidativa.

Gli AG vengono assunti con la dieta soprattutto sottoforma di trigliceridi (TG) e in minor quantità sottoforma di fosfogliceridi e colesterolo esterificato. Il

90-98% degli acidi grassi presenti nel plasma è quindi in forma esterificata. Tuttavia, una piccola quota di acidi grassi è presente in forma non esterificata ed è legata alle albumine con un legame di tipo fisico (interazioni idrofobiche).

Gli acidi grassi liberi plasmatici hanno una doppia derivazione; in maggior quantità, ma sempre in misura limitata (1-2 mEq, ca 10% degli AG totali del plasma), provengono dal tessuto adiposo e rappresentano la forma con cui gli acidi grassi presenti nei trigliceridi vengono “dismessi” dal tessuto nel sangue. Una seconda quota di AG liberi, quantitativamente meno abbondante, si forma dall'idrolisi dei TG assunti con la dieta: questi per mezzo di una lipasi pancreatica vengono idrolizzati a monogliceridi ed AG liberi e, in seguito ad assorbimento intestinale, il destino degli AG varia a seconda che siano a catena corta o lunga. I primi, relativamente idrosolubili, vengono immessi direttamente nel sangue e giungono al fegato, mentre i secondi, insieme ai monogliceridi, ricostituiscono i TG nella mucosa intestinale e vengono complessati con proteine a formare i chilomicroni. Questi ultimi, immessi in circolo, sono successivamente attaccati dalla lipasi lipoproteica (LPL) che idrolizza i TG in essi contenuti liberando nuovamente gli AG che potranno servire per il fabbisogno energetico o, se in eccesso, verranno depositati negli adipociti ancora sottoforma di TG.

Gli AG vengono assunti da vari tessuti ed utilizzati variamente. Il cervello è l'unico organo che non è in grado di utilizzare gli AG in grande quantità in quanto essi non attraversano facilmente la barriera emato-encefalica.

Gli AG vengono ampiamente mobilizzati dal tessuto adiposo durante i periodi di digiuno o durante uno sforzo fisico prolungato; anche uno stato di stress, che si accompagna ad aumentata secrezione di adrenalina, provoca immissione di AG nel sangue.

2.2 Acidi grassi e lipidi di membrana

Gli acidi grassi esterificati, come già accennato, sono importanti costituenti delle membrane plasmatiche, oltre che degli organelli subcellulari: intorno ad ogni cellula si trova una membrana plasmatica, che ne definisce l'estensione e mantiene le differenze essenziali fra il suo contenuto e l'ambiente. Questa membrana costituisce al contempo un filtro fortemente selettivo e un sistema volto ad assicurare il trasporto attivo; essa controlla l'ingresso delle sostanze nutritive e l'uscita dei cataboliti, e genera differenze di concentrazione ionica fra l'interno e l'esterno. Agisce anche da sensore dei segnali esterni, favorendo i mutamenti della cellula in risposta alle sollecitazioni ambientali.

Tutte le membrane biologiche sono costituite da aggregati di molecole lipidiche e proteiche trattenute principalmente da interazioni di natura non covalente. Le membrane cellulari sono strutture fluide, dinamiche, e la maggioranza delle molecole proteiche e lipidiche che le costituiscono è in grado di muoversi nel piano da loro definito.

Come mostra la figura 1, le molecole lipidiche sono disposte secondo un doppio strato dello spessore di circa 5 nm. Tale doppio strato lipidico assicura la struttura fondamentale della membrana e funge da barriera relativamente impermeabile nei confronti della maggior parte delle molecole idrosolubili. Le molecole proteiche, solitamente comprese nel doppio strato lipidico, mediano quasi tutte le altre funzioni della membrana.

Le molecole lipidiche costituiscono circa il 50% della massa della maggior parte delle membrane plasmatiche delle cellule animali, mentre quasi tutto il resto è materiale proteico.

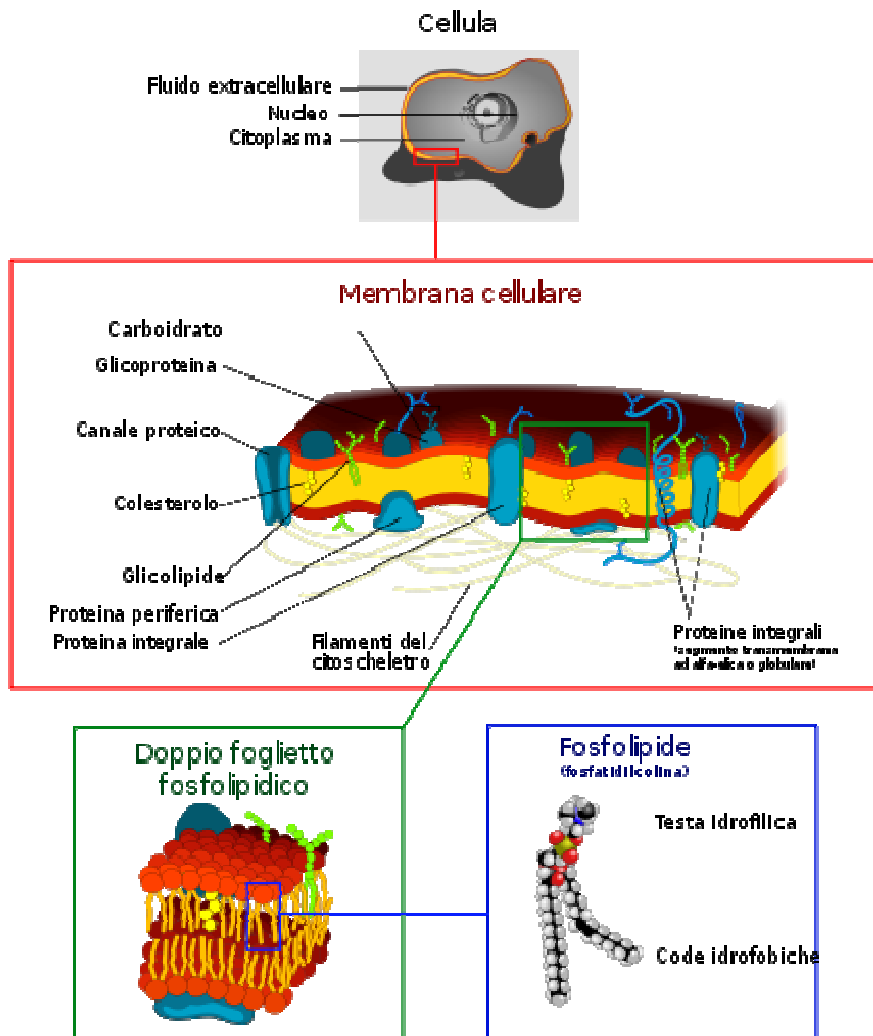


Figura 1. Struttura della membrana cellulare

Le membrane sono strutture asimmetriche: la composizione che presentano sulle due facce è diversa, e questa diversità riflette quella delle funzioni che si svolgono sulle due parti.

I tre tipi principali di molecole presenti nelle membrane cellulari sono i fosfolipidi (PL), i più abbondanti, il colesterolo e i glicolipidi, presenti soprattutto nelle membrane di cellule nervose; tutti e tre sono anfipatici, vale a dire possiedono un'estremità idrofila, polare, e una idrofoba, apolare.

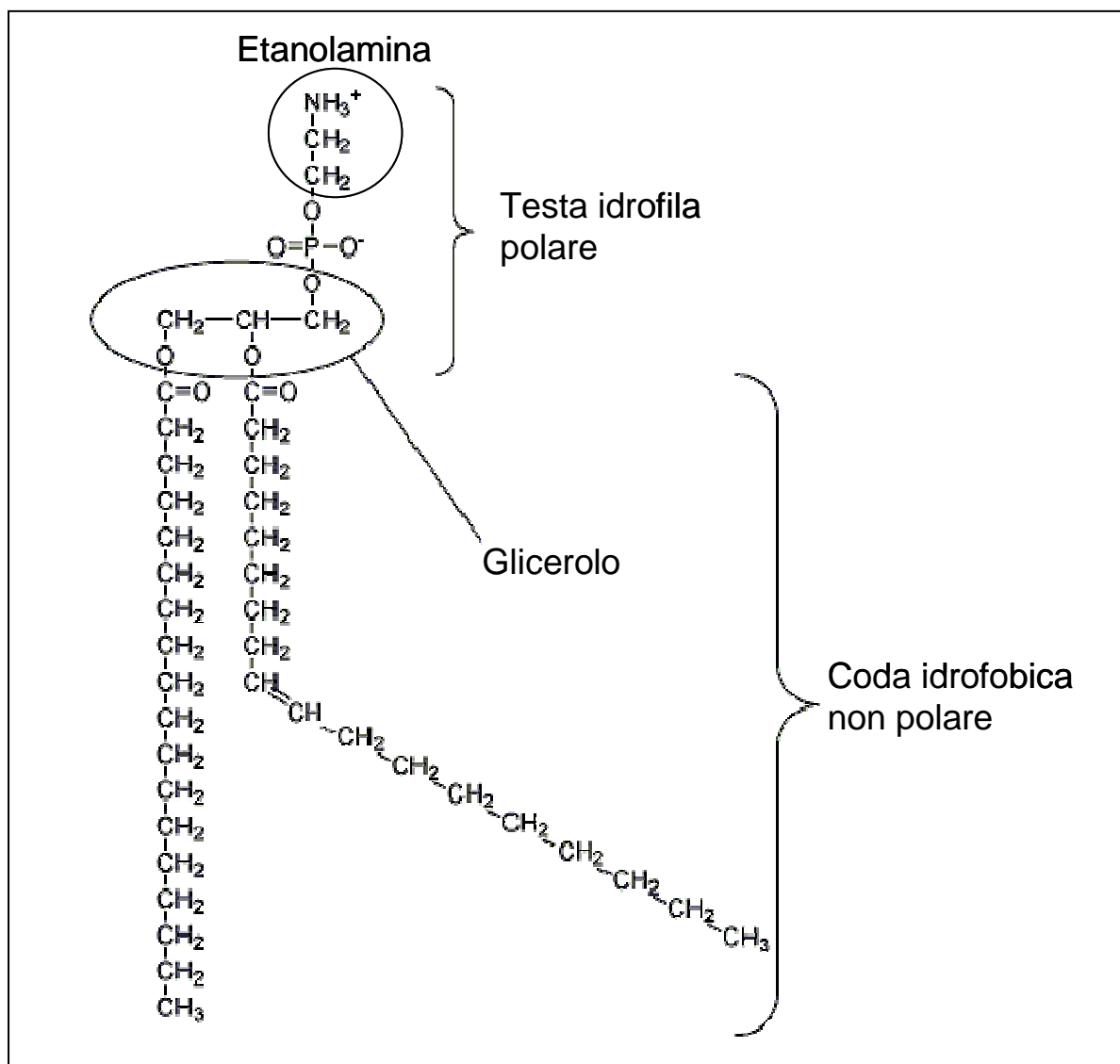


Figura 2. Struttura dei fosfolipidi

La molecola di un fosfolipide tipico (figura 2) possiede un gruppo di testa polare e due code idrocarburiche idrofobe. Le code possono avere lunghezza differente, e una di loro è caratterizzata solitamente da uno o più doppi legami cis- (cioè è insatura), laddove l'altra ne è priva (ossia è satura). Ogni doppio legame introduce nella coda un piccolo angolo. Lunghezza e grado di insaturazione diversi hanno considerevole importanza, perché influiscono sulla capacità delle molecole di addossarsi le une alle altre e, di conseguenza, sulla fluidità della membrana.

In ambiente acquoso la maggioranza dei fosfo- e dei glicolipidi forma spontaneamente doppi strati, e per di più tali strutture tendono a richiudersi su se stesse dando luogo a compartimenti ermetici, eliminando così quegli spigoli o margini che esporrebbero le code idrofobe al contatto con l'acqua.

Un'altro fattore determinante della fluidità delle membrane è il colesterolo. Le membrane plasmatiche degli eucarioti ne contengono grandi quantità, fino ad una molecola di colesterolo per ciascuna molecola di fosfolipide. Le molecole di colesterolo si orientano, dentro il doppio strato, con i gruppi ossidrilici vicini ai gruppi di testa polari dei fosfolipidi; gli anelli rigidi, laminari del colesterolo interagiscono (immobilizzandole parzialmente) con quelle regioni delle catene idrocarburiche dei PL che si trovano più vicine ai gruppi di testa polari, lasciando flessibile la parte rimanente della catena. In questo modo il colesterolo tende a rendere meno fluidi i doppi strati; inoltre diminuisce la permeabilità dei doppi strati lipidici nei confronti delle piccole molecole idrosolubili e si ritiene che esalti tanto la flessibilità quanto la stabilità meccanica del doppio strato.

I fosfolipidi o fosfogliceridi, come già accennato, contengono due molecole di AG esterificati al 1° e 2° gruppo ossidrilico del glicerolo. Il 3° gruppo ossidrilico forma invece un legame con l'acido fosforico, a sua volta legato ad un gruppo polare (inositolo, etanolamina, serina o colina) che ne determina la classe fosfolipidica: fosfatidilinositolo (PI), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilserina (PS), fosfatidilcolina (PC).

Tutti i fosfogliceridi contengono dunque una testa polare comprendente il gruppo fosfato esterificato al 3° gruppo alcolico e due code non polari, formate da AG a lunga catena, di cui quelli in posizione 1 possono essere AG saturi o monoinsaturi, mentre quelli in posizione 2 sono preferenzialmente AG polinsaturi.

Anche gli sfingolipidi sono importanti componenti di membrana: sono composti dalla sfingosina (molecola di amminoalcol a lunga catena), da una molecola di

AG a lunga catena e da una testa polare alcolica. Negli sfingolipidi la testa polare è attaccata al gruppo ossidrilico in C18 della sfingosina e l'AG forma un legame amidico con il gruppo amminico in C17. Le sfingomieline (Spm) sono gli sfingolipidi più abbondanti e sono importanti componenti del tessuto cerebrale.

Le molecole lipidiche caratterizzate dalla più sorprendente e coerente asimmetria di distribuzione nelle membrane plasmatiche delle cellule animali sono quelle che contengono oligosaccaridi: i glicolipidi (tra cui i cerebrosidi e i cerebrosidi solfati). Queste molecole si trovano solamente sulla metà esterna del doppio strato lipidico, e i loro gruppi glucidici appaiono esposti alla superficie cellulare, ciò che lascia intuire il loro ruolo nell'interazione fra la cellula e l'ambiente. Nelle cellule animali i glicolipidi derivano quasi sempre dalla ceramide, come avviene per lo sfingolipide sfingomieline, e sono tipicamente e pressochè esclusivamente contenuti nel SNC.

Anche le proteine sono una parte essenziale della membrana cellulare; esse rispondono della maggior parte delle funzioni della membrana stessa, in quanto fungono da recettori, da enzimi, da proteine di trasporto, e così via. Esse vengono suddivise in proteine periferiche (estrinseche) e strutturali (intrinseche). Le prime sono legate debolmente alla membrana e di conseguenza sono facilmente removibili, sono solubili in acqua e costituiscono il 30% delle proteine di membrana. Le seconde, meno removibili, instaurano con la membrana stessa dei forti legami e sono insolubili in acqua.

Modificazioni della fluidità della membrana alterano la permeabilità della stessa, che è influenzata non solo dal colesterolo presente, ma anche da altri fattori quali il grado di insaturazione degli AG nei PL, il rapporto tra PC e Spm, il contenuto in PE e in proteine. In particolare, PC e Spm, entrambe presenti in elevate quantità soprattutto alla superficie esterna delle membrane, si

differenziano per le proprietà fisiche: la PC favorisce la fluidità di membrana mentre la Spm la irrigidisce.

Il grado di fluidità della membrana, determinato dal contenuto in lipidi, modifica alcune funzioni cellulari attraverso modificazioni conformazionali a carico di proteine quali carriers, recettori, siti attivi degli enzimi e canali ionici (proteine transmembrana). Inoltre variazioni nella composizione lipidica della membrana possono influenzare la produzione di composti generati dai lipidi di membrana (secondi messaggeri intracellulari). Questo processo avviene tramite fosfolipasi che idrolizzano i PL in seguito a stimolazione di tipo recettoriale.

Una certa importanza, per i prodotti di cui innescano la formazione, è attribuibile alle fosfolipasi A₂ e C (PLA₂ e PLC). La PLA₂ porta a idrolisi del legame in posizione 2 di un PL (in genere PC) liberando un lisofosfolipide e un AG poliinsaturo, generalmente acido arachidonico (AA, precursore degli eicosanoidi). Per successiva acetilazione del lisofosfolipide si ottiene il PAF (platelet activating factor). La PLC scinde il gruppo fosfato dal glicerolo nel fosfatidilinositolodifosfato (PIP₂) dando origine al diacilglicerolo (DAG) e all'inositolo trifosfato (IP₃); il primo attiva le proteine chinasi C, mentre il secondo mobilizza il calcio dal reticolo endoplasmatico. Le fosfolipasi hanno un ruolo importante nel catabolismo fosfolipidico, rinnovando così di continuo i PL.

Resta infine da sottolineare la mancanza di simmetria di tutti i componenti della membrana, siano essi lipidi, proteine o polisaccaridi. E' possibile notare che, per quanto riguarda i PL, quelli rivolti verso l'ambiente extracellulare, oltre al colesterolo, sono PC e Spm, mentre PE, PS e PI si trovano sul lato citoplasmatico.

2.3 Sintesi degli acidi grassi

La sintesi degli acidi grassi avviene nell'uomo a partire dall'acetil CoA che deriva dal metabolismo glucidico. Tale via metabolica è conosciuta come sintesi completa o “*de novo*” degli acidi grassi, ha luogo nel citoplasma e porta alla formazione di 16:0 e 18:0.

Esiste anche la possibilità che residui di 2 C (acetato) vengano aggiunti ad un acido grasso preesistente; questo processo, detto di allungamento della catena, avviene sia a livello dei mitocondri che nei microsomi. Doppi legami cis possono inoltre essere introdotti negli acidi grassi per mezzo di un processo di desaturazione che avviene nei microsomi.

Gli AGE 18:2 n-6 (acido linoleico, LA) e 18:3 n-3 (acido α -linolenico, α -LNA) introdotti con la dieta vengono metabolizzati attraverso un processo di desaturazione, ad opera della $\Delta 6$ desaturasi, nei loro derivati 18:3 n-6 (acido γ -linolenico) e 18:4 n-3 (acido octadecatetraenoico) rispettivamente; da questi, per mezzo di elongasi, si ottengono l'acido di-homo- γ -linolenico (20:3 n-6) e l'acido eicosatetraenoico (20:4 n-3), che vengono ulteriormente convertiti, grazie alla $\Delta 5$ desaturasi, nei loro metaboliti acido archidonico (AA, 20:4 n-6) e acido eicosapentaenoico (EPA, 20:5 n-3), che sono i precursori degli eicosanoidi della serie 2 e 3 (figura 3).

Da AA ed EPA si ottengono prodotti a più lunga catena e più insaturi attraverso una via metabolica più complessa: 22:6 n-3 e 22:5 n-6, prodotti ultimi di EPA e AA, si ottengono a partire dai loro rispettivi precursori 22:5 n-3 e 22:4 n-6 tramite la formazione di 2 intermedi. Nella serie n-3 si verifica la formazione di 24:5 da 22:5 grazie ad un'elongasi, e da questo di 24:6 tramite una $\Delta 6$ desaturasi. Si ottiene infine, tramite β -ossidazione perossisomiale, il prodotto desiderato 22:6 n-3 (acido docosaesaenoico, DHA) (Voss et al., 1991).

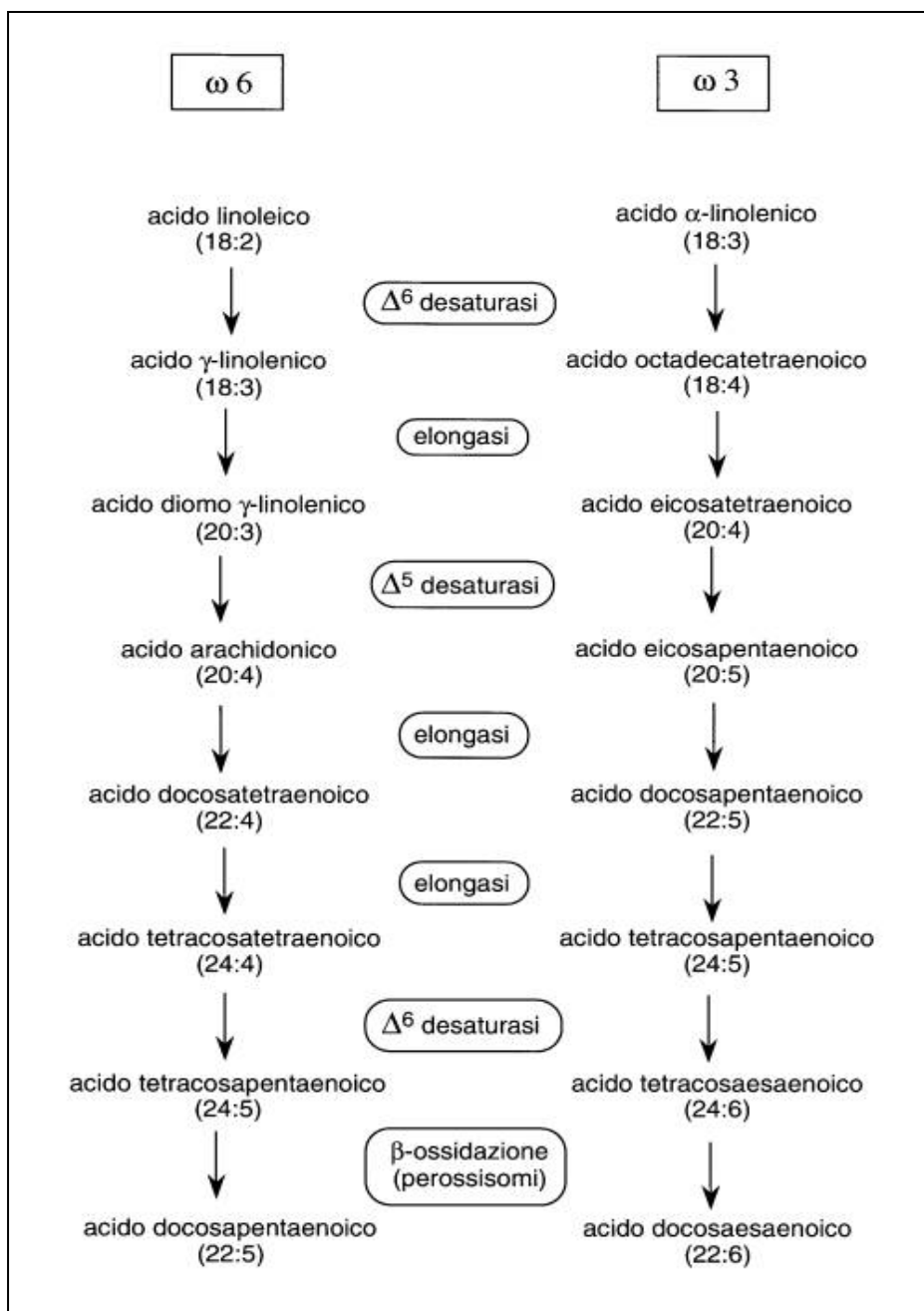


Figura 3: vie metaboliche degli acidi grassi polieniici

Lo stesso si può dire della serie n-6: in questo caso si ottiene 24:4 tramite l'elongasi, per passare a 24:5 grazie alla Δ^6 desaturasi e, per finire, una β -ossidazione porta al 22:5 n-6 (Caruso et al., 1994).

Gli AG palmitoleico (16:1 n-7) e oleico (18:1 n-9) derivano invece rispettivamente dall'acido palmitico (16:0) e dall'acido stearico (18:0). L'acido

oleico a sua volta, in carenza di AGE, può essere ulteriormente convertito in acido eicosatrienoico della serie n-9 a 20 atomi di carbonio e con 3 doppi legami (20:3 n-9).

Gli acidi grassi poliinsaturi (AGP) presenti nei tessuti derivano dal metabolismo di AGE assunti con la dieta.

La serie n-3, rappresentata dal 18:3 n-3, è contenuta per la maggior parte nei cibi ittici, ricchi di tali AG e in grado di ridurre in modo apprezzabile i rischi di patologie coronariche.

La serie n-6 invece, di cui il capostipite è il 18:2, è in gran parte contenuta negli oli vegetali, che esercitano anch'essi un'azione protettiva per le patologie aterosclerotiche e contribuiscono all'abbassamento dei livelli di colesterolo tipo LDL senza tuttavia ridurre l'HDL Colesterolo.

Gli AG a livello cellulare sono presenti pressoché esclusivamente in forma esterificata, soprattutto con il glicerolo, a formare i TG ed i PL. Gli AGP, specialmente quelli a lunga catena, sono presenti soprattutto nei PL, importanti componenti delle membrane. Ne consegue che la modulazione della composizione in AGP dei lipidi cellulari dipende, oltre che dall'apporto tramite la dieta dei vari componenti di una determinata serie metabolica o dalla conversione dei precursori ai prodotti, anche dai processi di esterificazione e dai fattori che li controllano.

2.4 Ossidazione degli acidi grassi

In presenza di ossigeno gli AG sono catabolizzati ad anidride carbonica ed acqua, e circa il 40% dell'energia prodotta in tale processo viene conservata dalle cellule sottoforma di ATP. Il rimanente dell'energia si disperde come

calore. Il catabolismo degli acidi grassi avviene nei mitocondri mediante un processo denominato β -ossidazione.

In questo processo vengono rimossi dall'acido grasso due atomi di carbonio ad ogni ciclo sotto forma di acetil CoA.

E' stato dimostrato che anche i microsomi epatici contengono gli enzimi della β -ossidazione e sono in grado di ossidare il palmitoil CoA ad acetil CoA.

La β -ossidazione può avvenire, oltre che nei mitocondri, anche nei perossisomi; la β -ossidazione perossisomiale è indotta da vari agenti, come una dieta ad alto contenuto in grassi, specialmente quelli a lunga catena monoinsaturi.

I perossisomi hanno un ruolo maggiore nell'accorciare acidi grassi a lunga catena come 22:1 n-9, 22:6 n-3, 22:5 n-6, 24:1 e 26:1, e inoltre presentano un'alta affinità per gli AGP. Infatti retroconvertono l'acido docosapentaenoico (22:5 n-6, DPA) ad acido arachidonico (AA) e l'acido docosaesaenoico (DHA) ad acido eicosapentaenoico (EPA). Questa retroconversione è impiegata non per generare energia ma per accorciare la catena carboniosa degli acidi grassi.

2.5 Desaturasi degli acidi grassi

Le reazioni di allungamento e desaturazione cui vanno incontro gli AG, che si verificano soprattutto nei microsomi, sono catalizzate da due diversi tipi di enzimi: le elongasi e le desaturasi. Più importanti sono le desaturasi, estremamente specifiche, che rappresentano la tappa limitante la velocità del processo.

Le desaturasi sono componenti chiave di un sistema multienzimatico che regola la sintesi degli AGP (Leikin et al., 1988).

Tra le desaturasi la più importante è la $\Delta 6$ desaturasi, che agisce sugli AGE della serie n-3 e n-6 portando alla formazione dell'acido γ -linolenico (18:3 n-6) e

dell'acido octadecatetraenoico (18:4 n-3), a partire rispettivamente dal 18:2 n-6 e dal 18:3 n-3.

La $\Delta 5$ desaturasi converte invece l'acido di-homo- γ -linolenico (20:3 n-6) ad AA (20:4 n-6), l'acido eicosatetraenoico (20:4 n-3) ad EPA (20:5 n-3) e il 20:2 n-9 a 20:3 n-9.

Sia la $\Delta 6$ desaturasi che la $\Delta 5$ desaturasi sono enzimi microsomiali e sembrano essere componenti di un sistema tri-enzimatico che include la NADH-citocromo *b5* reduttasi, il citocromo *b5* e la rispettiva desaturasi. Cuore, cervello e polmone umani contengono livelli apprezzabili di questi due enzimi, mentre nella placenta, nei reni e nel muscolo scheletrico i livelli sono bassi. L'organo in cui comunque l'attività è maggiore è il fegato che infatti contiene livelli di $\Delta 5$ desaturasi 4-5 volte più elevati e di $\Delta 6$ desaturasi 12 volte maggiori rispetto ad esempio a quelli presenti nel cervello (Cho et al. 1999). Di conseguenza il fegato è considerato la sede primaria di sintesi dei PUFA utilizzati nei tessuti periferici (Cho et al. 1998). Si è inoltre notata la carenza di $\Delta 6$ desaturasi in molte linee cellulari tumorali, anche se questo da solo non sembra influire sulla crescita di cellule neoplastiche e non (Grammatikos et al. 1994).

I geni di entrambe le desaturasi umane sono stati clonati. Il singolo trascritto che codifica per la $\Delta 6$ desaturasi ha una grandezza di circa 3.2 Kb (Cho et al. 1998), mentre quello della $\Delta 5$ desaturasi ha dimensioni leggermente maggiori, ed è di 4.4 Kb (Cho et al. 1999). I due geni sono simili per il 75%. Questi sono entrambi localizzati sul cromosoma 11, con orientazione opposta, e l'esone contenente il sito di inizio trascrizione della $\Delta 6$ desaturasi dista circa 11000 pb da quello della $\Delta 5$. La vicinanza dei due promotori apre la possibilità che la trascrizione dei due geni sia governata in modo coordinato da sequenze regolatorie presenti all'interno delle 11000 pb comuni ad entrambi i geni.

La localizzazione di entrambe le desaturasi sul cromosoma 11 è una caratteristica importante in quanto questo cromosoma è correlato con il fenotipo

per l'obesità nell'animale. Eventuali anomalie nell'espressione dei due enzimi potrebbero giocare un ruolo chiave nella comparsa di fisiopatologie associate all'obesità come, ad esempio, l'insulino-resistenza.

Il frammento genomico che include entrambe le desaturasi è compreso tra il locus della "flap endonucleasi 1" (FEN 1) e quello della bestrofina, proteina caratteristica del morbo di Best, patologia in cui si hanno disfunzioni oculari (Leonard et al. 2000). Sul cromosoma 11 ci sono altri geni che codificano per proteine che, se alterate, possono indurre patologie oculari (ad esempio la vitreoretinopatia familiare autosomica dominante, la sindrome di pseudogliomaosteoporosi o la fibrosi della muscolatura extra-oculare congenita), e la localizzazione dei geni delle desaturasi in questa regione può suggerire nuovi esperimenti mirati a spiegare la relazione tra mutazioni di questi geni e sviluppo di patologie a carico del sistema visivo.

Un'analisi comparativa dell'abbondanza dell'mRNA delle due desaturasi nei diversi tessuti rivela che, ovunque, il contenuto di mRNA della $\Delta 5$ desaturasi è minore rispetto a quello osservato per la $\Delta 6$ desaturasi. Questa osservazione è particolarmente interessante perchè la $\Delta 6$ desaturasi è invece in genere considerata l'enzima che catalizza il passaggio limitante nella sintesi dei PUFA a 20 e 22 atomi di carbonio.

De Antuono et al., studiando cellule epatiche umane (cellule di Chang), hanno notato che queste possiedono attività $\Delta 5$ ma non $\Delta 6$ desaturasi. Hanno quindi supposto che i due geni abbiano, almeno in parte, meccanismi di controllo indipendenti, anche se non è noto se a livello pre o post-trascrizionale (De Antuono et al. 2001).

La $\Delta 5$ e la $\Delta 6$ desaturasi umane sono peptidi costituiti da 444 aminoacidi, e i due enzimi sono identici per il 61% e simili per il 75%. La sequenza aminoacidica delle due desaturasi è completamente diversa da quella di tutte le altre proteine umane, compresa la $\Delta 9$ desaturasi che converte il 18:0 a 18:1.

L'attività di entrambe le desaturasi è indotta da diete carenti in AGE e soppressa da diete ricche in oli marini e vegetali, ossia ricca di AGP a lunga catena. È stato dimostrato infatti che somministrando AA, EPA e DHA, i livelli di mRNA della $\Delta 6$ desaturasi diminuiscono del 50% (Cho et al. 1998).

È stata inoltre identificata la zona responsiva di tale modulazione nel promotore della $\Delta 6$ desaturasi: sono circa 90 paia di basi nella regione -466/-377. Tale regione, a livello epatico, è quella responsiva anche a SREBP-1c (Nara et al. 2002).

SREBP (Sterol Regulatory Element Binding Protein) è una proteina appartenente alla famiglia dei recettori nucleari, presente in tre diverse isoforme, che agisce come fattore di trascrizione giocando un ruolo centrale nell'espressione di geni coinvolti nella lipogenesi.

SREBP-1, sia SREBP-1a che SREBP-1c, sono coinvolte nel metabolismo energetico, mentre SREBP-2 è specifica per la sintesi del colesterolo (Shimano 2001).

L'isoforma coinvolta nella modulazione dell'espressione delle desaturasi è SREBP-1c. Questa lega il frammento compreso nella regione -466/-377 del promotore della $\Delta 6$ desaturasi. Analisi di sequenziamento, effettuate su tale frammento per identificare il sito preciso di legame dei fattori di trascrizione, hanno evidenziato che tale regione comprende due sequenze per il legame di SREBP, una SRE (Sterol Responsive Element) classica (SRE1) e una sequenza E-box simile a SRE, chiamata SRE2, e due sequenze per il legame di un altro fattore di trascrizione, NF-Y (Nuclear Factor Y). La sequenza necessaria per l'attivazione da parte di SREBP-1c e per l'inibizione da parte dei PUFA è la sequenza E-box simile a SRE, ritrovata poi anche nel promotore della $\Delta 9$ desaturasi, sia umana che murina. Per tale attivazione sembra in ogni caso necessaria anche la presenza di NF-Y (Nara et al. 2002).

E' stato dimostrato inoltre che SREBP-1c non solo attiva la trascrizione del gene della $\Delta 6$ desaturasi, ma ne media anche l'inibizione, con un meccanismo a feedback da parte degli AGP.

Gli stessi effetti di SREBP-1c sull'attività della $\Delta 6$ desaturasi sono stati riscontrati, nel topo, anche sull'attività della $\Delta 5$ desaturasi (Matsuzaka et al. 2002).

L'espressione di entrambe le desaturasi è indotta inoltre dai proliferatori perossisomiali (PP, tra cui ricordiamo i fibrati), che agiscono attivando PPAR α (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α). Questo è un fattore di trascrizione della famiglia dei recettori nucleari, presenti nei tessuti ad elevata capacità ossidativa, che, dopo dimerizzazione con il recettore per i retinoidi (RXR), modifica la propria conformazione, si lega a PPRE (Peroxisome Proliferator Responsive Element) e attiva la trascrizione genica.

Ligandi naturali di tutte le isoforme di PPAR sono gli acidi grassi monoinsaturi, gli AGP, gli acidi grassi ossidati e gli eicosanoidi.

I PP attivano l'espressione della $\Delta 6$ desaturasi in modo indiretto: inducono l'ossidazione degli AGP mediante attivazione degli enzimi di ossidazione degli AG, ed inoltre la proliferazione perossisomiale causata dai PP aumenta la richiesta di AGP da parte della cellula (He et al. 2002).

PPAR α è inoltre responsabile, nel topo, dell'induzione a digiuno delle desaturasi (Matsuzaka et al. 2002).

Un'altra isoforma di PPARs, PPAR γ , sembra modulare l'espressione delle desaturasi. Nel dettaglio, PPAR $\gamma 2$ è presente a livello del tessuto adiposo e viene attivata dal trattamento con tiazolidindioni (quali il troglitazone) in pazienti affetti da diabete mellito di tipo 2. A tale trattamento consegue un aumento della sensibilità delle cellule all'insulina. Si è osservato in vitro che in cellule trattate con troglitazone si verifica un aumento dei livelli di PPAR γ e una diminuzione dei livelli di mRNA della $\Delta 6$ desaturasi con conseguente calo degli acidi grassi

cellulari della serie n-6. Questo suggerisce che la regolazione della $\Delta 6$ desaturasi è mediata anche da PPAR γ (Wahli et al. 2002).

Ad eccezione delle desaturasi, non si conoscono altri geni attivati sia da SREBP-1c che da PPARs. Questa doppia regolazione contribuisce a mantenere stabile la produzione di PUFA a lunga catena, essenziali per le funzioni cellulari e per l'apporto energetico (Nakamura et al. 2002).

2.6 Modulazione dell'attività desaturasica

La dieta e più in generale lo stile di vita influiscono notevolmente sull'attività delle desaturasi le quali, come già accennato, sono sottoposte anche a controllo ormonale e farmacologico.

Numerosi studi sono stati condotti nell'animale e nell'uomo per valutare l'influenza di diversi fattori.

In ratti alimentati con diete povere in AGE si ha un aumento dell'attività della $\Delta 6$ desaturasi al fine di mantenere invariato il grado di insaturazione cellulare (Peluffo et al. 1976). Una dieta di questo tipo aumenta l'espressione della $\Delta 5$ e della $\Delta 6$ desaturasi anche nell'uomo (Melin et al. 1997). Anche la somministrazione a ratti di un olio ricco di acido linoleico e di acido α -linolenico determina un incremento di attività sia della $\Delta 5$ che della $\Delta 6$ desaturasi, mentre l'attività della $\Delta 9$ desaturasi diminuisce notevolmente (Christiansen et al. 1991).

Si è visto inoltre che gli AGP a lunga catena sopprimono la trascrizione della $\Delta 5$ e della $\Delta 6$ desaturasi, con riduzione dei livelli di mRNA del 70-80% (Price et al. 2000). Infatti una dieta ricca in oli marini, ad alto contenuto di $\omega 3$, e di vegetali, ad alto contenuto di $\omega 3$ e $\omega 6$, induce un calo netto dell'espressione della $\Delta 6$

desaturasi (Melin et al. 1997). Inoltre, i PUFA prodotti dalla $\Delta 6$ desaturasi sono inibitori della lipogenesi, e induttori di ossidazione significativamente più potenti dei loro precursori.

Una dieta povera in steroli induce invece un aumento di attività della $\Delta 5$ e della $\Delta 6$ e una diminuzione di quella della $\Delta 9$ desaturasi (Leikin et al. 1988). Gli ossisteroli, derivati ossidati del colesterolo, in particolare il 7β -idrossicolesterolo, diminuiscono in vitro l'attività della $\Delta 5$ e della $\Delta 6$ desaturasi, con effetti più marcati a carico della $\Delta 5$ desaturasi (Risé et al. 2004).

Una dieta ricca di carboidrati induce la trascrizione della $\Delta 9$ desaturasi: infatti, somministrando fruttosio a topi diabetici, aumenta di due volte il contenuto di mRNA di tale enzima (Waters et al. 1994).

Anche le vitamine influenzano l'attività della $\Delta 9$ desaturasi: sia la vitamina D (Katayama et al. 2003) che la vitamina A (Miller et al. 1997) ne inducono infatti l'espressione.

Infine anche composti tossici come il fumo di sigaretta possono influenzare l'attività delle desaturasi; nei fumatori vi è una riduzione della conversione del 20:3 n-6 a 20:4, associata a una riduzione dell'attività della $\Delta 5$ desaturasi (Pawlosky et al. 1999). Simon et al. hanno anche trovato una correlazione positiva tra il consumo di sigarette e i livelli di 20:3 n-6 nei fosfolipidi, e correlazioni negative tra il fumo di sigaretta e i livelli di acido arachidonico nei fosfolipidi e negli esteri del colesterolo, dimostrando così un effetto del fumo di sigaretta sullo step di $\Delta 5$ desaturazione. In vitro è stato dimostrato che il fumo di sigaretta inibisce la conversione dell'acido linoleico nei suoi derivati più insaturi e a più lunga catena ed anche l'attività di $\Delta 6$ e $\Delta 5$ desaturasi (Ghezzi et al. 2007).

Dal punto di vista ormonale, un importante controllo è quello esercitato dall'insulina: in ratti diabetici, la somministrazione di insulina induce, in 24 ore,

un aumento di circa 8 volte dell'mRNA della $\Delta 6$ desaturasi (Rimoldi et al. 2001). Questo è confermato anche nell'uomo, dove l'insulina attiva sia la $\Delta 5$ che la $\Delta 6$ desaturasi (Brenner, 2003). Lo stesso effetto è stato riscontrato anche sulla $\Delta 9$ desaturasi, ed è stato dimostrato sia in ratti (Worcester et al. 1979) che in topi (Waters et al. 1994).

Al contrario dell'insulina, il glucagone diminuisce drasticamente sia l'attività enzimatica che i livelli di mRNA delle desaturasi, agendo soprattutto a livello trascrizionale. Questo effetto inibitorio, mediato dal glucagone, è più potente del rispettivo potenziamento indotto dall'insulina (Lefevre et al. 1999).

L'attività della $\Delta 5$ e della $\Delta 6$ desaturasi è inibita anche da diversi altri ormoni come adrenalina, glucocorticoidi, mineralcorticoidi, estriolo, estradiolo e ACTH, mentre progesterone e cortexolone non hanno alcun effetto (Brenner, 2003).

La trascrizione della $\Delta 9$ murina è invece inibita dagli ormoni tiroidei e indotta da alcuni ormoni steroidei come estrogeni e androgeni (Ntambi et al. 2004).

Un altro importante controllo ormonale esercitato sulla $\Delta 9$ desaturasi è quello della leptina, ormone prodotto dagli adipociti che, agendo a livello del sistema nervoso centrale, regola il bilancio energetico, il metabolismo e la risposta neuroendocrina alle alterazioni nutrizionali. La leptina diminuisce la produzione di acidi grassi monoinsaturi con down-regulation dei livelli di mRNA e dell'attività enzimatica della $\Delta 9$ desaturasi (Cohen et al. 2002). Gli effetti metabolici della leptina, a livello epatico, sono in ogni modo il risultato di un'azione centrale, anche se per ora il meccanismo rimane sconosciuto (Ntambi et al. 2004).

Dato che l'attività delle desaturasi è regolata dai recettori PPAR, i fibrati e più in generale tutti i proliferatori perossisomiali, ligandi di PPAR α , aumentano l'attività in vivo e in vitro della $\Delta 9$ desaturasi (Ntambi et al. 2004), mentre per la $\Delta 5$ e la $\Delta 6$ desaturasi si è notato un aumento solo in vivo (Kawashima et al. 1990). I risultati ottenuti in vitro sono invece discordanti. In contrasto i

tiazolidindioni, ligandi di PPAR γ , diminuiscono i livelli di mRNA di tutte e tre le desaturasi (Wahli et al. 2002; Ntambi et al. 2004).

Un'importante modulazione di tipo farmacologico è quella esercitata dalle statine sulla $\Delta 5$ e sulla $\Delta 6$ desaturasi. Le statine sono utilizzate come farmaci ipocolesterolemizzanti, in quanto il loro principale effetto è quello di agire da inibitori dell'3-idrossi 3-metil glutaril coenzima A (HMG-CoA) reduttasi, enzima chiave nella biosintesi del colesterolo.

Già nel 1992 si era osservato che le statine influenzavano anche il metabolismo degli acidi grassi poliinsaturi, aumentandone la biosintesi e la loro incorporazione in fosfolipidi e trigliceridi (Williams et al., 1992).

Successivamente è stato dimostrato che, in colture cellulari, e nello specifico in monociti (MM6) ed epatociti (HepG2), una statina, la lovastatina, è in grado di diminuire i livelli di LA e di far aumentare quelli di AA e di EPA, favorendo la loro incorporazione nei fosfolipidi cellulari.

Gli inibitori dell'HMG-CoA reduttasi stimolano la desaturazione dell'acido linoleico attraverso l'induzione del reticolo endoplasmatico (Hrboticky et al., 1994).

Gli effetti delle varie statine, ed in particolare della simvastatina, sono stati ampiamente studiati in cellule monocitiche umane di origine tumorale (THP-1). La simvastatina è in grado di aumentare l'attività della $\Delta 5$ (Risé et al. 1997) e, in misura minore, della $\Delta 6$ desaturasi a concentrazioni addirittura inferiori a quelle necessarie ad inibire la sintesi del colesterolo, suggerendo che tra le azioni principali di questi farmaci vi sia appunto la modulazione del metabolismo degli acidi grassi (Risé et al. 2003).

E' stata inoltre analizzata la conversione di acido linoleico (18:2 n-6), acido α -linolenico (18:3 n-3) e acido stearico (SA, 18:0) in due diverse linee cellulari, in cellule THP-1 e in cellule di origine epatica (HepG2): gli acidi grassi della serie n-3 sono convertiti più attivamente di quelli della serie n-6, sia prima che dopo

trattamento con simvastatina, e gli effetti della statina sono più accentuati nelle THP-1 che nelle HepG2. La conversione di acido stearico (SA) invece è simile in entrambe le linee cellulari in condizioni controllo ma, dopo trattamento con simvastatina, la conversione aumenta nelle HepG2, mentre diminuisce nelle THP-1 (Ris  et al. 2005).

Anche in vivo, in pazienti ipercolesterolemici, le statine inducono la sintesi di AA, e quest'effetto   dello stesso ordine di grandezza dell'inibizione della sintesi del colesterolo (Ris  et al. 2001).

Infine, le desaturasi possono essere modulate da altri farmaci, quali curcumina, sesamina (inibitori non specifici e non competitivi nei microsomi di ratto), nifedipina e nicardipina (vasodilatatori, Ca⁺⁺ antagonisti) (Ris  et al. 2003).

3. Acidi grassi e fibrosi cistica

In pazienti FC viene frequentemente riscontrata (85%) un'alta incidenza di Essential Fatty Acid Deficiency (EFAD), cioè una carenza di AG essenziali (Farrell et al. 1985; Hubbard et al. 1977; Lepage et al. 1989; Rosenlund et al. 1974; van Egmond et al. 1996).

L'EFAD è più marcata durante l'infanzia e l'alterazione del metabolismo degli AGE è più significativa a livello dei CE (Hubbard et al. 1977). Le alterazioni osservate più frequentemente sono la riduzione dei livelli di LA e di DHA a livello del plasma (Freedman et al. 2004; Lloyd-Still et al. 1996), associata ad un aumento dei livelli di 20:3 n-9, biomarker della carenza di AG essenziali, 18:1 n-9 (OA) e di 16:1 n-7 (PA) (Farrell et al. 1985; Chase et al. 1978; Roulet et al. 1997). Nel 1962 infatti Kuo et al. Per primi osservarono che la patologia era caratterizzata da basse concentrazioni di LA in plasma e tessuti (Kuo et al. 1977) ed inoltre nel 1972 Rosenlund et al. rilevarono bassi livelli di DHA in diversi tessuti ottenuti da autopsie di pazienti FC (Rosenlund et al. 1972).

Per molti anni queste alterazioni sono state ritenute una conseguenza del malassorbimento lipidico causato dall'insufficienza pancreatica ma è stato dimostrato che l'EFAD è presente in pazienti giovani ben nutriti, che non ricevono una dieta povera in grassi e non presentano malassorbimento lipidico (Roulet et al. 1997, Aldamiz-Echevarria et al. 2009), ed anche in pazienti con una regolare terapia a base di enzimi pancreatici (Benabdeslam et al. 1998). Inoltre alterazioni del metabolismo lipidico sono già presenti in neonati affetti da FC con poche settimane di vita (Lloyd-Still et al. 1991). Numerosi studi di supplementazione con AG sono stati effettuati, con alcuni miglioramenti nelle complicanze della patologia, quali la riduzione della steatosi epatica (Strandvik et al. 1994) e la normalizzazione della funzionalità renale (Strandvik et al. 1989). Studi condotti in modelli animali hanno confermato che molti sintomi

della FC possono essere dovuti a EFAD. Infatti nel 1999 Freedman et al. dimostrarono che le anomalie morfologiche presenti nel pancreas e nell'ileo di topi geneticamente modificati che mostravano sintomi FC potevano essere normalizzate dalla somministrazione di alte dosi di DHA. Tuttavia in una serie di studi condotti in pazienti FC, la somministrazione di DHA non ha portato a nessun miglioramento clinico (Lloyd-Still et al. 2006; McKarney et al. 2007; Coste et al. 2007). Solo in uno studio si è osservato un miglioramento della funzionalità polmonare in seguito a supplementazione per 8 mesi sia con EPA che con DHA (De Vizia et al. 2003), ma in un altro studio condotto in pazienti adulti sono stati riportati effetti negativi, dopo 3 mesi di regolare somministrazione intravenosa di AG n-3 (Durieu et al. 2007). Le alterazioni nel metabolismo degli AG osservate nella FC si sono così rivelate più complesse del previsto.

Un'altra alterazione osservata in diversi studi ma non in tutti è un aumento dei livelli plasmatici di AA; questa alterazione ha implicazioni piuttosto rilevanti in quanto l'AA è precursore di eicosanoidi proinfiammatori.

Alti livelli di AA sono stati osservati in membrane cellulari dell'ileo di topi CFTR knock-out (Freedman et al. 1999). Le stesse alterazioni si vedono nei PL presenti nel fluido di lavaggio degli alveoli polmonari, nel plasma e nei tessuti di pazienti FC (Strandvik et al. 1996; Carlstedt-Duke et al. 1986; Freedman et al. 2004; Gilljam et al. 1986). Gli alti livelli di AA suggeriscono che l'alterato status lipidico può derivare da un'alterazione del metabolismo degli AG essenziali; gli elevati livelli di AA potrebbero risultare sia da iperproduzione che da ridotto catabolismo. In cellule FC CFPAC-1 la conversione di LA in AA tramite processi di elongazione e desaturazione è aumentata di 1.8 volte in confronto con cellule FC transfettate con il gene sano (Bhura-Bandali et al. 2000). Inoltre i pazienti FC sono caratterizzati da un aumento della produzione e dell'escrezione di specie infiammatorie derivate dall'AA (Strandvik et al. 1996;

De Lisle et al. 2008) ed infine, nel plasma di pazienti FC, è stato osservato un aumento dell'attività della PLA₂ (Laszlo et al. 1993).

Gli AG presenti nei lipidi delle membrane biologiche, le quali rivestono ogni cellula e organulo, sono importanti regolatori dei segnali cellulari, regolando la funzionalità di proteine e canali, la permeabilità ed anche l'espressione genica, e sono così potenziali modulatori della funzionalità di CFTR.

Inoltre è stato suggerito che CFTR possa regolare la composizione dei PL di membrana. In cellule epiteliali polmonari umane vi è una ridotta incorporazione di AG nei PL di membrana quando i canali del cloro vengono bloccati chimicamente (Kang et al. 1992). Inoltre una proteina CFTR difettosa comporta una ridotta incorporazione di LA nei PL di cellule FC, e transfettando queste ultime con il gene sano, l'incorporazione aumenta (Bhura-Bandali et al. 2000).

Anche topi knock-out per il gene CFTR presentano EFAD. Però la composizione delle membrane cellulari varia a seconda del modello animale: alcuni modelli presentano riduzione di AG n-3, altri di AG n-6.

E' stato ipotizzato che l'AA partecipi alla fisiopatologia della FC in quanto inibisce il passaggio di Cl⁻ regolato da CFTR quando applicato al lato citoplasmatico di patches di membrane excise. Anche altri AG bloccano i canali controllati da CFTR con vari livelli di efficienza (Zhou et al. 2007).

Nel 2007 Batal et al. hanno dimostrato che le alterazioni nel profilo degli AG sono piuttosto rilevanti e che il prodotto LA x DHA valutato nel plasma può essere efficacemente utilizzato per distinguere tra persone affette da FC e persone sane (Batal et al. 2007). Risé et al. hanno poi confermato che una riduzione di questo rapporto nel sangue intero, correla con la severità della patologia polmonare (Risé et al. 2010). Infine anche Coste et al. hanno osservato una correlazione tra lo stato pancreatico dei pazienti FC e i bassi livelli del prodotto LA x DHA (Coste et al. 2008).

SCOPO DEL LAVORO

Scopo di questa tesi è stato quello di confermare, in colture cellulari transfettate con CFTR mutato, i bassi livelli di LA e DHA osservati in pazienti FC e studiare se la carenza di questi acidi grassi associata alla carenza di acidi grassi essenziali osservata nei pazienti, sia dovuta ad un'alterazione del metabolismo degli acidi grassi stessi. Inoltre si è voluto verificare se queste alterazioni siano associate o meno ad una variazione nell'attività ed espressione degli enzimi di desaturazione degli acidi grassi, e valutare come queste alterazioni si rispecchiano nelle varie classi lipidiche.

In secondo luogo si è voluto indagare se il trattamento con acidi grassi, in particolare LA e DHA, possa portare ad un miglioramento dell'alterazione del metabolismo degli acidi grassi, per dimostrare in ultima analisi se, in particolare il DHA, sia un trattamento efficace per ridurre la gravità delle complicanze nei pazienti FC, dal momento che il DHA è substrato per la sintesi delle resolvine della serie D ed anche di protectine e maresine, tutti composti con attività antiinfiammatoria.

MATERIALI E METODI

1. Colture cellulari.

Per tutti gli esperimenti è stata utilizzata una linea di cellule epiteliali bronchiali umane (16HBE-14o) transfettate con la sequenza senso (S1) o con la sequenza antisenso (AS3) per il gene CFTR, esprimenti quindi un fenotipo normale o CF rispettivamente (Cigana et al. 2007; Zeitlin et al. 1991).

Le cellule vengono fatte crescere in Minimum Essential Medium Eagle (EMEM) con una concentrazione finale del 10% di FBS, 2 mM di L-Glutammina (1%) e Geneticina G-418 solfato (50 mg/ml), e mantenute a 37°C, 95% umidità e 5% CO₂. Si ricorre all'uso di ambienti perfettamente sterili per evitare eventuali contaminazioni, in quanto il medium di coltura può rappresentare un nutrimento ideale per la crescita non solo delle cellule, ma anche di microrganismi indesiderati.

2. Piano sperimentale I.

In tutti gli esperimenti condotti, alle cellule viene tolto il terreno con FBS e viene aggiunto terreno privo di FBS; le cellule vengono quindi mantenute per 24 h in condizioni tali per la successiva estrazione del RNA e quindi l'analisi dell'espressione degli enzimi desaturasici, o incubate con substrato radioattivo, [1-¹⁴C] acido linoleico (LA, 18:2 n-6) o [1-¹⁴C] acido α-linolenico (α-LNA, 18:3 n-3), entrambi in concentrazione di 1 μci/piastra, per l'analisi del metabolismo degli acidi grassi. Alla fine del periodo di incubazione le cellule vengono lavate con PBS e si procede all'estrazione dei lipidi totali.

3. Piano sperimentale II.

Anche in questo caso alle cellule viene tolto il terreno con FBS e viene aggiunto terreno privo di FBS; le cellule vengono quindi trattate con concentrazioni crescenti di complesso LA-BSA (2,5-5-10 μM) e contemporaneamente incubate con [$1\text{-}^{14}\text{C}$] acido linoleico in concentrazione di 1 μCi /piastra oppure trattate con concentrazioni crescenti di complesso DHA-BSA (2,5-5-10-20 μM). Dopo 24 h le cellule vengono raccolte e si procede all'estrazione dell'RNA per l'analisi dell'espressione degli enzimi desaturasici, oppure all'estrazione dei lipidi totali per la successiva analisi del profilo lipidico in gas-cromatografia o del metabolismo lipidico mediante HPLC accoppiato a radiodetector.

4. Estrazione dei lipidi totali e transmetilazione degli acidi grassi.

Al termine dell'incubazione le cellule vengono staccate con PBS. L'estrazione dei lipidi totali (LT) viene eseguita secondo il metodo di Folch et al. (Folch et al. 1957). I pellets vengono ripresi in 2 mL di PBS e 10 mL di cloroformio/metanolo 2:1 contenente l'antiossidante 2,6 butilidrossitoluene (BHT, a concentrazione finale 5 $\mu\text{g/mL}$); in seguito si procede all'omogeneizzazione con Politron Ultra-Turrax T25.

Si lasciano poi separare le 2 fasi in freezer a -20°C ; trascorse le 2 ore necessarie all'ottenimento delle due fasi, si preleva la fase inferiore organica contenente i LT, la si fa evaporare sotto flusso di azoto e la si riprende in 500 μL di cloroformio/metanolo 2:1. Aliquote da 10 μL vengono contate al β -counter per misurare la radioattività incorporata nei LT, che viene espressa come cpm/ μL o

cpm/10⁶ cellule o cpm/mg LT, mentre la concentrazione dei lipidi nell'estratto viene determinata con metodo gravimetrico.

I LT vengono poi transesterificati con CH₃OH/HCl 3N per 1 h a 90°C. In queste condizioni si verifica inizialmente l'idrolisi dei legami esterei dei gruppi carbossilici degli AG, cui segue la formazione dei metilesteri degli AG in presenza di metanolo. Si lasciano poi raffreddare i campioni per 10 minuti a 5°C e successivamente si aggiunge una soluzione di KCl satura e si estraggono i metilesteri con esano.

5. Analisi dei metilesteri degli AG in GC.

Al fine di determinare il profilo in AG delle cellule, 1 µl di estratto contenente i metilesteri degli AG viene iniettato al gascromatografo (GC1000, DANI, Italia) per la successiva analisi (colonna: Omegawax 320, Supelco; temperatura programmata: da 170 a 220°C; iniettore: PTV; rivelatore: FID). I picchi corrispondenti ai diversi AG vengono determinati in base al tempo di ritenzione e l'analisi quantitativa effettuata grazie all'utilizzo dello standard di riferimento.

6. Analisi dei metilesteri degli AG in HPLC.

La separazione dei metilesteri degli AG viene effettuata mediante HPLC Jasco Model 880-PU (Japan Spectroscopic, Tokyo 192, Japan), utilizzando un sistema a due solventi (acqua/acetonitrile) in gradiente.

Per LA si segue la seguente programmazione:

- t = 0 minuti 20% acqua 80% acetonitrile

- t = 20 minuti 20% acqua 80% acetonitrile
- t = 70 minuti 0% acqua 100% acetonitrile
- t = 110 minuti 0% acqua 100% acetonitrile
- t = 120 minuti 20% acqua 80% acetonitrile

Per α -LNA:

- t = 0 minuti 26% acqua 74% acetonitrile
- t = 30 minuti 26% acqua 74% acetonitrile
- t = 70 minuti 0% acqua 100% acetonitrile
- t = 110 minuti 0% acqua 100% acetonitrile
- t = 120 minuti 26% acqua 74% acetonitrile

Il flusso utilizzato è 1 mL/minuto; la colonna usata è una Lichrospher 100, RP-18 (5 μ m) (Merk KGaA, 64271 Darmstadt, Germany), a fase inversa. Tramite un rivelatore in continuo di radioattività (Flow Scintillation Analyzer 500TR Series, PerkinElmer) si misura la radioattività associata ai metilesteri degli AG, identificati in base all'impiego di standards di riferimento (lunghezza d'onda λ = 205 nm) (Risé et al. 2005).

7. Incorporazione di [1-¹⁴C] LA e [1-¹⁴C] α -LNA nelle singole classi lipidiche.

Le diverse classi lipidiche (fosfolipidi, trigliceridi, diacilgliceroli, esteri del colesterolo e acidi grassi liberi) vengono separate mediante TLC monodimensionale (thin layer chromatography) utilizzando lastre di silice-gel 60 R e come fase mobile una miscela di esano/etere dietilico/acido acetico (70:30:1.5).

Insieme ai campioni da analizzare (circa 200000 cpm per ciascuno), marcati con LA o α -LNA, vengono seminati standards di riferimento per ogni lipide da identificare. La lastrina viene posta in una camera di eluizione satura di solvente. Quest'ultimo, correndo verso l'alto, trascina i lipidi in base alla loro polarità. Terminata la corsa i solventi vengono fatti evaporare e la lastrina esposta ai vapori di iodio per evidenziare i lipidi separati (PL, TG, DAG, CE, FFA). Le bande vengono raccolte e poste in vials, dopo aver aggiunto 1 mL di metanolo/acqua 1:1 per solubilizzare la silice, e 10 mL di liquido scintillante Ultima GoldTM; la radioattività contenuta nei campioni è rilevata al β -counter, espressa come radioattività presente in assoluto o come % di radioattività incorporata nelle diverse classi lipidiche (% cpm recuperati) (Risé et al. 1997).

8. Conversione di [1-¹⁴C] LA e [1-¹⁴C] α -LNA nelle singole classi lipidiche.

Al fine di valutare come LA e α -LNA si convertano nei loro derivati più insaturi ed a più lunga catena nelle singole classi lipidiche, viene valutata la radioattività associata ai diversi acidi grassi, in HPLC, dopo separazione mediante TLC monodimensionale con lastre di silice preparate in laboratorio utilizzando silice H-R e H₂O (30:70). Dopo asciugatura le lastre vengono prelevate utilizzando come fase mobile CHCl₃/MeOH (4:1). Insieme ai campioni da analizzare (circa 600000 cpm per ciascuno), marcati con LA o α -LNA, vengono seminati standards di riferimento per ogni lipide da identificare. La lastrina viene posta in una camera di eluizione satura di solvente, utilizzando come fase mobile una miscela di esano/etere dietilico/acido acetico (70:30:1.5). Quest'ultimo, correndo verso l'alto, trascina i lipidi in base alla loro polarità. Terminata la corsa i solventi vengono fatti evaporare e la lastrina esposta ai vapori di iodio per evidenziare i lipidi separati (PL, TG, DAG, CE, FFA). Le

bande vengono raccolte e si procede poi alla transmetilazione degli AG come descritto precedentemente.

I metilesteri dei diversi AG di ogni classe lipidica vengono infine analizzati in HPLC associato a un detector per la radioattività con le modalità precedentemente descritte.

9. Espressione degli enzimi $\Delta 6$ e $\Delta 5$ desaturasi.

L'espressione di $\Delta 6$ e $\Delta 5$ desaturasi viene valutata mediante estrazione dell'RNA dalle cellule e successiva retrotrascrizione e Real-time PCR (Ris  et al. 2007).

L'RNA totale viene estratto dalle cellule mediante l'utilizzo del Total RNA Isolation System (Promega Italia, Italy); viene poi retrotrascritto a cDNA con l'uso del Thermoscript TM RT-PCR System (Life Technologies). Per la Real-Time PCR si utilizza il Kit enzimatico con PLATINUM quantitative PCR SUPERMIX-UDG (Life Technologies). I primer utilizzati, relativi al gene della $\Delta 6$ desaturase sono: primer forward 5'-TGG ATT CCT ACC CTC ATC A-3' e primer reverse 5'-CCA TAA TCA TGT TGC AGC CA-3'; TaqMan probe 5'-CTA CCT CTC AGG CCC AAG CTG G-3'; quelli relativi alla $\Delta 5$ desaturasi sono: primer forward 5'-GAA TAA AGA GCT GAC AGA TGA GTT-3' e primer reverse 5'-AGC AGG AAG AAG ACA TGG TTG-3'; TaqMan probe 5'-CTA CCT CTC AGG CCC AAG CTG G-3'. I livelli di cDNA di $\Delta 5$ e $\Delta 6$ desaturasi vengono normalizzati con l'uso della β -actina come housekeeping gene (primer forward 5'-GAC CTG ACT GAC TAC CTC AT-3' e primer reverse 5'-CTC CTT AAT GTC ACG CAC GA-3'; TaqMan probe 5'-CGG CTA CAG CTT CAC CAC CAC GG-3').

La multiplex RT-Real Time PCR viene poi effettuata con iCycler IQTM Multi-Color Detection system (Bio-Rad).

10. Preparazione dei complessi LA-BSA e DHA-BSA.

Per la preparazione dei complessi LA-BSA e DHA-BSA, 5 mg di AG vengono ripresi in 5.5 ml di esano. La soluzione dell'acido grasso viene poi mescolata con 35 mg di celite e portata poi a secco sotto flusso di azoto al buio e sotto agitazione. Una volta a secco, si lascia essicare ancora per 30 minuti sotto vuoto.

Nel frattempo si prepara una soluzione di BSA (Bovine Serum Albumine) Fatty Acid Free come segue:

- Soluzione 1: tampone fosfato 160 mM:
 - a) 2.848 g Na₂HPO₄ in 100 ml di H₂O
 - b) 2.177 g KH₂PO₄ in 100 ml di H₂OUnire la soluzione a) e la soluzione b) e controllare che il pH sia 7.4.
- Soluzione 2: 1.356 g NaCl + 60 mg MgSO₄ x 7 H₂O + 74 mg KCl
- Soluzione 3: 20 ml di Soluzione 1 + 180 ml H₂O + Soluzione 2.

A questo punto si pesano 500 mg di BSA Fatty Acid Free e si portano in soluzione con 30 ml di Soluzione 3. La soluzione di BSA avrà una concentrazione 1.51 mM.

Si aggiungono quindi 5 ml di soluzione di BSA all'AG essicato e si lascia in agitazione per 30 minuti sotto flusso di azoto. Si centrifuga poi per 5 minuti a 2500 rpm e si lascia in freezer per almeno 1h per far precipitare la celite. Si preleva infine la fase superiore contenente il complesso; un'aliquota (100 µl) viene estratta con 5 ml di CHCl₃/MeOH 2:1 + 1 ml KCl 0.88% e successiva

transmetilazione con standard interno per verificare la concentrazione del complesso, mentre il resto della soluzione viene filtrato con filtro da 0.22 μm per il trattamento delle cellule.

11. Incorporazione dei complessi LA-BSA e DHA-BSA nei lipidi totali.

Al fine di valutare l'incorporazione di LA e DHA nei lipidi totali delle cellule S1 e AS3, dopo trattamento con i complessi LA-BSA e DHA-BSA, vengono estratti i lipidi totali come descritto precedentemente (Folch et al. 1957) e si procede poi alla transmetilazione degli AG. 1 μL dell'estratto viene poi iniettato al gas-cromatografo con l'utilizzo di standard interno per l'analisi quantitativa.

12. Incorporazione dei complessi LA-BSA e DHA-BSA nelle singole classi lipidiche.

Al fine di valutare come LA e DHA si incorporano nelle singole classi lipidiche, dopo trattamento con i complessi LA-BSA e DHA-BSA, una volta estratti i lipidi totali col metodo di Folch, vengono separate le singole classi lipidiche (fosfolipidi, trigliceridi, diacilgliceroli, esteri del colesterolo e acidi grassi liberi) mediante TLC monodimensionale (thin layer chromatography), utilizzando lastre di silice-gel 60 R e come fase mobile una miscela di esano/etere dietilico/acido acetico (70:30:1.5). Per ogni campione vengono seminati circa 300-400 μg e a parte vengono seminati standard di riferimento per le diverse classi lipidiche. La lastra viene posta in una camera di eluizione satura di solvente. Quest'ultimo, correndo verso l'alto, trascina i lipidi in base alla loro polarità.

Terminata la corsa i solventi vengono fatti evaporare e la lastrina esposta ai vapori di iodio per evidenziare i lipidi separati (PL, TG, DAG, CE, FFA). Le bande relative a PL, TG e CE vengono raccolte, poste in vials da metilazione, e si procede poi alla transmetilazione degli AG come descritto precedentemente. I metilesteri dei diversi AG di ogni classe lipidica vengono infine analizzati al gas-cromatografo con le modalità precedentemente descritte.

RISULTATI

1. Analisi della composizione in acidi grassi delle cellule S1/AS3.

	S1	AS3
	% relativa	% relativa
16:0	22,20 ± 1,33	20,33 ± 1,33 **
18:0	12,46 ± 0,81	15,07 ± 1,69 ***
20:0	0,35 ± 0,11	0,37 ± 0,09
22:0	0,85 ± 0,10	1,31 ± 0,13 ***
24:0	2,02 ± 0,57	3,51 ± 0,53 ***
16:1	7,84 ± 0,73	5,46 ± 0,53 ***
18:1 n-9	29,80 ± 1,08	33,27 ± 1,89 ***
18:1 n-7	8,78 ± 1,21	5,21 ± 0,93 ***
20:1	0,56 ± 0,09	0,46 ± 0,07 **
22:1	0,11 ± 0,03	0,12 ± 0,09
24:1	1,38 ± 0,25	1,14 ± 0,28 *
20:3 n-9	1,54 ± 0,33	2,81 ± 1,37 **
18:2 n-6	1,11 ± 0,30	0,84 ± 0,36 *
18:3 n-6	0,08 ± 0,06	0,06 ± 0,02
20:3 n-6	0,71 ± 0,16	0,62 ± 0,26
20:4 n-6	5,21 ± 0,52	4,86 ± 0,94
22:4 n-6	0,65 ± 0,19	0,58 ± 0,17
22:5 n-6	0,46 ± 0,30	0,36 ± 0,29
18:3 n-3	0,16 ± 0,08	0,08 ± 0,05 **
20:5 n-3	0,60 ± 0,11	0,56 ± 0,14
22:5 n-3	1,10 ± 0,32	1,04 ± 0,24
22:6 n-3	2,03 ± 0,35	1,76 ± 0,29 *
SATURI	42,77 ± 11,36	44,32 ± 9,36
MONOINSATURI	43,58 ± 11,20	41,92 ± 9,83
POLIINSATURI	13,63 ± 1,12	13,72 ± 1,25
INDICE DI INSATURAZIONE	99,69 ± 12,06	97,35 ± 8,03
n-6 HUFA	7,04 ± 0,75	6,42 ± 1,44
n-3 HUFA	3,73 ± 0,63	3,5 ± 0,58
n-3 HUFA index %	34,61 ± 4,73	35,7 ± 4,58
DHGLA/LA	0,65 ± 0,07	0,73 ± 0,16
AA/LA	4,93 ± 1,10	6,22 ± 2,11 *
AA/DHGLA	7,55 ± 1,26	8,83 ± 3,04
EPA/α-LNA	4,70 ± 2,68	10,44 ± 8,17 *
DHA/ α-LNA	17,18 ± 11,06	34,10 ± 21,08 *

Tabella 1. Profilo in acidi grassi delle cellule S1/AS3. I dati sono espressi come media±ES. * p < 0.05; ** p < 0.01; * p < 0,001.**

Come si può osservare in tabella 1, le cellule AS3 presentano livelli più bassi di LA, α -LNA e DHA rispetto alle S1 e livelli invece più alti di 20:3 n-9 (Mead acid), che è un indice di carenza di acidi grassi essenziali. Di conseguenza anche i rapporti EPA/ α -LNA, AA/LA e DHA/ α -LNA sono più elevati nelle cellule AS3 rispetto alle S1. Questi rapporti sono indice dell'efficienza di conversione dei precursori nei loro derivati a lunga catena.

2. Conversione di [1-¹⁴C] LA e attività desaturasica in cellule S1/AS3.

L'acido linoleico viene convertito nei suoi derivati più insaturi e a più lunga catena, in particolare a 18:3, 20:3, 20:4 e 22:4. Come mostrato in figura 1, la conversione di [1-¹⁴C] LA è di circa il 28,5% nelle cellule controllo (S1) mentre nelle cellule FC (AS3) è maggiore, essendo il 36,5% circa.

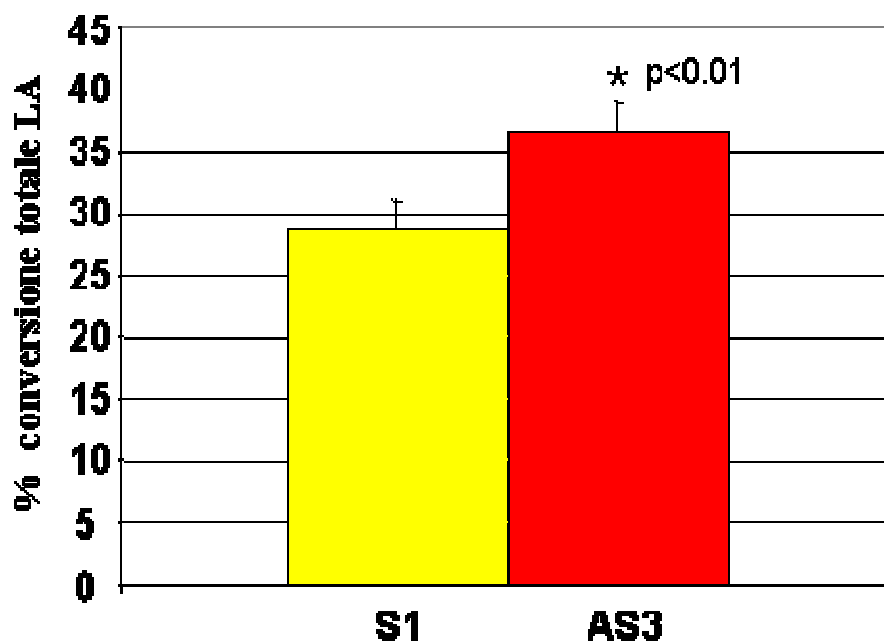


Figura 1. Conversione di [1-¹⁴C] LA (18:2 n-6) in cellule S1/AS3. I dati sono espressi come media±ES.

L'aumentata conversione dell'acido linoleico nelle cellule AS3 è associato ad una più elevata attività degli enzimi di desaturazione, $\Delta 6$ e $\Delta 5$ desaturasi, espressa come rapporto prodotto/precursore (18:3/18:2 n-6 per la $\Delta 6$ desaturasi e 20:4/20:3 per la $\Delta 5$ desaturasi) (figura 2). In particolare, per quanto riguarda la $\Delta 6$ desaturasi, l'attività è $0,030\pm 0,003$ nelle cellule S1 mentre è significativamente più elevata nelle AS3 ($0,077\pm 0,007$); l'attività della $\Delta 5$ desaturasi è $0,839\pm 0,112$ nelle S1 e $0,956\pm 0,109$ nelle AS3.

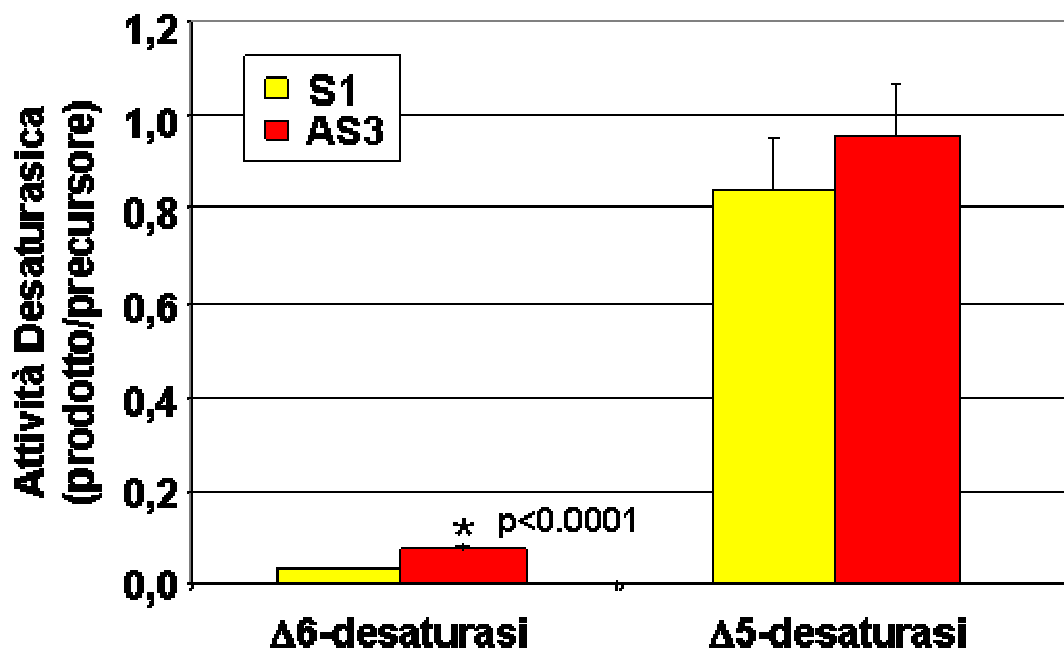


Figura 2. Attività desaturasica in cellule S1/AS3 incubate con $[1-^{14}\text{C}]$ LA. I dati sono espressi come media \pm ES.

L'aumentata conversione dell'acido linoleico nelle cellule AS3 è dovuta ad un aumento dei livelli dei suoi metaboliti più insaturi e a più lunga catena (fig. 3), in particolare dei livelli significativamente più elevati di acido γ -linolenico (18:3 n-6) e di acido arachidonico (20:4 n-6), rispettivamente di $4,76\pm 0,31\%$ e $16,25\pm 1,35\%$. Nelle S1 invece tali livelli sono più bassi: $2,26\pm 0,23\%$ per l'acido γ -linolenico e $11,67\pm 1,71$ per l'acido arachidonico. Nelle cellule AS3 vi è inoltre un aumento non significativo anche del 20:3 n-6, mentre non vi sono differenze per quanto riguarda i livelli di 22:4 n-6.

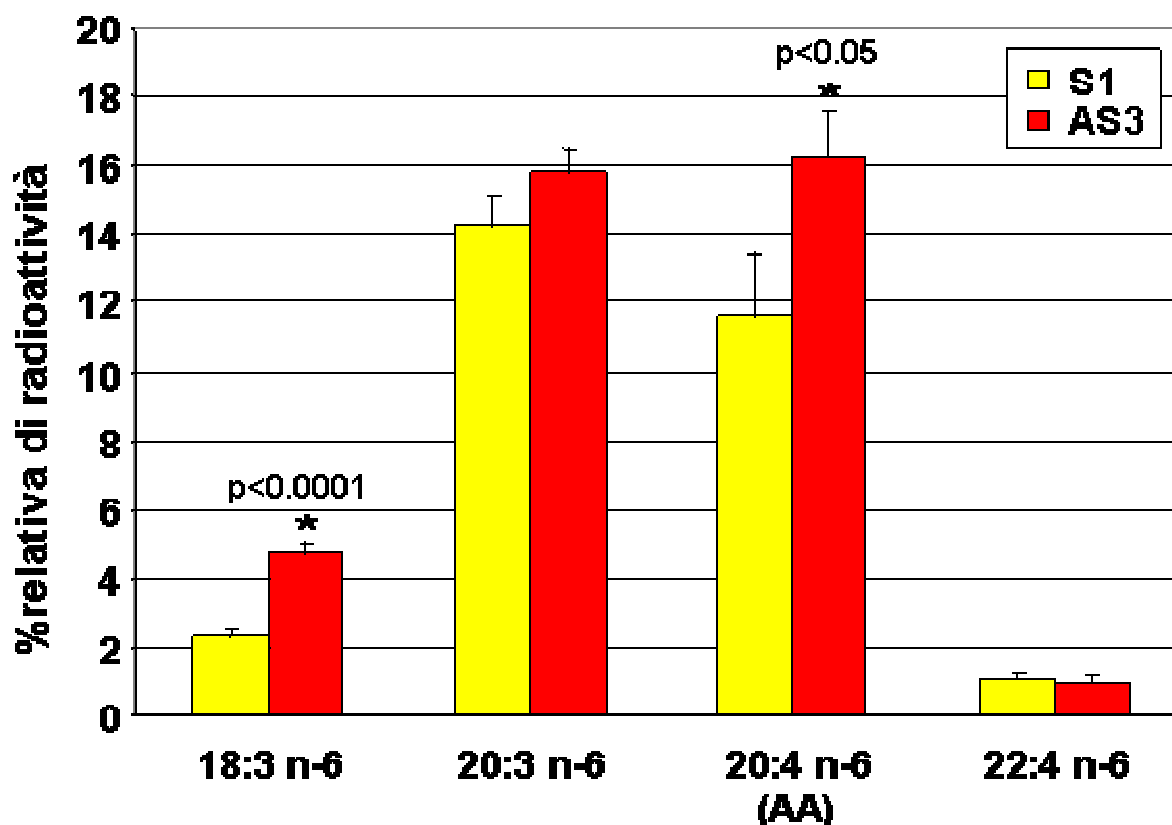


Figura 3. Percentuale relativa di radioattività associata ai diversi acidi grassi, in cellule S1/AS3 incubate con [1-¹⁴C] LA. I dati sono espressi come media±ES.

Come mostrato in tabella 2, nelle cellule AS3 (cellule FC) vi è una diversa incorporazione di [1-¹⁴C] LA nelle diverse classi lipidiche rispetto alle cellule S1 (cellule controllo).

	S1	AS3
PL	91.64 ± 2.48	94.83 ± 3.17 *
DAG+MG+CHO	2.70 ± 1.25	2.53 ± 2.05
FFA	0.77 ± 0.24	0.68 ± 0.22
TG	3.75 ± 1.06	1.75 ± 0.83 **
CE	1.14 ± 0.19	0.21 ± 0.21 **

Tabella 2. Incorporazione di [1-¹⁴C] LA nelle diverse classi lipidiche, in cellule S1/AS3. I dati sono espressi come media ± ES. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

In particolare si osserva una più elevata incorporazione di acido linoleico nei fosfolipidi delle cellule AS3 e contemporaneamente una riduzione nei trigliceridi e negli esteri del colesterolo.

E' stata infine analizzata la conversione di LA marcato ai suoi derivati più insaturi e a più lunga catena nelle singole classi lipidiche.

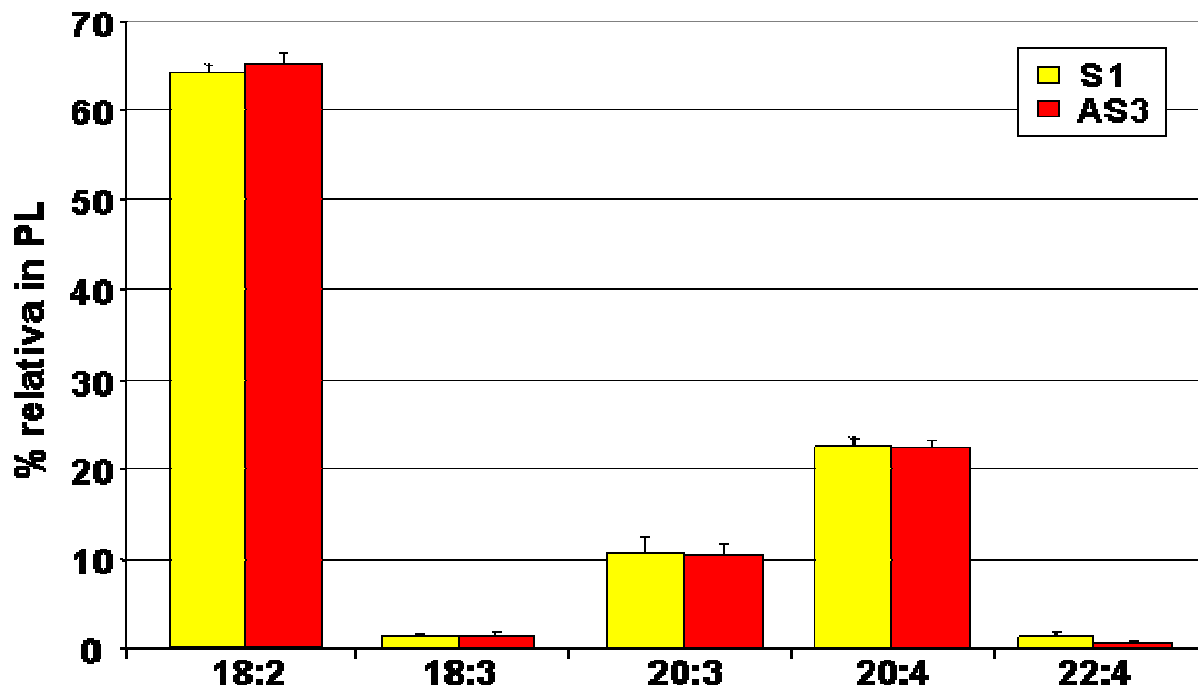


Figura 4. Percentuale relativa di radioattività associata ai diversi acidi grassi nei PL di cellule S1/AS3 incubate con $[1-^{14}\text{C}]$ LA. I dati sono espressi come $\text{media} \pm \text{ES}$.

Come si osserva in figura 4, non vi sono differenze significative per quanto riguarda la conversione di LA marcato nei PL delle cellule S1 e AS3. La conversione di LA è circa il 35% nei PL, mentre è l'80-85% nei TG (dati non mostrati). Poichè i CE rappresentano solo una minima percentuale dei LT sia nelle cellule S1 che nelle AS3, i livelli degli AG derivati dalla conversione di LA marcato nei CE non è rilevabile.

3. Conversione di [1-¹⁴C] α-LNA e attività desaturasica in cellule S1/AS3.

L'acido α-linolenico viene convertito nei suoi derivati più insaturi e a più lunga catena, in particolare a 18:4, 20:3, 20:4, 20:5, 22:5 e 22:6. Come mostrato in figura 5, la conversione di [1-¹⁴C] α-LNA è circa l'83% nelle cellule controllo (S1) mentre è significativamente più elevata nelle cellule FC (AS3) (92,5% circa).

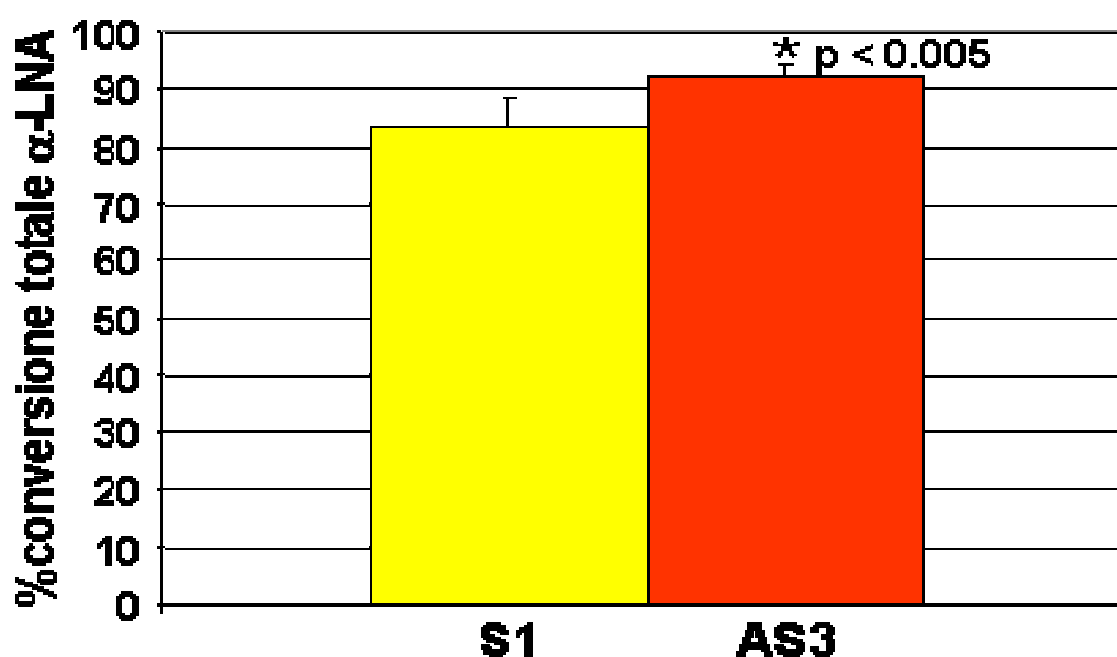


Figura 5. Conversione di [1-¹⁴C] α-LNA (18:3 n-3) in cellule S1/AS3. I dati sono espressi come media ± ES.

L'aumentata conversione di acido α-linolenico nelle cellule AS3 è associato ad una più elevata attività degli enzimi desaturasici, espressa come rapporto prodotto/precursore (18:4/18:3 n-3 per la Δ6 desaturasi e 20:5/20:4 per la Δ5 desaturasi) (figura 6).

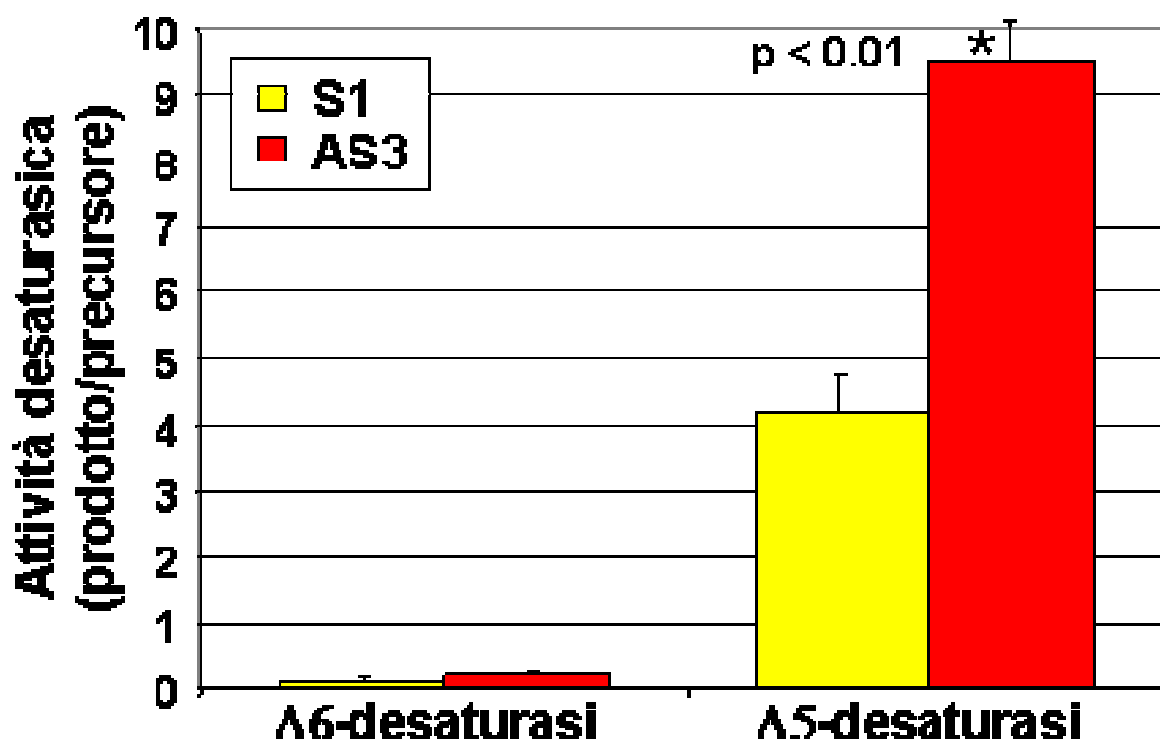


Figura 6. Attività desaturasica in cellule S1/AS3 incubate con $[1-^{14}\text{C}] \alpha$ -LNA. I dati sono espressi come media \pm ES.

In particolare, l'attività della $\Delta 6$ desaturasi è $0,126 \pm 0,038$ nelle cellule S1 mentre nelle AS3 è $0,197 \pm 0,079$; l'attività della $\Delta 5$ desaturasi invece è $4,180 \pm 1,292$ nelle S1 mentre è significativamente più elevata nelle cellule AS3 ($9,535 \pm 3,100$).

Come si vede in figura 7, la più alta conversione dell'acido α -linolenico nelle cellule AS3 rispetto alle S1 è dovuta ad un aumento significativo dei soli livelli di EPA (20:5 n-3), essendo il $40,37 \pm 1,90\%$ nelle S1 e $64,30 \pm 2,12\%$ nelle AS3, mentre i livelli degli altri derivati più insaturi e a più lunga catena sono significativamente più bassi, compresi i livelli di DHA (22:6 n-3), rispettivamente di $1,62 \pm 0,42\%$ nelle S1 e $0,51 \pm 0,10$ nelle AS3.

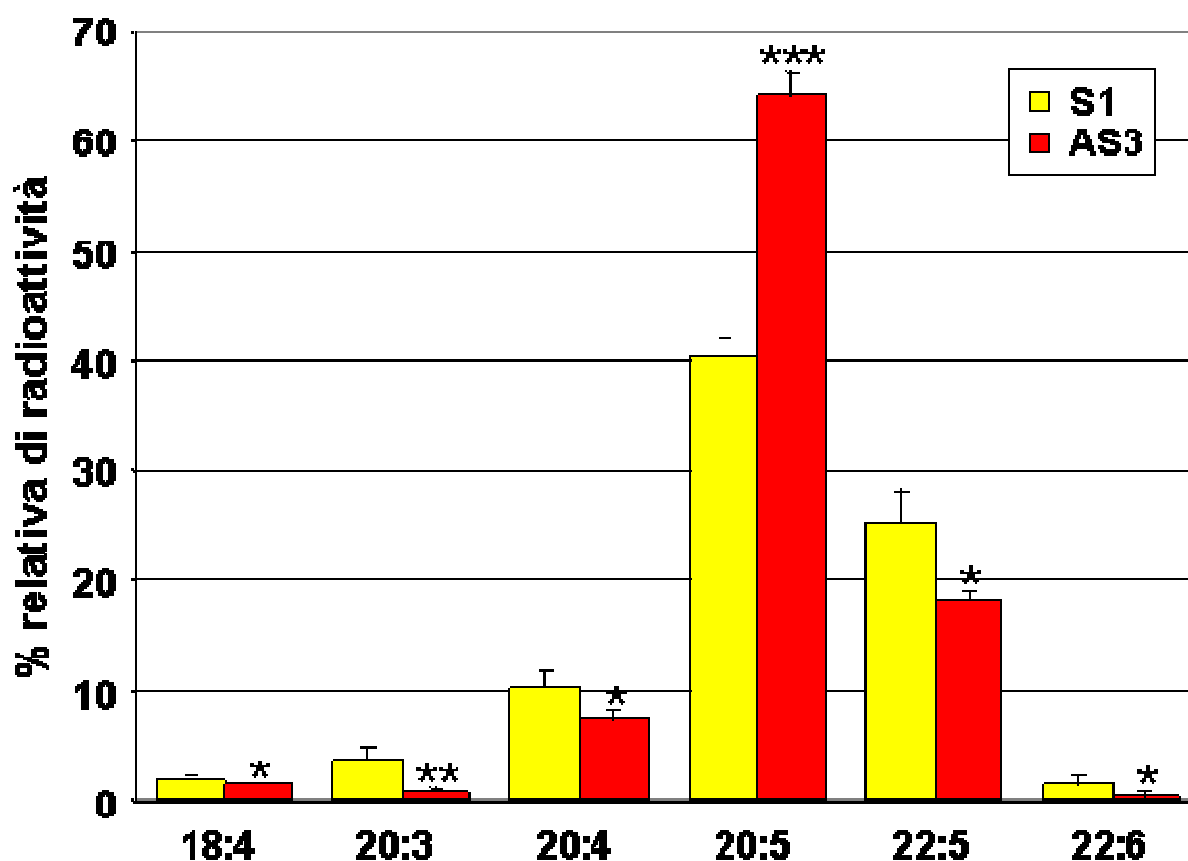


Figura 7. Percentuale relativa di radioattività associata ai diversi acidi grassi, in cellule S1/AS3 incubate con $[1-^{14}\text{C}] \alpha\text{-LNA}$.

I dati sono espressi come media \pm ES. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Come mostrato in tabella 3, nelle cellule AS3 (cellule FC) vi è una diversa incorporazione di $[1-^{14}\text{C}] \alpha\text{-LNA}$ nelle diverse classi lipidiche rispetto alle cellule S1 (cellule controllo), in analogia con quanto osservato per l'incorporazione di $[1-^{14}\text{C}] \text{LA}$.

	S1	AS3
PL	90.63 \pm 3.92	96.30 \pm 0.58 **
DAG+MG+CHO	1.71 \pm 0.20	1.76 \pm 0.33
FFA	0.53 \pm 0.09	0.38 \pm 0.03 ***
TG	3.63 \pm 1.37	1.32 \pm 0.32 ***
CE	3.50 \pm 2.82	0.24 \pm 0.03 *

Tabella 3. Incorporazione di $[1-^{14}\text{C}] \alpha\text{-LNA}$ nelle diverse classi lipidiche, in cellule S1/AS3. I dati sono espressi come media \pm ES. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

In particolare si osserva una più elevata incorporazione di acido α -linolenico nei fosfolipidi delle cellule AS3 mentre l'incorporazione è più bassa nei trigliceridi, negli esteri del colesterolo e negli acidi grassi liberi.

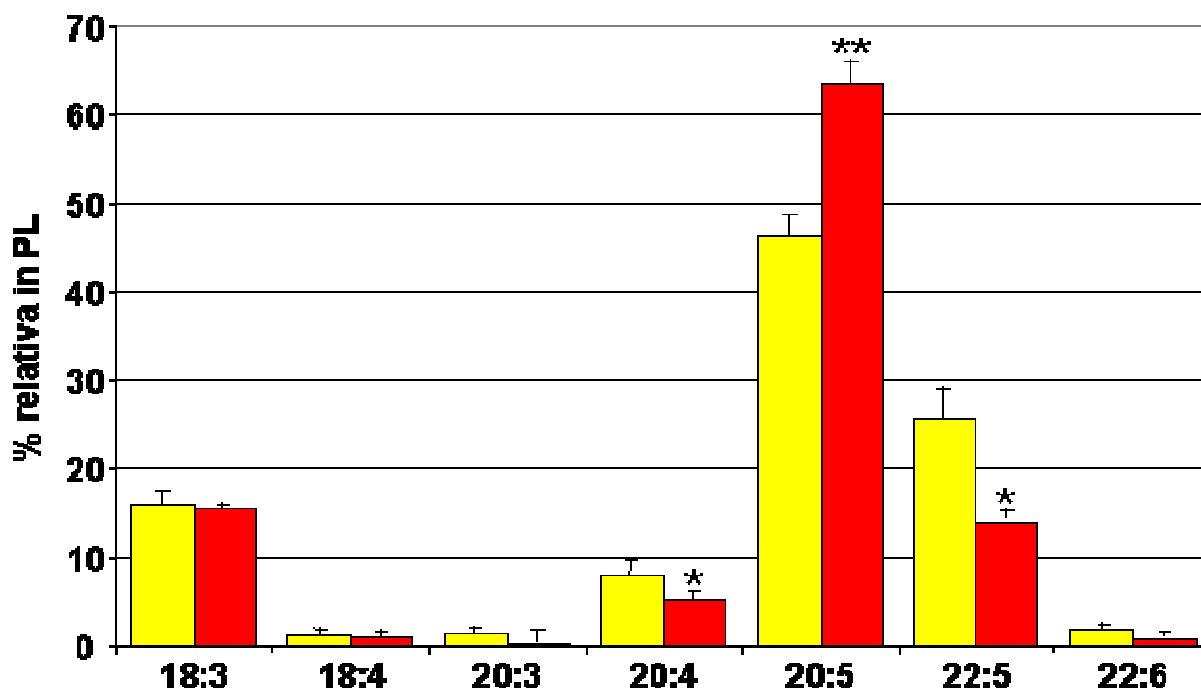


Figura 8. Percentuale relativa di radioattività associata ai diversi acidi grassi nei PL di cellule S1/AS3 incubate con $[1-^{14}\text{C}]$ α -LNA. I dati sono espressi come media \pm ES.

Come si osserva in figura 8, nei PL delle cellule AS3 vi sono livelli più elevati di EPA, mentre quelli di 20:4 e 22:5 sono più bassi rispetto alle cellule S1. Non vi sono comunque differenze significative nella conversione totale di α -LNA tra le cellule AS3 e le S1: la conversione di α -LNA è circa l'85% nei PL e il 33-36% nei TG (dati non mostrati). Poichè i CE rappresentano solo una minima percentuale dei LT sia nelle cellule S1 che nelle AS3, i livelli degli AG derivati dalla conversione di α -LNA nei CE non è rilevabile.

4. Espressione di $\Delta 6$ e $\Delta 5$ desaturasi

Per comprendere se la più elevata conversione di acido linoleico e α -linolenico nei loro derivati più insaturi e a più lunga catena fosse dovuta oltre che ad un'aumentata attività anche ad una più alta espressione dei geni che codificano per gli enzimi desaturasici, è stata valutata l'espressione di $\Delta 6$ e $\Delta 5$ desaturasi. Come mostrato in figura 9, nelle cellule AS3 si osserva una più elevata espressione sia della $\Delta 6$ che della $\Delta 5$ desaturasi rispetto alle S1 (poste uguali a 1), anche se questa differenza è significativa solo per la $\Delta 6$. In particolare, l'espressione della $\Delta 6$ desaturasi è circa il 50% più elevata nelle AS3 rispetto alle S1, mentre l'espressione della $\Delta 5$ desaturasi è circa il 20% più alta.

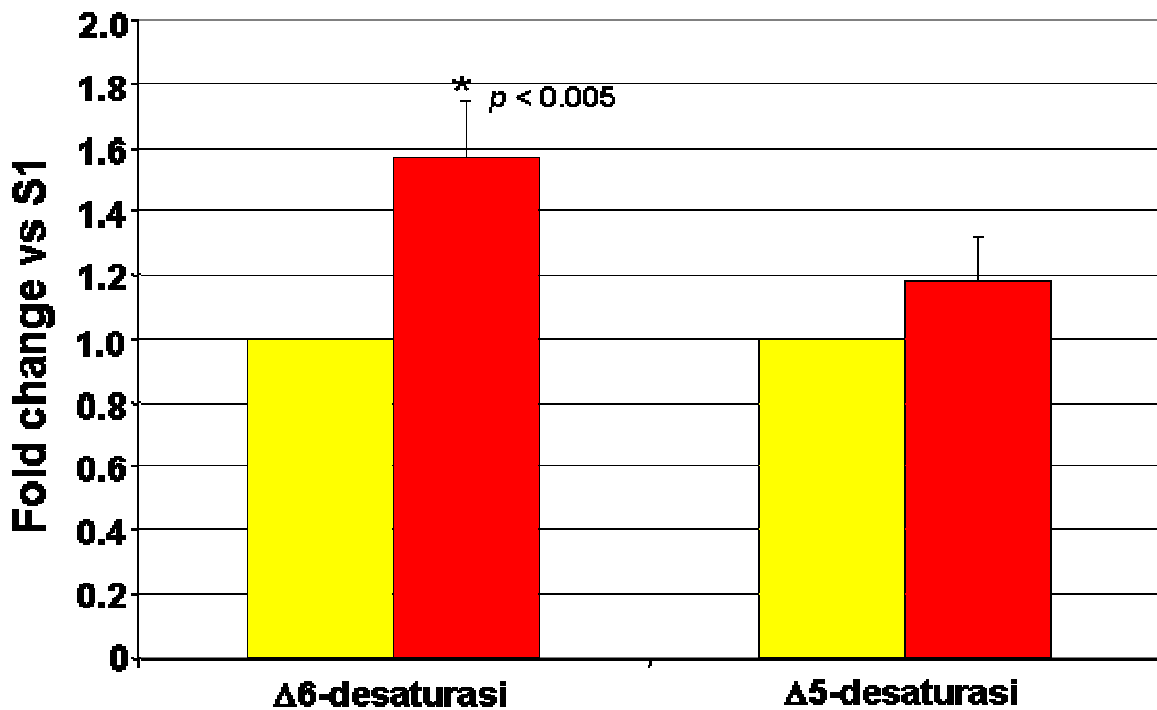


Figura 9. Espressione di $\Delta 6$ e $\Delta 5$ desaturasi.

5. Effetto del trattamento con concentrazioni crescenti di complesso LA-BSA sul metabolismo degli acidi grassi in cellule S1/AS3.

Per studiare se il trattamento con LA potesse portare ad un miglioramento delle alterazioni del metabolismo lipidico osservate nella FC, le cellule sono state trattate con concentrazioni crescenti di complesso LA-BSA e se ne è valutata l'incorporazione nei lipidi totali.

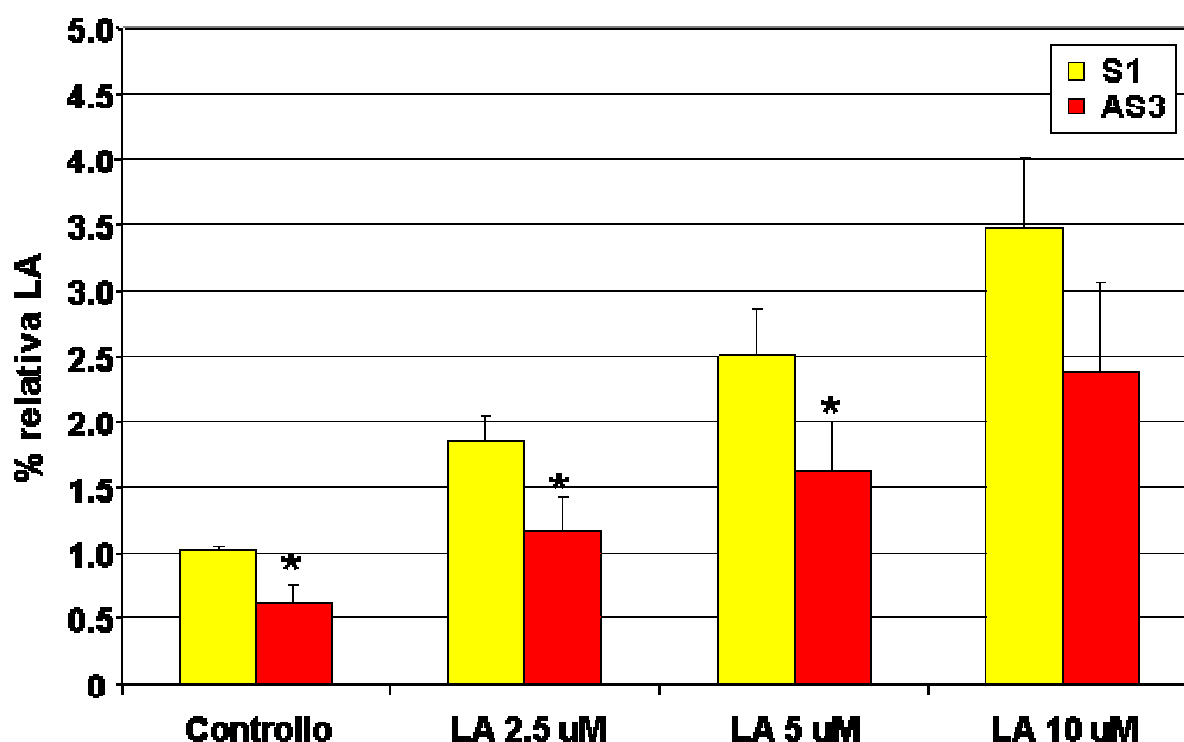


Figura 10. Percentuale relativa di LA incorporata nei LT dopo trattamento con concentrazioni crescenti di complesso LA-BSA in cellule S1/AS3.

I dati sono espressi come media \pm ES. * $p < 0.05$.

Come si può osservare in figura 10, quando le cellule sono trattate con concentrazioni crescenti di complesso LA-BSA, entrambe le linee cellulari incorporano l'acido linoleico in modo dose dipendente, ma le cellule AS3 incorporano meno delle S1 a tutte le dosi utilizzate. In particolare la % relativa di LA nei LT delle S1, dopo analisi gas-cromatografica, è $1,02 \pm 0,03\%$ nel campione non trattato, mentre alla più alta concentrazione di complesso

utilizzata è $3,47 \pm 0,54\%$. Nelle cellule AS3 invece la % di LA è $0,62 \pm 0,15$ nel campione controllo (cellule non trattate) e alla più alta concentrazione utilizzata (LA-BSA $10 \mu\text{M}$) è $2,38 \pm 0,76\%$.

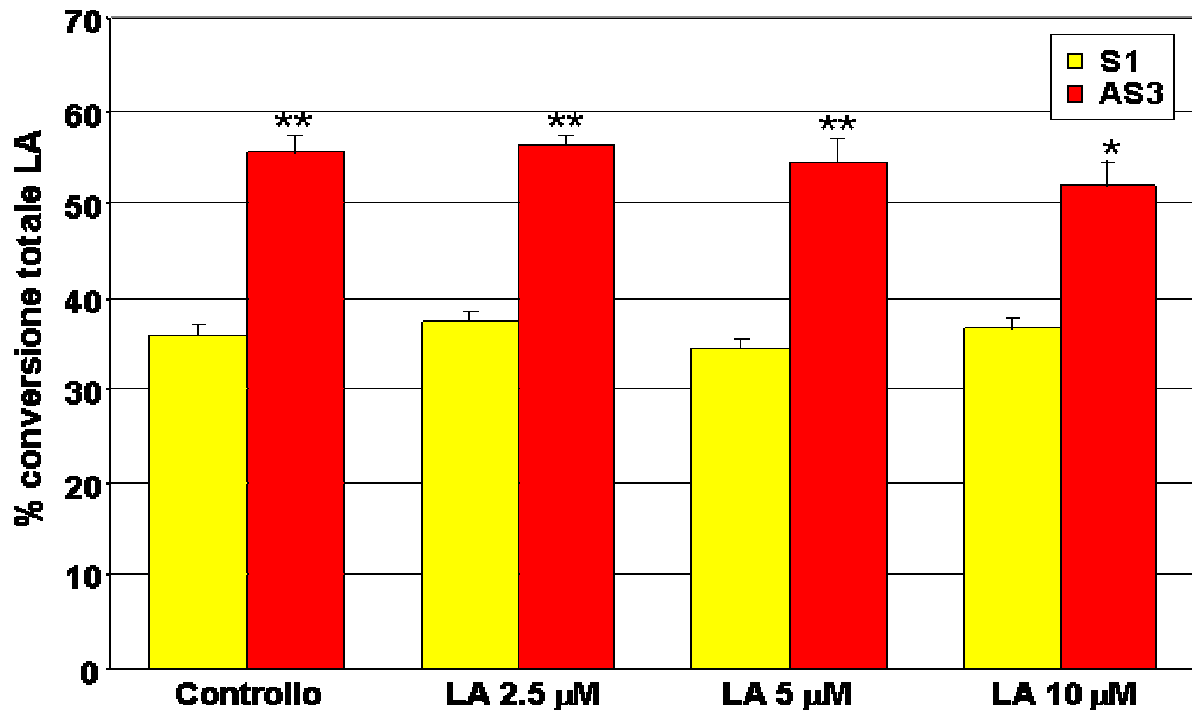


Figura 11. Conversione di $[1-^{14}\text{C}]$ LA (18:2 n-6) in cellule S1/AS3 trattate con concentrazioni crescenti di complesso LA-BSA.

I dati sono espressi come media \pm ES. * $p < 0,01$; ** $p < 0,001$.

Quando invece le cellule sono trattate con concentrazioni crescenti di complesso LA-BSA e incubate contemporaneamente con $[1-^{14}\text{C}]$ LA come tracciante, la conversione dell'acido linoleico radioattivo, valutata in HPLC associato a detector per la radioattività, è sempre più alta nelle cellule AS3 rispetto alle S1 (figura 11), ma non vi sono differenze significative tra le varie concentrazioni di complesso LA-BSA utilizzate. Infatti la % di conversione totale di LA nelle S1 è di circa 35 -38%, mentre nelle AS3 è compresa tra 52 e 58% a tutte le dosi di complesso.

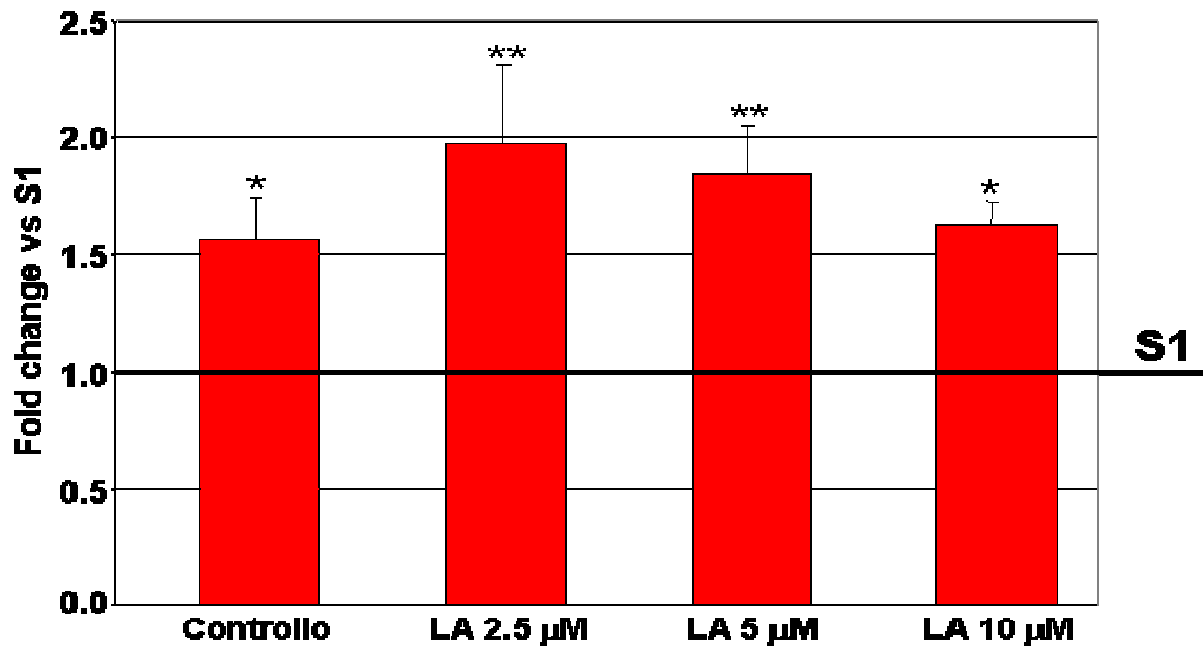


Figura 12. Espressione di $\Delta 6$ desaturasi in cellule S1/AS3 trattate con concentrazioni crescenti di complesso LA-BSA.

I dati sono espressi come media \pm ES. * $p < 0.01$; ** $p < 0.001$.

In figura 12 si può osservare che l'espressione della $\Delta 6$ desaturasi, espressa come fold change vs S1, è più elevata nelle cellule AS3 rispetto alle S1 per tutte le concentrazioni di complesso utilizzate.

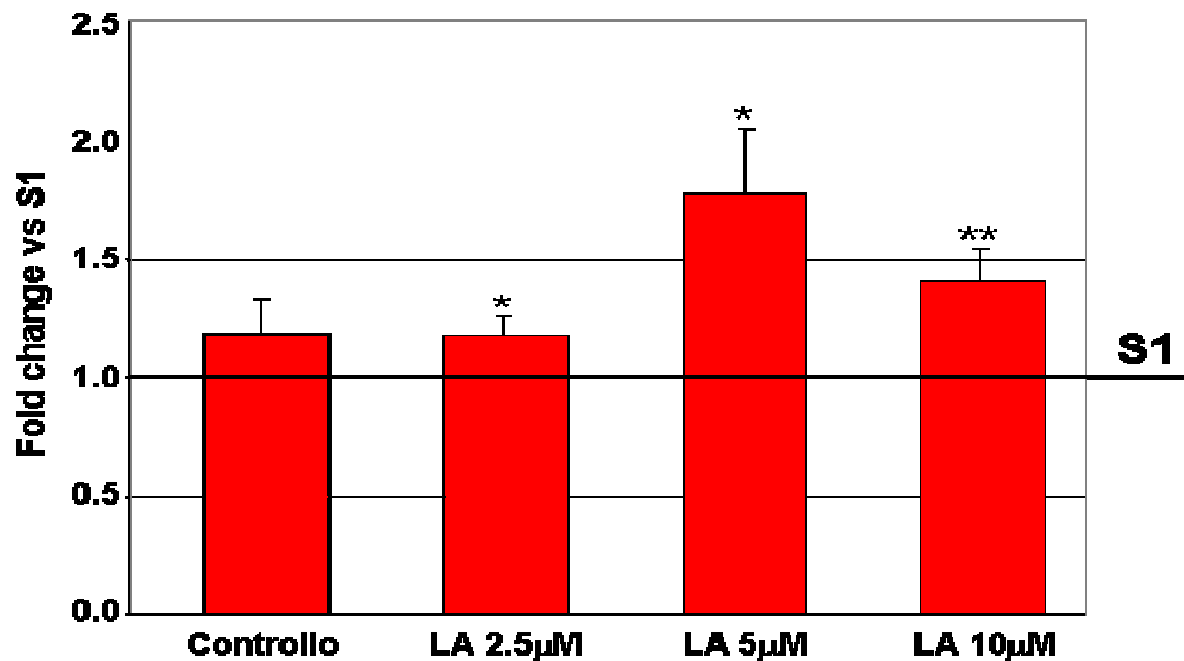


Figura 13. Espressione di $\Delta 5$ desaturasi in cellule S1/AS3 trattate con concentrazioni crescenti di complesso LA-BSA.

I dati sono espressi come media \pm ES. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

Analogamente, anche l'espressione della $\Delta 5$ desaturasi è sempre più elevata nelle cellule AS3 rispetto alle S1 a tutte le concentrazioni di complesso utilizzate (figura 13).

In tabella 4 vengono riportate le percentuali relative di alcuni acidi grassi associati ai fosfolipidi delle cellule S1/AS3 dopo trattamento con concentrazioni crescenti di complesso LA-BSA. Come si può osservare anche nei fosfolipidi, come nei lipidi totali, i livelli di LA dei campioni controllo sono significativamente più bassi nelle cellule AS3 rispetto alle S1 e, di conseguenza, il rapporto AA/LA è più elevato nelle AS3.

		Controllo	LA-BSA 2.5 μM	LA-BSA 5 μM	LA-BSA 10 μM
LA	S1	1,26 \pm 0,15	1,55 \pm 0,31	1,89 \pm 0,23	2,47 \pm 0,24
	AS3	0,61 \pm 0,01*	1,12 \pm 0,21	1,57 \pm 0,31	1,64 \pm 0,22
AA	S1	3,59 \pm 0,74	3,69 \pm 0,50	3,66 \pm 0,67	4,10 \pm 0,59
	AS3	3,40 \pm 0,05	3,86 \pm 0,06	4,05 \pm 0,10	4,31 \pm 0,11
AA/LA	S1	2,81 \pm 0,26	2,55 \pm 0,84	2,01 \pm 0,60	1,70 \pm 0,41
	AS3	5,61 \pm 0,21**	3,58 \pm 0,63	2,66 \pm 0,47	2,67 \pm 0,29

Tabella 4. Composizione in acidi grassi dei fosfolipidi delle cellule S1/AS3 dopo trattamento con concentrazioni crescenti di complesso LA-BSA. I dati sono espressi come media \pm ES. * è significativamente diverso da S1 per $p < 0,05$; ** è significativamente diverso da S1 per $p < 0,01$.

Quando le cellule sono trattate con concentrazioni crescenti di complesso LA-BSA, i fosfolipidi incorporano LA in modo dose dipendente, ma le S1 incorporano maggiormente rispetto alle AS3 a tutte le concentrazioni utilizzate. Per quanto riguarda l'AA, aumentando le concentrazioni di complesso vi è un aumento dei livelli di AA, più elevato nelle AS3; tale variazione è associata ad un più elevato rapporto AA/LA nelle AS3, indice di una maggiore conversione.

6. Effetto del trattamento con concentrazioni crescenti di complesso DHA-BSA sul metabolismo degli acidi grassi in cellule S1/AS3.

Analogamente a quanto visto per l'acido linoleico, le cellule sono state trattate con concentrazioni crescenti di complesso DHA-BSA, per studiare se il trattamento con DHA potesse portare ad un miglioramento delle alterazioni del metabolismo lipidico osservate nella FC.

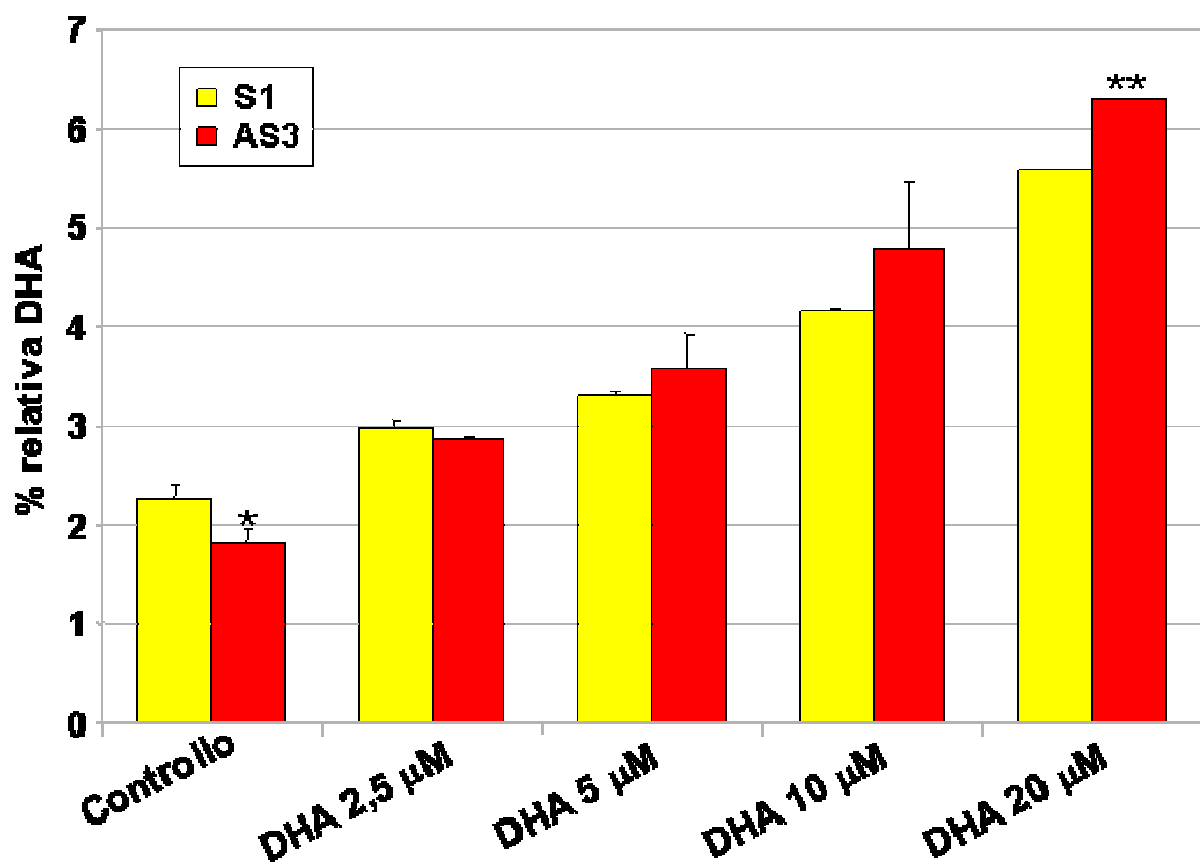


Figura 14. Percentuale relativa di DHA incorporato dopo trattamento con concentrazioni crescenti di complesso DHA-BSA in cellule S1/AS3. I dati sono espressi come media \pm ES. * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$.

Come si può osservare in figura 14, nelle cellule non trattate i livelli di DHA, analizzati tramite gas-cromatografia, sono più bassi nelle cellule AS3 rispetto alle S1, come visto precedentemente. Il trattamento con il complesso DHA-BSA alle concentrazioni più basse (2,5 e 5 μM) riporta i livelli di DHA nelle AS3 a

livelli simili a quelli osservati nelle S1, mentre alla dose più alta utilizzata, i livelli di DHA sono significativamente più elevati nelle AS3 essendo $5,27 \pm 0,03\%$ e $6,29 \pm 0,02\%$ nelle S1 e nelle AS3 rispettivamente.

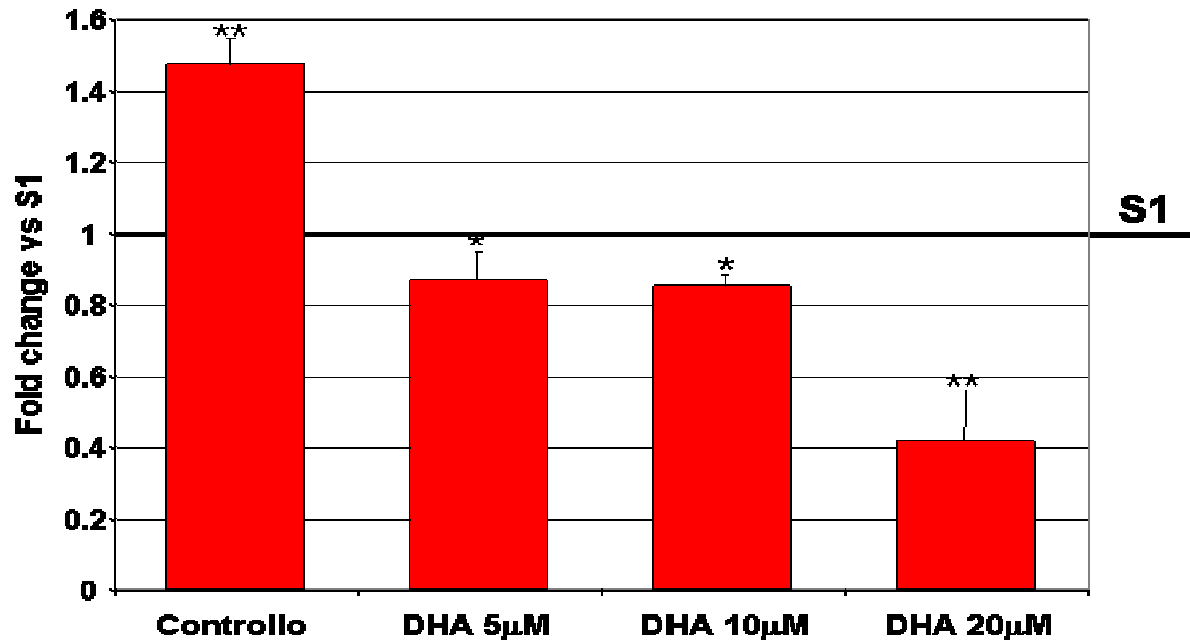


Figura 15. Espressione di $\Delta 6$ desaturasi in cellule S1/AS3 trattate con concentrazioni crescenti di complesso DHA-BSA. I dati sono espressi come media \pm ES. * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$.

Come già osservato, nelle cellule non trattate l'espressione della $\Delta 6$ desaturasi è significativamente più alta nelle cellule AS3 rispetto alle S1 (1,5 volte più elevata), ma quando le cellule sono trattate con dosi crescenti di complesso DHA-BSA, l'espressione della $\Delta 6$ desaturasi è più bassa nelle AS3 rispetto alle S1 a tutte le concentrazioni utilizzate (figura 15) e in particolare, alla dose più alta di complesso, è 0,42 volte più bassa.

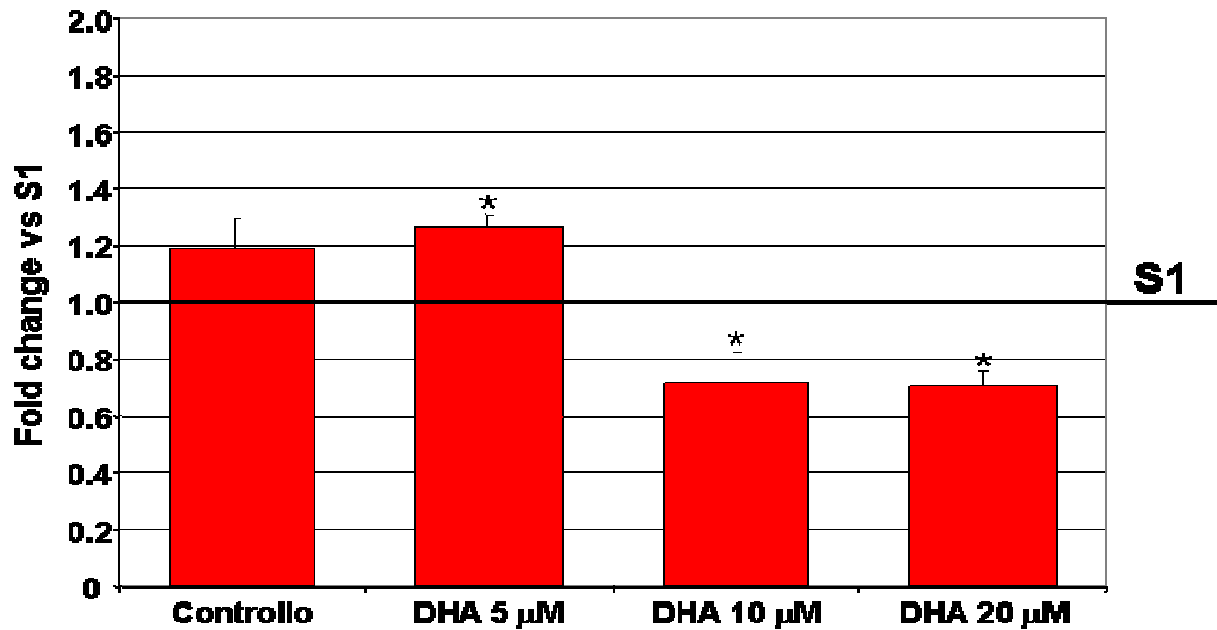


Figura 16. Espressione di $\Delta 5$ desaturasi in cellule S1/AS3 trattate con concentrazioni crescenti di complesso DHA-BSA. I dati sono espressi come media \pm ES. * $p < 0.05$.

Analogamente, l'espressione della $\Delta 5$ desaturasi è più elevata nelle cellule AS3 rispetto alle S1 come visto precedentemente, ma quando le cellule sono trattate con dosi crescenti di complesso DHA-BSA, alle più alte concentrazioni utilizzate l'espressione della $\Delta 5$ desaturasi è più bassa nelle AS3 rispetto alle S1 (figura 16), essendo 0,71 volte più bassa.

Infine è stata analizzata la composizione in acidi grassi dei PL delle cellule S1/AS3 dopo trattamento con concentrazioni crescenti di complesso DHA-BSA (tabella 5).

		Controllo	DHA-BSA 2.5 μ M	DHA-BSA 5 μ M	DHA-BSA 10 μ M	DHA-BSA 20 μ M
α-LNA	S1	0,26 \pm 0,00	0,27 \pm 0,01	0,27 \pm 0,01	0,27 \pm 0,01	0,26 \pm 0,00
	AS3	0,07 \pm 0,00***	0,07 \pm 0,00**	0,06 \pm 0,01**	0,06 \pm 0,01***	0,08 \pm 0,02**
EPA	S1	0,34 \pm 0,16	0,34 \pm 0,15	0,29 \pm 0,13	0,31 \pm 0,15	0,55 \pm 0,14
	AS3	0,51 \pm 0,11	0,53 \pm 0,15	0,54 \pm 0,12	0,42 \pm 0,04	0,52 \pm 0,10
DHA	S1	1,29 \pm 0,25	1,76 \pm 0,22	2,00 \pm 0,36	2,26 \pm 0,46	3,83 \pm 0,27
	AS3	1,10 \pm 0,02	1,76 \pm 0,16	2,00 \pm 0,35	2,24 \pm 0,26	2,46 \pm 0,22*
DHA/α-LNA	S1	4,98 \pm 0,93	6,59 \pm 1,16	7,40 \pm 1,68	8,50 \pm 1,75	14,82 \pm 1,85
	AS3	15,08 \pm 0,81**	23,44 \pm 1,99**	34,41 \pm 10,46	37,51 \pm 8,15*	31,80 \pm 2,15*
EPA/α-LNA	S1	1,32 \pm 0,62	1,30 \pm 0,62	1,09 \pm 0,54	1,18 \pm 0,57	2,14 \pm 0,60
	AS3	6,99 \pm 1,73*	6,99 \pm 1,99	9,41 \pm 3,21	6,91 \pm 0,01**	6,65 \pm 0,03**

Tabella 5. Composizione in acidi grassi dei fosfolipidi delle cellule S1/AS3 dopo trattamento con concentrazioni crescenti di complesso DHA-BSA. I dati sono espressi come media \pm ES. * è significativamente diverso da S1 per $p < 0,05$; ** è significativamente diverso da S1 per $p < 0,01$; * è significativamente diverso da S1 per $p < 0,001$.**

Come già osservato per i lipidi totali, anche i fosfolipidi delle cellule AS3 non trattate (Controllo) presentano livelli più bassi di α -LNA e DHA rispetto alle S1, e il trattamento con il complesso DHA-BSA non porta ad un cambiamento dei livelli di α -LNA e EPA, sia nelle S1 che nelle AS3. Il trattamento con il complesso porta invece ad un aumento dose dipendente dei livelli di DHA nei fosfolipidi di entrambe le linee cellulari, ma l'incremento è sempre maggiore nelle S1 rispetto alle AS3 a tutte le dosi utilizzate.

CONCLUSIONI e DISCUSSIONE

Mentre le alterazioni nei livelli degli AG circolanti e cellulari sono una caratteristica ben nota nella FC, il meccanismo alla base di queste alterazioni non è ancora stato chiaramente definito. Diverse ipotesi sono state fatte e il lavoro svolto ha fornito numerosi dati rivolti al chiarimento dei meccanismi dell'alterato metabolismo degli AG.

Dai risultati dello studio si può osservare che le cellule AS3 (con fenotipo FC) presentano livelli più bassi di LA e DHA, come rilevato anche nei pazienti FC (Freedman et al. 2004; Lloyd-Still. 1996), ed inoltre queste cellule hanno anche livelli più bassi di α -LNA mentre i livelli di Mead acid (20:3 n-9), considerato un indice della carenza di acidi grassi essenziali, sono più elevati. Di conseguenza, anche i rapporti AA/LA, EPA/ α -LNA e DHA/ α -LNA sono significativamente più alti nelle cellule AS3. Questo dato è importante in quanto questi rapporti sono indice dell'efficienza di conversione dei precursori (LA e α -LNA) nei loro derivati più insaturi e a più lunga catena.

Inoltre è stato dimostrato che i bassi livelli di LA e α -LNA osservati nelle cellule AS3 rispetto alle S1 sono conseguenza di una più elevata conversione degli stessi nei loro metaboliti, associata ad un aumento dell'attività di Δ 5 e Δ 6 desaturasi, gli enzimi coinvolti nel metabolismo degli AG. E' stato dimostrato che la più alta attività desaturasica osservata nelle cellule AS3 è dovuta ad un aumento dell'espressione genica di entrambi gli enzimi, più marcata per la Δ 6 desaturasi.

La più elevata conversione di LA è associata a livelli più alti di AA nelle cellule AS3, come osservato anche in vivo (Strandvik et al. 1996; Freedman et al. 2004; Gilljam et al. 1986), mentre per quanto riguarda la conversione di α -LNA, si osservano livelli più elevati di EPA nelle AS3, associati a più bassi livelli di DHA. Si deve considerare che la conversione di EPA a DHA coinvolge una

serie di tappe metaboliche di cui l'ultima è una β -ossidazione perossisomiale non molto efficiente. Livelli inferiori di DHA sono stati osservati anche nei pazienti FC (Strandvik et al. 1996; Freedman et al. 2004).

L'incorporazione di LA nei PL è maggiore nelle cellule AS3 rispetto alle S1, mentre è ridotta in TG e CE. Ma, mentre la conversione di LA è circa il 35% nei PL e l'80-85% nei TG, al contrario la conversione di α -LNA è circa l'85% nei PL e il 33-36% nei TG. Questo può essere attribuito al fatto che, come Risé et al. hanno dimostrato nel sangue intero (Risé et al. 2007), l'acido linoleico è presente nei PL a livelli molto elevati, mentre nei TG i livelli sono molto più bassi. In contrasto l'acido α -linolenico è presente a livelli più elevati nei TG e solo in tracce nei PL.

Inoltre, la maggiore incorporazione di LA e α -LNA nei PL delle cellule AS3 rispetto alle S1, li rende maggiormente disponibili alla conversione nei loro derivati a lunga catena (nello specifico AA ed EPA), essendo i PL un pool lipidico con un turnover di AG maggiore rispetto a TG e CE.

Nella FC si osserva un aumento dell'espressione della PLA₂ e un aumento di attività ed espressione della cicloossigenasi 2 (Medjane et al. 2005), che risultano in un'augmentata produzione di prostanoidi (Laszlo et al. 1993; Medjane et al. 2005; Strandvik et al. 1996; De Lisle et al. 2008). Dal momento che il rilascio di AA dalla fosfolipasi è uno step limitante nella sintesi degli eicosanoidi, la up-regulation della PLA₂ che libera AA dai PL di membrana potrebbe essere un possibile meccanismo per spiegare lo stato infiammatorio presente nella FC.

L'elevato rilascio di AA, confermato in diversi sistemi (Strandvik et al. 1996; De Lisle et al. 2008), spiega l'elevato turnover degli AG della serie n-6 e, in ultima analisi, i bassi livelli di LA osservati, in quanto vi è un aumento della richiesta di LA dalla dieta e dai tessuti per la sua conversione ad AA.

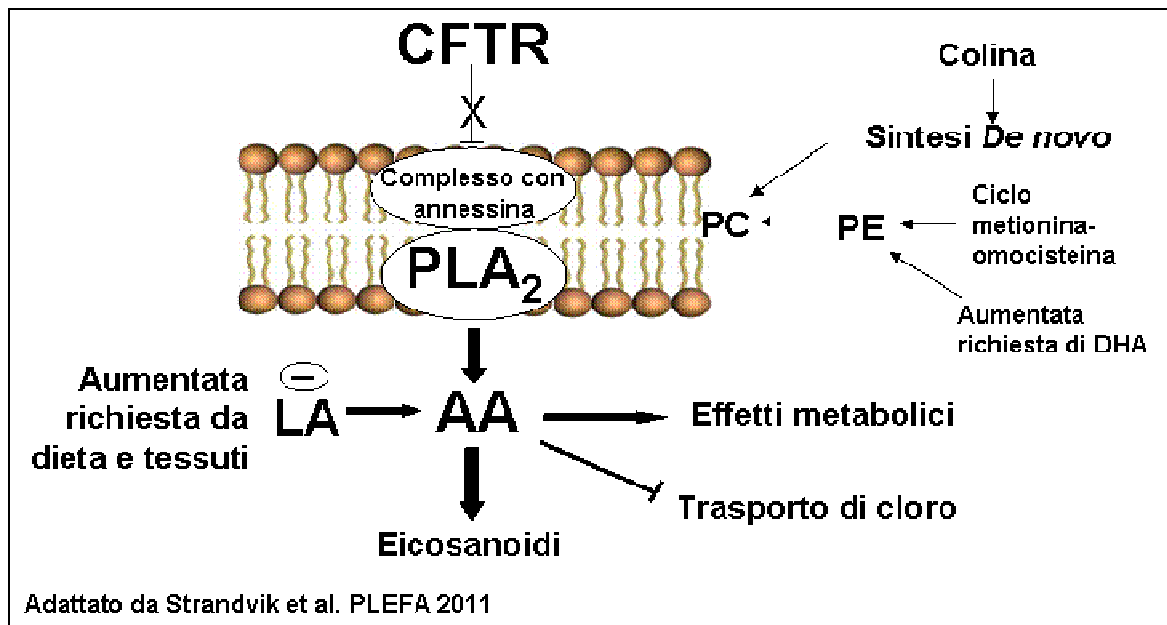


Figura 1. Schema mostrante l'influenza di CFTR mutato sulla PLA₂ nelle membrane e il conseguente aumento del rilascio di AA con conseguente aumento della richiesta di LA.

La proteina CFTR forma un complesso integrale di membrana, dove il primo dominio NBF-1 (nucleotide binding fold) si lega in modo predominante alla fosfatidilserina (PS) ma, con la mutazione $\Delta F508$, presenta un'affinità più alta per la fosfatidilcolina (PC) (Eidelman et al. 2002). E' stato dimostrato che in cellule FC vi è un uptake di colina doppio rispetto a cellule controllo (Ulane et al. 1994), e questo indica che nella FC vi è un elevato turnover di PC. La PC viene sintetizzata secondo due meccanismi: o dalla fosfatidiletanolamina (PE) o tramite sintesi *de novo* che richiede colina assunta con la dieta.

L'aumentato rilascio di AA risulta in un aumentato turnover di fosfatidilcolina (PC), il fosfolipide con la più alta concentrazione di AA e da cui l'AA viene più efficientemente rilasciato per mezzo della PLA₂, aumentando la sintesi *de novo* a partire dalla colina (Innis et al. 2008). Se questa è insufficiente, la sintesi di PC da PE (fosfatidiletanolamina), ricca in DHA, aumenterà, con un aumento della richiesta di DHA.

La sintesi da PE invece dipende dal ciclo metionina-omocisteina che coinvolge il glutathione (GSH) e la S-adenosilmetionina; è stato osservato che i livelli di

questi composti sono ridotti nella FC (Innis et al. 2008; Linsdell et al. 1998; Scambi et al. 2006) e questo potrebbe condurre ad una riduzione dei livelli di DHA in quanto la conversione di PE a PC è il maggior determinante nei livelli sierici di DHA. La carenza della sintesi di PC da PE causerebbe un aumento della sintesi *de novo* a partire da colina, e una carenza in colina potrebbe contribuire alla steatosi epatica osservata nella FC.

Per quanto riguarda il trattamento con il complesso LA-BSA, è stato dimostrato che sia le cellule AS3 che le S1 incorporano l'AG in modo dose dipendente, ma viene incorporato sempre in misura minore dalle cellule AS3. Ciò è associato a una più elevata conversione di LA a tutte le concentrazioni di complesso utilizzate, dovuta ad un aumento significativo dell'espressione sia della $\Delta 6$ che della $\Delta 5$ desaturasi.

Anche per quanto riguarda il trattamento con il complesso DHA-BSA, entrambe le linee cellulari incorporano l'AG in modo dose-dipendente ma, a differenza di quanto osservato per LA-BSA, in questo caso le cellule AS3, alle più alte concentrazioni di complesso utilizzate, incorporano maggiormente delle S1. L'espressione degli enzimi desaturasici, soprattutto alle più alte concentrazioni di complesso utilizzate, è invece significativamente più bassa nelle AS3 rispetto alle S1, probabilmente in quanto il DHA è il prodotto ultimo della conversione degli AG della serie n-3 e le desaturasi sono soggette ad inibizione retroattiva da prodotto (Price et al. 2000; Melin et al. 1997).

Possiamo quindi concludere che il trattamento con LA non migliora lo status degli AG presente nella FC in quanto la più alta conversione osservata nelle cellule AS3 è principalmente un meccanismo compensatorio in risposta all'elevato rilascio di AA dai PL di membrana.

Il trattamento con DHA porta invece ad un miglioramento dei bassi livelli di questo AG osservati nella FC e queste osservazioni sono in linea con diversi

studi in vivo che mostrano un marcato aumento dei livelli di DHA in diversi tessuti e nel sangue dopo somministrazione di supplementi contenenti DHA (Van Biervliet et al. 2008).

La supplementazione con DHA potrebbe quindi essere un utile aiuto nel trattamento della FC per ridurre la severità delle complicanze nei pazienti, dal momento che il DHA è substrato per la sintesi di resolvine della serie D, ed anche di protectine e maresine, tutti composti con attività antiinfiammatoria.

BIBLIOGRAFIA

Agostoni C, Assael BM, Galli C, Risé P, Volpi S, Colombo C, Padoan RF, D'Orazio C, Ghezzi S, Melotti P, Bennato V. Whole blood fatty acid analysis with micromethod in cystic fibrosis and pulmonary disease. *J Cyst Fibros*. 2010 May;9(3):228-33.

Aldámiz-Echevarría L, Prieto JA, Andrade F, Elorz J, Sojo A, Lage S, Sanjurjo P, Vázquez C, Rodríguez-Soriano J. Persistence of essential fatty acid deficiency in cystic fibrosis despite nutritional therapy. *Pediatr Res*. 2009 Nov;66(5):585-9.

Andersson C, Al-Turkmani MR, Savaille JE, Alturkmani R, Katrangi W, Cluette-Brown JE, Zaman MM, Laposata M, and Freedman SD. Cell culture models demonstrate that CFTR dysfunction leads to defective fatty acid composition and metabolism. *J Lipid Res* 2008; 49:1692-1700.

Bartlett JR, Friedman KJ, Ling SC, Pace RG, Bell SC, Bourke B, Castaldo G, Castellani C, Cipolli M, Colombo C, Colombo JL, Debray D, Fernandez A, Lacaille F, Macek M Jr, Rowland M, Salvatore F, Taylor CJ, Wainwright C, Wilschanski M, Zemková D, Hannah WB, Phillips MJ, Corey M, Zielenski J, Dorfman R, Wang Y, Zou F, Silverman LM, Drumm ML, Wright FA, Lange EM, Durie PR, Knowles MR; Gene Modifier Study Group. Genetic modifiers of liver disease in cystic fibrosis. *JAMA*. 2009 Sep 9;302(10):1076-83.

Batal I, Ericsoussi MB, Cluette-Brown JE, O'Sullivan BP, Freedman SD, Savaille JE, Laposata M. Potential utility of plasma fatty acid analysis in the diagnosis of cystic fibrosis. *Clin Chem*. 2007 Jan;53(1):78-84.

Benabdeslam H, Garcia I, Bellon G, Gilly R, Revol A. Biochemical assessment of the nutritional status of cystic fibrosis patients treated with pancreatic enzyme extracts. *Am J Clin Nutr*. 1998 May;67(5):912-8.

Bhura-Bandali FN, Suh M, Man SFP and Clandinin MT. The $\Delta F508$ Mutation in the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator alters control of essential fatty acid utilization in epithelial cells. *J. Nutr*. 2000, 130:2870-2875.

Blackman SM, Deering-Brose R, McWilliams R, Naughton K, Coleman B, Lai T, Algire M, Beck S, Hoover-Fong J, Hamosh A, Fallin MD, West K, Arking DE, Chakravarti A, Cutler DJ, Cutting GR. Relative contribution of genetic and nongenetic modifiers to intestinal obstruction in cystic fibrosis. *Gastroenterology*. 2006 Oct;131(4):1030-9.

Brenner R.R. Hormonal modulation of delta 6 and delta 5 desaturases: case of diabetes. *Prostaglandins Leukotrienes & Essential Fatty Acids* 2003, 68 (2): 151-162.

Carlstedt-Duke J, Brönnegård M, Strandvik B. Pathological regulation of arachidonic acid release in cystic fibrosis: the putative basic defect. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986 Dec;83(23):9202-6.

Caruso D., Risé P., Galella G., Regazzoni C., Toia A., Galli G., and Galli C. Formation of 22 and 24 carbon 6-desaturated fatty acids from exogenous deuterated arachidonic acid is activated in THP-1 cells at high substrate concentration. *FEBS Letters* 1994, 343: 195-199.

Chase HP, Dupont J. Abnormal levels of prostaglandins and fatty acids in blood of children with cystic fibrosis. *Lancet*. 1978 Jul 29;2(8083):236-8.

Cho H.P., Nakamura M., and Clarke S.D. Cloning, Expression, and Fatty Acid Regulation of the Human Δ -5 Desaturase. *The Journal of Biological Chemistry* 1999, 274 (52): 37335-37339.

Cho H.P., Nakamura M., and Clarke S.D. Cloning, Expression, and Nutritional Regulation of the Mammalian Δ -6 Desaturase. *The Journal of Biological Chemistry* 1998, 274 (1): 471-477.

Christiansen EN, Lund JS, Rørtveit T, Rustan AC. Effect of dietary n-3 and n-6 fatty acids on fatty acid desaturation in rat liver. *Biochim Biophys Acta*. 1991 Feb 26;1082(1):57-62.

Cigana C, Assael BM and Melotti P. Azithromycin selectively reduces tumor necrosis factor alpha levels in cystic fibrosis airway epithelial cells. *Antimicrobial Agents and chemotherapy* 2007; 51:975-981.

Cohen P., Miyazaki M., Socci N.D., Hagge-Greenberg A., Liedtke W., Soukas A.A., Sharma R., Hudgins L. C., Ntambi J. M., and Friedman J. M. Role of stearyl-CoA desaturase-1 in leptin-mediated weight loss. *Science* 2002, 297: 240-243.

Collaco JM, Vanscoy L, Bremer L, McDougal K, Blackman SM, Bowers A, Naughton K, Jennings J, Ellen J, Cutting GR. Interactions between secondhand smoke and genes that affect cystic fibrosis lung disease. *JAMA*. 2008 Jan 30;299(4):417-24.

Comeau AM, Accurso FJ, White TB, Campbell PW 3rd, Hoffman G, Parad RB, Wilfond BS, Rosenfeld M, Sontag MK, Massie J, Farrell PM, O'Sullivan BP; Cystic Fibrosis Foundation. Guidelines for implementation of cystic fibrosis newborn screening programs: Cystic Fibrosis Foundation workshop report. *Pediatrics*. 2007 Feb;119(2):e495-518

Coste TC, Armand M, Lebacq J, Lebecque P, Wallemacq P, Leal T. An overview of monitoring and supplementation of omega 3 fatty acids in cystic fibrosis. *Clin Biochem*. 2007 May;40(8):511-20.

Coste TC, Deumer G, Reyhler G, Lebecque P, Wallemacq P, Leal T. Influence of pancreatic status and sex on polyunsaturated fatty acid profiles in cystic fibrosis. *Clin Chem*. 2008 Feb;54(2):388-95.

De Antueno R.J., Knickle L.C., Smith H., Elliot M.L., Allen S.J., Nwaka S., et al. Activity of human Δ 5 and Δ 6 desaturases on multiple n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids. *FEBS* 2001, 509: 77-80.

De Boeck K, Wilschanski M, Castellani C, Taylor C, Cuppens H, Dodge J, Sinaasappel M; Diagnostic Working Group. Cystic fibrosis: terminology and diagnostic algorithms. *Thorax*. 2006 Jul;61(7):627-35.

De Lisle RC, Meldi L, Flynn M, Jansson K. Altered eicosanoid metabolism in the cystic fibrosis mouse small intestine. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2008 Oct;47(4):406-16

De Vizia B, Raia V, Spano C, Pavlidis C, Coruzzo A, Alessio M. Effect of an 8-month treatment with omega-3 fatty acids (eicosapentaenoic and docosahexaenoic) in patients with cystic fibrosis. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 2003 Jan-Feb;27(1):52-7.

Drumm ML, Konstan MW, Schluchter MD, Handler A, Pace R, Zou F, Zariwala M, Fargo D, Xu A, Dunn JM, Darrah RJ, Dorfman R, Sandford AJ, Corey M, Zielenski J, Durie P, Goddard K, Yankaskas JR, Wright FA, Knowles MR; Gene Modifier Study Group. Genetic modifiers of lung disease in cystic fibrosis. *N Engl J Med.* 2005 Oct 6;353(14):1443-53.

Durieu I, Vericel E, Guichardant D, Roth H, Steghens JP, Draï J, Josserand RN, Fontaine E, Lagarde M, Bellon G. Fatty acids platelets and oxidative markers following intravenous n-3 fatty acids administration in cystic fibrosis: An open pilot observational study. *J Cyst Fibros.* 2007 Sep;6(5):320-6.

Eidelman O, BarNoy S, Razin M, Zhang J, McPhie P, Lee G, Huang Z, Sorscher EJ, Pollard HB. Role for phospholipid interactions in the trafficking defect of Delta F508-CFTR. *Biochemistry.* 2002 Sep 17;41(37):11161-70.

Farrel PM, Mischler EH, Engle MJ, Brown DJ, Lau SM. Fatty acid abnormalities in cystic fibrosis. *Pediatr Res* 1985; 19:104-9.

Farrell PM, Rosenstein BJ, White TB, Accurso FJ, Castellani C, Cutting GR, Durie PR, Legrys VA, Massie J, Parad RB, Rock MJ, Campbell PW 3rd; Cystic Fibrosis Foundation. Guidelines for diagnosis of cystic fibrosis in newborns through older adults: Cystic Fibrosis Foundation consensus report. *J Pediatr.* 2008 Aug;153(2):S4-S14.

Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* 1957; 226:497-509.

Freedman SD, Blanco PG, Zaman MM, Shea JC, Ollero M, Hopper IK, Weed DA, Gelrud A, Regan MM, Laposata M, Alvarez JG, O'Sullivan BP. Association of cystic fibrosis with abnormalities in fatty acid metabolism. *N. Engl. J. Med.* 2004, 350:560-9.

Freedman SD, Kats MH, Parker EM, Laposata M, Urman MY, Alvarez JG. A membrane lipid imbalance plays a role in the phenotypic expression of cystic fibrosis in *cftr* (-/-) mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96:13995-14000.

Ghezzi S, Risé P, Ceruti S, Galli C. Effects of cigarette smoke on cell viability, linoleic acid metabolism and cholesterol synthesis, in THP-1 cells. *Lipids.* 2007 Jul;42(7):629-36.

Gilljam H, Strandvik B, Ellin A, Wiman LG. Increased mole fraction of arachidonic acid in bronchial phospholipids in patients with cystic fibrosis. *Scand J Clin Lab Invest.* 1986 Oct;46(6):511-8.

Grammatikos S.I., Subbaiah P.V., Victor T.A., and Miller W.M. Diversity in the ability of cultured cells to elongate and desaturate essential (n-6 and n-3) fatty acids. *Annals of the New York Academy of sciences* 1994, 745: 92-105.

He W.S., Nara T.Y., and Nakamura M.T. Delayed induction of $\Delta 6$ and $\Delta 5$ desaturases by a peroxisome proliferator. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2002, 299 (5): 832-838.

Hrboticky N., Tang L., Zimmer B., Lux I., and Weber P.C. Lovastatin increases arachidonic acid levels and stimulates thromboxane synthesis in human liver and monocytic cell lines. *J. Clin Invest* 1994, 93: 195-203.

Hubbard VS, Dunn GD, di Sant'Agnes PA. Abnormal fatty-acid composition of plasma lipids in cystic fibrosis. A primary or secondary defect? *Lancet* 1977; 2:1302-4.

Innis SM, Davidson AG, Melynk S, James SJ. Choline-related supplements improve abnormal plasma methionine-homocysteine metabolites and glutathione status in children with cystic fibrosis. *Am J Clin Nutr.* 2007 Mar;85(3):702-8.

Katayama M.L.H., Pasini F.S., Folgueira M.A.A.K., Snitcovsky I.M.L., and Brentani M.M. Molecular targets of 1,25(OH) $_2$ D $_3$ in HC11 normal mouse mammary cell line. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 2003, 84 (1): 57-69.

Kawashima Y., Musoh K., and Kozuka H. Peroxisome proliferators enhance linoleic acid metabolism in rat liver. Increased biosynthesis of omega 6 polyunsaturated fatty acids. *Journal of Biological Chemistry* 1990, 265 (16): 9170-9175.

Kuo PT, Huang NN, Bassett DR. The fatty acid composition of the serum chylomicrons and adipose tissue of children with cystic fibrosis of the pancreas. *J Pediatr.* 1962 Mar;60:394-403.

László A, Németh M, Gyukovits K. Activity of phospholipase A in serum from patients with cystic fibrosis. *Clin Chim Acta.* 1993 Jan 31;214(1):105-7.

Lefevre P., Diot C., Legrand P., and Douaire M. Hormonal regulation of stearyl coenzyme-a desaturase 1 activity and gene expression in primary cultures of chicken hepatocytes. *Archives of Biochemistry & Biophysics* 1999, 368 (2): 329-337.

LeGrys VA, Yankaskas JR, Quittell LM, Marshall BC, Mogayzel PJ Jr; Cystic Fibrosis Foundation. Diagnostic sweat testing: the Cystic Fibrosis Foundation guidelines. *J Pediatr.* 2007 Jul;151(1):85-9.

Leikin A.I., and Brenner R.R. In vivo cholesterol removal from liver microsomes induces changes in fatty acid desaturase activities. *Biochimica and Biophysica Acta* 1988, 963 (2): 311-319.

Leonard A.E., Kelder B., Bobik E.G., Chuang L., Parker-Barnes J.M., Thurmond J.M., Kroeger P.E., Kopchick J.J., Huang T., and Mukerji P. cDNA cloning and characterization of

human $\Delta 5$ desaturase involved in the biosynthesis of arachidonic acid. *Biochem. J.* 2000, 347: 719-724.

Lepage G, Levy E, Ronco N, Smith L, Galéano N, Roy CC. Direct transesterification of plasma fatty acids for the diagnosis of essential fatty acid deficiency in cystic fibrosis. *J Lipid Res.* 1989 Oct;30(10):1483-90.

Linsdell P, Hanrahan JW. Glutathione permeability of CFTR. *Am J Physiol.* 1998 Jul;275(1 Pt 1):C323-6.

Lloyd-Still JD, Bibus DM, Powers CA, Johnson SB, Holman RT. Essential fatty acid deficiency and predisposition to lung disease in cystic fibrosis. *Acta Paediatr.* 1996 Dec;85(12):1426-32.

Lloyd-Still JD, Johnson SB, Holman RT. Essential fatty acid status and fluidity of plasma phospholipids in cystic fibrosis infants. *Am J Clin Nutr* 1991; 54:1029-1035.

Matsuzaka T., Shimano H., Yahagi N., Amemiya-Kudo M., Yoshikawa T., Hasty A.H., Tamura Y., Osuga J., Okazaki H., Iizuka Y., Takahashi A., Sone H., Gotoda T., Ishibashi S., and Yamada N. Dual regulation of mouse $\Delta 5$ and $\Delta 6$ desaturase gene expression by SREBP-1 and PPAR α . *Journal of Lipid Research* 2002, 43: 107-114.

McKarney C, Everard M, N'Diaye T. Omega-3 fatty acids (from fish oils) for cystic fibrosis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2007 Oct 17;(4):CD002201.

Medjane S, Raymond B, Wu Y, Touqui L. Impact of CFTR DeltaF508 mutation on prostaglandin E2 production and type IIA phospholipase A2 expression by pulmonary epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2005 Nov;289(5):L816-24.

Mehta A. CFTR: more than just a chloride channel. *Pediatr Pulmonol.* 2005 Apr;39(4):292-8.

Melin T. and Nilsson A. Delta-6-desaturase and delta-5-desaturase in human HepG2 cells are both fatty acid interconversion rate limiting and are upregulated under essential fatty acid deficient conditions. *PLEFA* 1997, 56 (6): 437-442.

Miller C.W., Waters K.M., and Ntambi J.M. Regulation of hepatic stearoyl-CoA desaturase gene by vitamin A. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1997, 231: 206-210.

Minasian C, McCullagh A, Bush A. Cystic fibrosis in neonates and infants. *Early Hum Dev.* 2005 Dec;81(12):997-1004.

Nakamura N.T., and Nara T.Y. Gene regulation of mammalian desaturases. *Biochemical Society Transactions* 2002, 30 (6): 1076-1086.

Nara T.Y., He W.S., Tang C., Clarke S.D., and Nakamura M.T. The E-box like sterol regulatory element mediates the suppression of human $\Delta 6$ desaturase gene by highly unsaturated fatty acids. *Biochemical and Biophysical Research communications* 2002, 296 (1): 111-117.

Ntambi J.M. and Miyazaki M. Regulation of stearyl-CoA desaturases and role in metabolism. *Progress in Lipid Research* 2004, 43: 91-104.

O'Sullivan BP, Freedman SD. Cystic fibrosis. *Lancet*. 2009 May 30;373(9678):1891-904.

Pawlosky R., Hibbeln J., Wegher B., Sebring N., and Salem Jr N. The effects of cigarette smoking on the metabolism of essential fatty acids. *Lipids* 1999, 34, supplement.

Peluffo RO, Nervi AM, Brenner RR. Linoleic acid desaturation activity of liver microsomes of essential fatty acid deficient and sufficient rats. *Biochim Biophys Acta*. 1976 Jul 20;441(1):25-31.

Price P.T., Nelson C.M., and Clarke S.D. Omega-3 polyunsaturated fatty acid regulation of gene expression. *Curr Opin Lipidol* 2000, 11: 3-7.

Reisin IL, Prat AG, Abraham EH, Amara JF, Gregory RJ, Ausiello DA, Cantiello HF. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is a dual ATP and chloride channel. *J Biol Chem*. 1994 Aug 12;269(32):20584-91.

Rimoldi O.J., Finarelli G.S., and Brenner R.R. Effect of diabetes and insulin on hepatic delta 6 desaturase gene expression. *Biochemical & Biophysical Research Communications* 2001, 283 (2): 323-326.

Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou JL, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 1989. 245:1066-1073.

Risé P, Colombo C, Galli C. Effects of simvastatin on the metabolism of polyunsaturated fatty acids and on glycerolipid, cholesterol, and de novo lipid synthesis in THP-1 cells. *Journal of Lipid Research* 1997; 38:1299-1307.

Risé P, Eligini S, Ghezzi S, Colli S, Galli C. Fatty acid composition of plasma, blood cells and whole blood: relevance for the assessment of the fatty acid status in humans. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2007 Jun;76(6):363-9.

Risé P, Ghezzi S, Carissimi R, Mastromauro F, Petroni A, Galli C. Delta 5 desaturase mRNA levels are increased by simvastatin via SREBP-1 at early stages not via PPARalpha, in THP-1 cells. *Eur. J. Pharmacol* 2007; 571(2-3):97-105.

Risé P, Ghezzi S, Priori I, Galli C. Differential modulation by simvastatin of the metabolic pathways in the n-9, n-6 and n-3 fatty acid series, in human monocytic and hepatocytic cell line. *Biochemical Pharmacology* 2005; 69:1095-1100.

Risé P, Pazzucconi F, Sirtori CR, Galli C. Statins enhance arachidonic acid synthesis in hypercholesterolemic patients. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2001 Apr;11(2):88-94.

Risé P., Camera M., Caruso D., Ghezzi S., Visioli F., and Galli C. Synthesis of long-chain polyunsaturated fatty acids is inhibited in vivo in hypercholesterolemic rabbits and in vitro by oxysterols. *PLEFA* 2004, 71: 79-86.

Risé P., Colombo C., and Galli C. Effects of simvastatin on the metabolism of polyunsaturated fatty acids and on glycerolipid, cholesterol, and de novo lipid synthesis in THP-1 cells. *J of Lipid Research* 1997, 38: 1299-1307.

Risé P., Ghezzi S., Levati M.G., Mirtini R., Colombo C., and Galli C. Pharmacological modulation of fatty acid desaturation and of cholesterol biosynthesis in THP-1 cells. *Lipids* 2003, 38 (8): 841-846.

Rosenfeld M, Ramsey BW, Gibson RL. Pseudomonas acquisition in young patients with cystic fibrosis: pathophysiology, diagnosis, and management. *Curr Opin Pulm Med.* 2003 Nov;9(6):492-7

Rosenlund ML, Kim HK, Kritchevsky D. Essential fatty acids in cystic fibrosis. *Nature.* 1974 Oct 25;251(5477):719.

Rosenlund ML. Cystic fibrosis. *CRC Crit Rev Clin Lab Sci.* 1972 Sep;3(3):257-69.

Roulet M, Frascarolo P, Rappaz I, Pilet M. Essential fatty acid deficiency in well nourished young cystic fibrosis patients. *Eur J Pediatr.* 1997 Dec;156(12):952-6.

Scambi C, Guarini P, De Franceschi L, Bambara LM. Can 5-methyltetrahydrofolate modify the phospholipid fatty acid pattern in cystic fibrosis pediatric patients? *J Cyst Fibros.* 2006 Aug;5(3):197-9.

Schwiebert EM, Egan ME, Hwang TH, Fulmer SB, Allen SS, Cutting GR, Guggino WB. CFTR regulates outwardly rectifying chloride channels through an autocrine mechanism involving ATP. *Cell.* 1995 Jun 30;81(7):1063-73.

Shimano H. Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs): transcriptional regulators of lipid synthetic genes. *Prog Lipid Res* 2001, 40 (6): 439-452.

Strandvik B, Berg U, Kallner A, Kusoffsky E. Effect on renal function of essential fatty acid supplementation in cystic fibrosis. *J Pediatr.* 1989 Aug;115(2):242-50.

Strandvik B, Hulterantz R. Liver function and morphology during long-term fatty acid supplementation in cystic fibrosis. *Liver.* 1994 Feb;14(1):32-6.

Strandvik B, Svensson E, Seyberth HW. Prostanoid biosynthesis in patients with cystic fibrosis. *PLEFA* 1996, 55:419-25.

Stutts MJ, Canessa CM, Olsen JC, Hamrick M, Cohn JA, Rossier BC, Boucher RC. CFTR as a cAMP-dependent regulator of sodium channels. *Science.* 1995 Aug 11;269(5225):847-50

Therrell BL, Lloyd-Puryear MA, Mann MY. Understanding newborn screening system issues with emphasis on cystic fibrosis screening. *J Pediatr.* 2005 Sep;147(3 Suppl):S6-10.

Ulane MM, Butler JD, Peri A, Miele L, Ulane RE, Hubbard VS. Cystic fibrosis and phosphatidylcholine biosynthesis. *Clin Chim Acta.* 1994 Oct 31;230(2):109-16.

van Egmond AW, Kosorok MR, Kosciak R, Laxova A, Farrell PM. Effect of linoleic acid intake on growth of infants with cystic fibrosis. *Am J Clin Nutr.* 1996 May;63(5):746-52.

Vankeerberghen A, Cuppens H, Cassiman JJ. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: an intriguing protein with pleiotropic functions. *J Cyst Fibros.* 2002 Mar;1(1):13-29.

Voss A., Reinhart M., Sankarappa S., and Sprecher H. The metabolism of 7, 10, 13, 16, 19-Docosapentaenoic Acid to 4, 7, 10, 13, 16, 19-Docosahexaenoic Acid in Rat Liver is Independent of a 4-Desaturase. *J Biol Chem.* 1991, 266: 19995-20000.

Wahli H.G., Kausch C., Machicao F., Rett K., Stumvoll M., and Haring H.U. Troglitazone downregulates $\Delta 6$ desaturase gene expression in human skeletal muscle cell cultures. *Diabetes* 2002, 51 (4): 1060-1065.

Waters K.M. and Ntambi J.M. Insulin and dietary fructose induce stearoyl-CoA desaturase 1 gene expression o diabetic mice. *Journal of Biological Chemistry* 1994, 269 (44): 27773-27777.

Williams M.L., Menon G.K., and Hanley K.P. HMG-CoA reductase inhibitors perturb fatty acid metabolism and induce peroxisomes in keratinocytes. *Journal of Lipid Research* 1992, 33 (2): 193-208.

Worcester N.A., Bruckdorfer K.R., Hallinan T., Wilkins A.J., Mann J.A., and Yudkins J. The influence of diet and diabetes on stearoyl Coenzyme A desaturase activity and fatty acid composition in rat tissues. *British Journal of Nutrition* 1979, 41 (2): 239-252.

Zeitlin PL, Lu L, Rhim J, Cutting G, Stetten G, Kieffer KA, Craig R, and Guggino WB. A cystic fibrosis bronchial epithelial cell line: immortalization by adeno-12-SV40 infection. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1991; 4:313-319.