

ACIDI GRASSI DEI FOSFOLIPIDI DEL SIERO NELLA FIBROSI CISTICA DI PAZIENTI TRATTATI CON DIFFERENTI LIPIDI ALIMENTARI.

COCCHI M.* - CARAMIA G.** - GAGLIARDINI R.**
MALAVOLTA M.*** - MOZZON M.*** - FREGA N.***

* *Scottish Agricultural College*

** *Divisione di Pediatria e Neonatologia
Azienda Ospedaliera "G. Salesi", Ancona*

*** *Dipartimento di Biotecnologie Agrarie ed Ambientali
Facoltà di Agraria, Università di Ancona*

Introduzione

In alcuni recenti lavori sono stati testati gli effetti di lipidi a diversa composizione in acidi grassi sulla produzione delle prostaglandine 2 e dei leucotrieni della serie B4 in pazienti affetti da fibrosi cistica (1, 2). I risultati ottenuti, in particolare con la miscela olio di oliva olio di soia hanno dimostrato un'efficacia risposta sia sulla riduzione dei livelli di prostaglandine 2 (PGE₂) che sui leucotrieni 4. Il significato di questa risposta conferma che in organismi giovani l'efficiente funzionamento della Δ^6 -desaturasi è in grado di convertire ad acido eicosapentaenoico (EPA, ω -3) l'acido α -linolenico (ω -3), e quindi di determinare un'altrettanto efficiente risposta sugli eicosanoidi della serie 3 e di antagonizzare la produzione delle PGE₂ sia con un meccanismo diretto che per sostituzione dell'acido arachidonico nei fosfolipidi di membrana, cioè con un meccanismo di competizione nel posizionamento strutturale di membrana dell'EPA (3, 4).

Successivamente si è indagato sulle oscillazioni dell'acido docosaesanoico (DHA, ω -3) nei lipidi totali e si è registrato un incremento significativo dello stesso acido grasso conseguentemente alla sua somministrazione in forma di trigliceridi marini ad alto tenore di DHA (DHA = 25%, EPA = 5%).

Su queste basi ed in accordo con una vasta letteratura che conferma il ruolo positivo del DHA nel controllo dell'equilibrio acidico di membrana al fine di mantenere una normale funzione cellulare negli organismi normali e negli affetti da fibrosi cistica (1,2,5-12).

Nel presente lavoro sono state analizzate mediante tecniche cromatografiche (Cromatografia Liquida ad Alta Prestazione o High Performance Liquid Chromatography, HPLC) le frazioni dei fosfolipidi totali del siero e la relativa composizione in acidi grassi per Gascromatografia ad Alta Risoluzione (HRGC) di pazienti affetti da fibrosi cistica al tempo 0, a 30 e 60 giorni sottoposti a regimi dietetici diversificati in tre differenti gruppi:

- 1) miscela olio di oliva - olio di soia,
- 2) miscela olio di oliva e soia più trattamento con antileucotrieni,
- 3) terapia con i soli antileucotrieni.

Inoltre verranno studiate, e saranno oggetto di una prossima comunicazione, la composizione quali-quantitativa degli acidi grassi dei singoli fosfolipidi nei tre diversi gruppi allo scopo di evidenziare ed osservare l'andamento e la presenza del DHA.

Parte Sperimentale

Sono state indagate la composizione dei fosfolipidi plasmatici e la relativa distribuzione degli acidi grassi di pazienti affetti da fibrosi cistica sottoposti a regimi dietetici diversificati nella quota lipidica.

L'estrazione della frazione lipidica dei campioni di siero è stata condotta secondo il metodo di Folch et al. (15). La frazione fosfolipidica è stata analizzata mediante HPLC (16), utilizzando uno strumento Jasco 900 Series accoppiato ad un rivelatore light scattering PL-EMD 960 (Polymer Labs) nelle condizioni indicate nelle Tabelle 1 e 2. L'identificazione dei singoli fosfolipidi è stata effettuata per comparazione con i tempi di ritenzione di composti puri (L- α -fosfatidiletanolamina, PE; L- α -fosfatidilinositolo, PI; sfingomieline, Sph; L- α -fosfatidilcolina, PC; L- α -lisofosfatidilcolina, L-PC) forniti dalla Sigma Chemicals (St. Louis, Mo, USA).

La frazione dei fosfolipidi è stata separata dagli altri costituenti lipidici del siero mediante Cromatografia su Strato Sottile (TLC) utilizzando lastre Silica-gel G (Merck, Darmstadt, Germania) e come eluente una miscela di *n*-esano ed etere etilico nel rapporto 60:40 v/v. Le bande sono state rivelate spruzzando una soluzione di 2,7'-diclorofluoresceina in etanolo ed i fosfolipidi sono stati estratti dal materiale adsorbente, con una miscela di cloroformio/metanolo/acqua 5:5:1 v/v/v.

Gli esteri metilici degli acidi grassi dei fosfolipidi totali sono stati preparati per transmetilazione acida nelle condizioni indicate in Christie (17) ed analizzati mediante HRGC, utilizzando uno strumento Chrompack CP-9003 attrezzato per iniezioni on-column nelle condizioni indicate in Tabella 1.

Conclusioni

Nella tabella 3 è riportata la composizione percentuale a 0, 30 e 60 giorni delle singole classi di fosfolipidi plasmatici dei tre gruppi di soggetti considerati. I grafici 1, 2 e 3 invece riportano il contenuto percentuale medio dei singoli fosfolipidi dei gruppi oggetto di studio. Mentre nella tabella 4 viene riportata la composizione percentuale degli acidi grassi dei fosfolipidi dei tre gruppi a 0 e 60 giorni. Come era nelle attese sia per quanto riguarda la fosfatidiletanolamina, il fosfatidilinositolo, la fosfatidilcolina, la sfingomieline e la lisofosfatidilcolina non hanno documentato nessuna particolare variazione a 30 e a 60 giorni rispetto ai controlli. Per quanto riguarda invece il DHA si sono riscontrate modificazioni indicative, nel senso di una riduzione dei livelli, quindi della biodisponibilità, nei casi trattati ed in particolare nel trattamento con solo antileucotrieni, rispetto ai basali. Questi risultati per il DHA confermano quelli precedentemente ottenuti, cioè che la miscela oliva-soia è prevalentemente impegnata nella produzione di PG e LT

antagonisti di quelli pro-infiammatori, per trasformazione prevalente in EPA dell'acido α -linolenico. La biodisponibilità del DHA, pertanto, viene confermata solamente qualora esso sia aggiunto già preformato all'alimentazione quotidiana. Questa indagine conferma ulteriormente l'importanza del raggiungimento di un corretto equilibrio tra gli acidi grassi della dieta nei pazienti con fibrosi cistica, anche se vanno stabiliti i dosaggi ottimali per ottenere reali vantaggi. (13, 14)

BIBLIOGRAFIA

- 1) Cocchi M, Frega N, Marinelli M, Gagliardini R, Caramia GM: Acidi grassi n-6 ed n-3: equilibrio metabolico degli eicosanoidi nella fibrosi cistica. Atti del Convegno Internazionale Bambino: Progetto salute, GM Caramia Ed., Ancona, 1998: 57-58.
- 2) Carania GM, Gagliardini R, Cocchi M, Mozzon M, Frega N: Aspetti teorici nutrizionali e attualità dietetico-terapeutiche: intervento mirato sulla fibrosi cistica. Atti del Convegno Internazionale Bambino: Progetto salute, GM Caramia Ed., Ancona, 1999: 314-318.
- 3) Wu D., Meydani SN: n-3 Polyunsaturated fatty acids and immune function. Proceedings of the Nutrition Society 1998, 57:503-509.
- 4) Caramia G, Cocchi M, Frega N: Recenti progressi in nutrizione. Progress in nutrition, in stampa.
- 5) Horrobin DF: Acidi grassi essenziali: un'analisi. Nutrizione Umana 1989; 4: 1-5.
- 6) Caramia G, Nobilini A: Il ruolo degli acidi grassi essenziali in età pediatrica. Fano Pediatrica 1990:49-55.
- 7) Warthon B.: Food for the brain, Bambino: Progetto Salute, 1991; 44-51.
- 8) Cocchi M.: The significance of n-3 fatty acids in foetal/neonatal development and some alternative sources. Proceedings of the nutrition society, 1993; 52:224.
- 9) Caramia G., Ferretti G., Wuyiyong W., Taus M., et Al.: Studio del metabolismo lipidico dei nati sottopeso (LBWI). Composizione e fluidità della membrana eritrocitaria: relazione fra allattamento materno e formule. Nota IV. Bambino: Progetto Salute 1993; 214-217.
- 10) Lucas A.: Early diet and later outcome in premature babies. Bambino: Progetto Salute 1993, 44-51.
- 11) Cocchi M.: Cervello, retina e fertilità. Il Segnale Editore, 1998.
- 12) Ferretti G., Taus M., Wu Yi Yong, Valsasina R., Bertoli E., Ruffini E., Caramia G.: Plasma lipoprotein composition and erythrocyte membrane fluidity in low birth weight infant: a relationship between feeding with maternal milk or adapted formulas. Eur. J. Clin. Nutr. 1999; in stampa.
- 13) Freedman D., Katz M.H., Parker E.M., Laposata M., Urman M.Y., Alvarez J.G.: A membrane lipid imbalance plays a role in the phenotypic expression of cystic fibrosis in *cftr*-I-mice, The Nat. Acad. Of Sci., 1999, vol 96, issue 24, 13995-14000.
- 14) Caramia G.: Gli acidi grassi essenziali in neonatologia e pediatria, Progress in Nutrition, 1, 3-4, 1999.
- 15) 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.
- 16) Caboni MF, Menotta S, Lercker G: High-performance liquid chromatography separation and light-scattering detection of phospholipids from cooked beef. J. Chromatogr. 1994; 683:59-65.
- 17) Christie WW: Lipid analysis. 2nd Edition. Pergamon Press, 1982

TABELLE

Tabella 1 - Condizioni sperimentali adottate nella determinazioni cromatografiche

	Fosfolipidi (HPLC)	Acidi grassi (HRGC)
Fase stazionaria	Hypersil Si 3 μ m	SP 2330
Diametro interno (mm)	4,6	0,32
Lunghezza (m)	0,15	30
Spessore film (μ m)	-	0,25
Introduzione del campione	Valvola Rheodine (loop 5 μ l)	TP-OCI
Rivelatore	Light scattering	F.I.D.
Flusso in colonna (ml/min)	0,8	1,6
Gas di trasporto	-	He
Eluenti	A = CHCl ₃ /MeOH/H ₂ O/NH ₃ (30%) 60:34:5,5:0,5 B = CHCl ₃ /MeOH/NH ₃ (30%) 80:19,5:0,5	-
Temperatura del forno (°C)	-	60 → 220
Programma temperatura forno	-	isot. 3 min; 3 °C/min
Temperatura TP-OCI	-	60 → 220
Programma temp. TP-OCI	-	isot. 6 min; 20 °C/min
Temperatura rivelatore (°C)	-	230

Tabella 2 - Gradiente di eluizione utilizzato nell'analisi HPLC dei fosfolipidi.

Tempo (min)	0	10	20
A* %	0	100	100
B* %	100	0	0

* vedi tabella 1

Tabella 3 - Composizione %* delle singole classi di fosfolipidi plasmatici di tre gruppi di soggetti.

	Camp.	fosfatidiletanolamina			fosfatidilinositolo			fosfatilcolina			sfingomieline			lisofosfatidilcolina		
		0 gg	30 gg	60 gg	0 gg	30 gg	60 gg	0 gg	30 gg	60 gg	0 gg	30 gg	60 gg	0 gg	30 gg	60 gg
Olio di soia + olio di oliva	A	2,1	2,6	2,2	6,1	5,8	6,5	64,2	65,8	59,5	19,2	19,9	21,6	8,5	5,9	10,2
	B	2,2	2,7	2,6	6,0	7,1	5,7	54,4	55,7	55,8	27,1	27,1	24,3	10,4	7,4	11,6
	C	2,0	2,6	3,3	6,6	8,2	5,9	62,2	53,5	57,4	24,1	29,0	28,0	5,2	6,7	5,4
	D	2,9	2,6	2,6	5,6	7,5	7,1	58,7	54,2	58,0	26,9	32,0	25,5	5,9	3,6	6,7
	E	1,8	3,0	3,2	5,6	7,4	6,0	62,9	58,1	52,3	23,4	26,7	27,5	6,3	4,9	11,0
Olio + antileucot rieni	F	2,2	2,4	2,3	6,1	6,0	6,6	59,3	60,3	57,8	25,9	27,0	27,1	6,4	4,3	6,1
	G	2,0	1,9	2,4	7,2	5,1	5,4	57,4	60,8	60,6	28,1	27,9	23,9	5,3	4,3	7,7
	H	2,5	3,5	4,2	5,5	5,7	5,8	60,8	60,8	43,9	23,2	21,3	23,8	8,0	8,7	22,3
	J	2,2	2,1	2,6	5,1	5,0	5,4	58,8	48,2	49,0	28,8	31,1	33,2	5,1	13,7	9,9
Antileucotri eni	L	2,1	2,7	2,2	7,6	6,6	5,8	54,9	60,0	49,6	28,0	25,1	25,0	7,4	5,7	17,3
	M	2,2	3,3	-	7,1	7,9	-	59,8	54,2	-	24,5	28,2	-	6,4	6,4	-
	N	3,0	2,9	2,4	6,7	7,4	7,0	55,6	53,9	48,8	28,0	28,9	31,4	6,8	6,84	10,6
	O	2,1	3,9	4,1	5,5	6,3	6,8	60,6	55,7	58,0	23,8	26,2	25,0	8,2	7,9	6,0
	P	2,0	3,3	3,4	5,3	5,3	6,0	64,0	61,0	55,0	22,1	23,0	23,5	6,6	7,3	12,1

* percentuale calcolata sulla base delle relative aree HPLC

Tabella 3 - Tabella 4 - Composizione %* degli acidi grassi dei fosfolipidi plasmatici di tre gruppi di soggetti a 0 e 60 giorni.

	Giorni	Camp	C _{14:0}	C _{16:0}	C _{16:1}	C _{18:0}	C _{18:1}	C _{18:2}	C _{18:3}	C _{22:0}	C _{20:4}	C _{20:5}	C _{24:0}	X	C _{22:6}
Olio di soia + olio di oliva	0	A	0,6	34,0	0,5	14,5	13,6	19,1	0,4	3,3	10,1	0,4	0,4	0,7	2,4
		B	0,5	29,6	0,3	16,3	13,3	19,6	0,9	3,3	10,9	0,4	0,5	0,7	3,9
		C	0,9	33,2	0,6	14,1	17,9	16,7	0,6	3,8	8,2	0,5	0,7	0,7	2,1
		D	0,6	30,4	0,5	14,1	14,5	21,7	0,8	4,5	9,7	0,5	0,4	0,5	1,8
		E	0,5	30,1	0,3	18,0	12,8	21,0	0,5	4,5	9,3	0,4	0,4	0,6	1,9
	60	A	2,5	36,4	0,8	14,7	19,6	15,1	0,4	2,4	5,9	0,3	0,3	0,3	1,2
		B	0,8	32,3	0,3	16,8	17,2	17,7	0,5	2,8	8,0	0,5	0,3	0,5	2,3
		C	0,8	33,1	0,4	14,2	18,9	20,3	0,7	2,5	6,5	0,3	0,3	0,4	1,7
		D	1,1	32,7	0,6	16,4	20,1	17,7	0,5	3,1	5,7	0,4	0,3	0,3	1,1
		E	0,3	31,8	0,3	17,6	14,5	18,0	0,5	4,3	9,3	0,5	0,3	0,5	2,0
Miscela olio + antileucotrieni	0	F	0,5	29,0	0,6	20,0	13,6	19,5	0,5	4,4	8,7	0,5	0,5	0,6	1,7
		G	0,5	33,7	0,4	14,3	12,7	20,1	0,7	1,9	8,4	1,1	0,2	0,8	5,1
		H	0,5	33,5	0,7	14,4	14,4	15,9	0,5	4,2	11,1	1,1	0,4	0,6	2,7
		J	1,4	28,2	0,3	16,1	15,1	24,2	0,6	2,4	7,5	0,5	0,3	0,5	3,1
	60	F	0,6	31,4	0,4	17,9	14,2	22,3	0,4	3,1	7,2	0,4	0,4	0,4	1,3
		G	1,3	31,5	0,5	16,2	14,8	22,6	0,6	2,1	6,6	0,3	0,3	0,6	2,7
		H	0,5	35,3	0,5	17,4	12,1	16,2	0,7	3,4	9,6	0,7	0,5	0,6	2,6
		J	1,5	33,3	0,6	15,5	18,0	18,6	1,1	2,7	5,7	0,3	0,2	0,4	2,1
Antileucotrieni	0	L	2,3	32,5	0,6	16,4	17,2	16,8	0,6	3,2	7,3	0,3	0,4	0,5	2,0
		M	0,6	31,5	0,5	15,3	16,4	20,2	0,5	3,3	8,5	0,4	0,6	0,4	2,0
		N	0,7	40,0	0,5	18,4	15,3	18,0	0,7	2,8	1,0	0,5	0,3	0,3	1,4
		O	0,5	32,1	0,4	18,3	14,8	17,1	0,7	2,7	10,4	0,3	0,4	0,6	1,7
	60	L	0,7	31,9	0,6	17,7	15,6	19,0	0,5	3,5	7,6	0,3	0,4	0,5	1,9
		N	1,0	35,3	0,5	15,3	16,4	14,7	6,7	2,5	5,8	0,3	0,2	0,2	1,2
		O	0,8	27,6	0,4	23,4	13,1	21,2	2,8	3,1	5,9	0,3	0,3	0,2	0,9
		P	0,4	32,0	0,2	16,7	13,5	21,5	0,6	2,3	9,5	0,3	0,3	0,6	2,2

* percentuale calcolata sulla base delle relative aree HRGC

C_n:m (n = numero di atomi di carbonio, m = numero di insaturazioni). C_{14:0} = ac. miristico; C_{16:0} = ac. palmitico; C_{16:1} = ac. palmitoleico; C_{18:0} = ac. stearico; C_{18:1} = ac. oleico (ω-9); C_{18:2} = ac. linoleico (ω-6); C_{18:3} = ac. linolenico (ω-3); C_{22:0} = ac. beenico; C_{20:4} = ac. arachidonico (ω-6); C_{20:5} = ac. eicosapentenoico, EPA (ω-3); C_{24:0} = ac. lignocerico; X = componente incognito; C_{22:6} = ac. docosaesanoico, DHA (ω-3).

GRAFICI

Grafico 1 - *Composizione % media* delle singole classi di fosfolipidi plasmatici a 0, 30 e 60 giorni di alimentazione con olio di oliva e soia.*

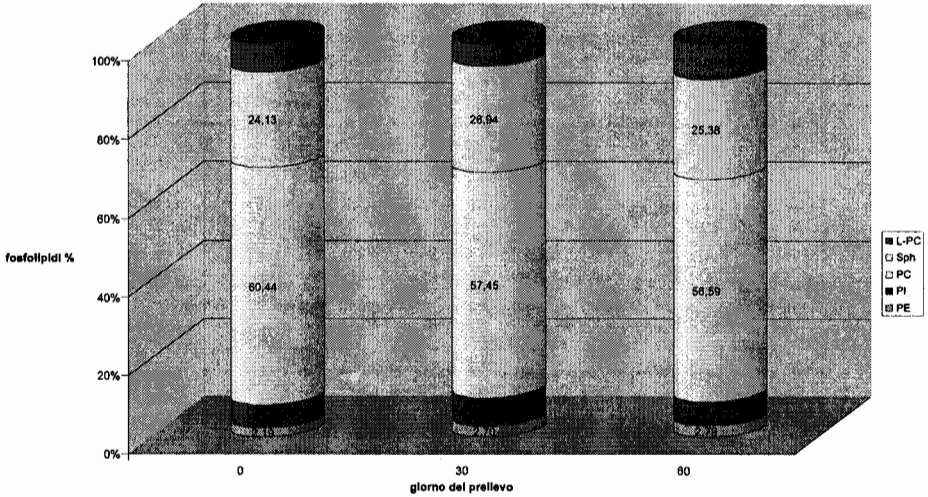


Grafico 2 - *Composizione % media* delle singole classi di fosfolipidi plasmatici a 0, 30 e 60 giorni di alimentazione con miscela di olio e antileucotrieni.*

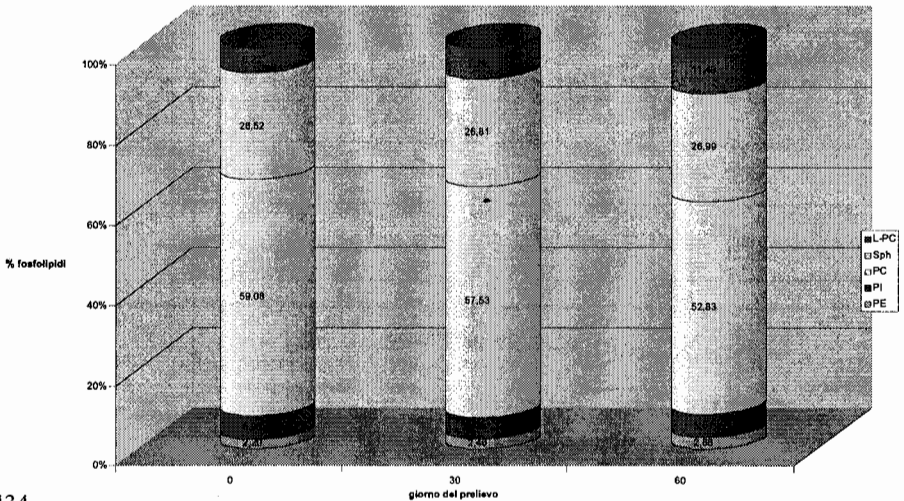


Grafico 3 - *Composizione % media* delle singole classi di fosfolipidi plasmatici a 0, 30 e 60 giorni di alimentazione con olio di oliva e soia.*

