



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

DIPARTIMENTO BIOMEDICO DI MEDICINA INTERNA E SPECIALISTICA

Dottorato di Ricerca in Fisiopatologia del Metabolismo: Lipidi e Lipoproteine

SFINGOLIPIDOMICA DELLA NON ALCOHOLIC FATTY  
LIVER DISEASE IN BIOPSIE DI SOGGETTI CON STEATOSI  
METABOLICA E DA INFEZIONE DI HCV.  
STUDIO CINETICO DELLA SINTESI DEGLI SFINGOLIPIDI  
IN VITRO MEDIANTE UTILIZZO DI ISOTOPI STABILI.

Settore Scientifico Disciplinare MED/09

TESI DI

**Dott. ssa Grazia Ida Altieri**

COORDINATORE DEL DOTTORATO

**Ch.mo Prof. Maurizio Aversa**

TUTOR

**Dott. Davide Noto**

---

XXIV CICLO - ANNO ACCADEMICO 2011/2013

DOTTORATO



# INDICE

<b>Introduzione</b>	pag. 1
<b>Capitolo 1: Il metabolismo lipidico</b>	4
1.1 Le lipoproteine	4
1.2 La via endogena	6
1.3 HDL e trasporto inverso	9
1.4 La via esogena	11
<b>Capitolo 2: La steatosi epatica</b>	14
2.1 La steatosi epatica non alcolica (NAFLD)	14
2.2 Aspetti istologici e storia naturale della NAFLD	15
2.3 Patogenesi della NAFLD	16
2.4 Ruolo degli sfingolipidi nella NAFLD	19
2.5 Sintesi e metabolismo delle ceramidi	21
2.6 Targets biochimici delle ceramidi	23
2.7 Ruolo degli acidi grassi nella NAFLD	25
<b>Capitolo 3: L'epatite virale C (HCV)</b>	30
<b>Capitolo 4: Correlazione tra infezione HCV e metabolismo lipidico</b>	32
<b>Capitolo 5: La spettrometria di massa</b>	34
5.1 Lo spettrometro di massa	35
5.2 Introduzione del campione	35
5.3 Camera di ionizzazione	35
5.4 Sorgenti	36
5.5 Analizzatore	40
5.6 FT-MS	45
5.7 MS-MS	45

5.8 Rivelatore	45
5.9 Risoluzione dello strumento	46
5.10 Lo spettro di massa	47
5.11 Il picco dello ione molecolare	48
5.12 Picchi isotopici	49
5.13 Ioni doppiamente carichi	51
5.14 Ioni metastabili	51
5.15 Spettri di massa esatta	52
5.16 Frammentazione	53
<b>Capitolo 6: Uso di isotopi stabili nello studio dei sistemi Biologici</b>	<b>58</b>
6.1 Traccianti isotopici	5z
6.2 Traccianti stabili	60
<b>Capitolo 7: Scopo dello studio</b>	<b>58</b>
<b>Capitolo 8: Materiali e metodi</b>	<b>59</b>
8.1a Studio su campioni bioptici	64
8.2a Procedure standard di laboratorio	65
8.3a Valutazione istologica	65
8.4a Determinazione dei trigliceridi epatici	66
8.5 <sup>o</sup> a Identificazione e quantificazione delle classi sfingolipidiche	66
8.6a Statistica	69
8b Studi condotti sulle cellule	70
8.1b Condizionamento con acidi grassi	70
8.2b Valutazione del grado di steatosi mediante colorazione con il Nile Red	70
8.3b Analisi di incorporazione di un isotopo stabile dell'acido palmitico (acido palmitico-15,15,16,16,16-d <sub>5</sub> ) nelle varie classi di ceramidi	71
8.4b Protocollo di estrazione degli acidi grassi dal terreno di coltura	72
8.5b Protocollo di estrazione degli sfingolipidi dai lisati cellulari	72

<b>Capitolo 9: Risultati e Discussione</b>	74
9.1a Risultati degli studi condotti sulle biopsie	74
9.2a Profili degli sfingolipidi epatici	75
9.3a Correlazione tra le caratteristiche istologiche epatiche ed il profilo di sfingolipidi epatici nei pazienti CHC	77
9.1b Risultati ottenuti dagli studi in vitro condotti sulle cellule HepG2	78
<b>Capitolo 10: Conclusioni</b>	85
<b>Capitolo 11: Bibliografia</b>	88

## INTRODUZIONE

Il virus dell'epatite C (HCV) è un microorganismo costituito da una molecola di RNA a filamento singolo e di senso positivo, appartenente alla famiglia *Flaviviridae*, in grado di determinare un progressivo grado di infiammazione degli epatociti che conduce alla fibrosi, alla cirrosi epatica ed, in alcuni casi, al carcinoma epatocellulare<sup>1</sup>. Nei paesi industrializzati l'infezione da HCV è, infatti, responsabile del 70% dei casi di epatite cronica, del 40% di cirrosi epatica, del 60% di epatocarcinomi e del 30% dei trapianti di fegato<sup>2,3</sup>.

La valutazione del ciclo vitale dell'HCV è stata ampiamente descritta ed è, oggi, chiaro come il metabolismo dell'HCV sia strettamente collegato ai processi del metabolismo lipidico, a livello epatico. L'HCV può legarsi alle lipoproteine, esser trasportato nel torrente ematico, aderendo ad esse, ed accedere alle cellule epatiche attraverso i loro recettori di competenza (LDLR, LRP, SRB, NPC1L1); in modo analogo, l'HCV può estrudere dall'epatocita sfruttando le vie metaboliche delle lipoproteine.

La replicazione dell'RNA di HCV si realizza attraverso l'associazione della componente proteica del core del virus con i *lipid rafts* delle membrane; molteplici attività enzimatiche lipidi-correlate possono modulare questo processo.

In questo contesto, è stato valutato il ruolo degli sfingolipidi, in particolare ceramidi (CER) e Sfingomieline (SM), molecole lipidiche cui compete, in modo sempre più preponderante, un ruolo di primo piano come effettori biologici, piuttosto che un mero compito strutturale. Strettamente correlati agli sfingolipidi, in quanto componenti essi strutturanti, sono gli acidi grassi (FA).

Gli sfingolipidi sembrano, infatti, esser in grado di modulare il metabolismo virale, nonché il potenziale infettivo. L'inibizione dei processi metabolici sfingolipidici influenza l'attività della Serina-Palmitoil-transferasi (SPT)<sup>4</sup> enzima rilevante ai fini della replicazione virale; inoltre le ceramidi sembrano in grado di ridurre la velocità di replicazione dell'HCV nelle colture cellulari<sup>4</sup>.

Le sfingomieline, legandosi alla HCV RNA-dependent polymerase (RdRp), favoriscono l'interazione tra la componente proteica virale ed i lipid rafts, attraverso un meccanismo virale *genotype specific*.

È stata investigata la stretta correlazione esistente tra l'infezione da virus HCV e la steatosi epatica non alcolica (NAFLD), condizione clinica consistente nel deposito di grasso a livello epatico, non ascrivibile né all'eccessivo consumo di alcool, né a

componenti iatrogene. La NAFLD è, infatti, correlata ad un quadro dismetabolico alla cui base si evidenziano l'insulino-resistenza e la sindrome metabolica.

L'HCV interferisce con il metabolismo energetico a svariati livelli. I processi metabolici inerenti gli acidi grassi epatici sono marcatamente alterati e concorrono allo sviluppo di una condizione di NAFLD, riscontrata in circa il 40% dei soggetti affetti, in accordo con i fattori di rischio associati<sup>5,6,7</sup>, in particolar modo nei pazienti affetti dal genotipo 3 del virus<sup>5,6,7</sup>. In questo contesto, è stato valutato il ruolo degli sfingolipidi, in particolare ceramidi (CER) e Sfingomieline (SM), molecole lipidiche cui compete, in modo sempre più preponderante, un ruolo di primo piano come effettori biologici, piuttosto che un mero compito strutturale. Strettamente correlati agli sfingolipidi, in quanto componenti essi strutturanti, sono gli acidi grassi (FA).

Gli sfingolipidi sembrano, infatti, esser in grado di modulare il metabolismo virale, nonché il potenziale infettivo. L'inibizione dei processi metabolici sfingolipidici influenza l'attività della Serina-Palmitoil-transferasi (SPT)<sup>4</sup> enzima rilevante ai fini della replicazione virale; inoltre le ceramidi sembrano in grado di ridurre la velocità di replicazione dell'HCV nelle colture cellulari<sup>4</sup>.

Le sfingomieline, legandosi alla HCV RNA-dependent polymerase (RdRp), favoriscono l'interazione tra la componente proteica virale ed i lipid rafts, attraverso un meccanismo virale *genotype specific*.

È stata investigata la stretta correlazione esistente tra l'infezione da virus HCV e la steatosi epatica non alcolica (NAFLD), condizione clinica consistente nel deposito di grasso a livello epatico, non ascrivibile né all'eccessivo consumo di alcool, né a componenti iatrogene. La NAFLD è, infatti, correlata ad un quadro dismetabolico alla cui base si evidenziano l'insulino-resistenza e la sindrome metabolica.

L'HCV interferisce con il metabolismo energetico a svariati livelli. I processi metabolici inerenti gli acidi grassi epatici sono marcatamente alterati e concorrono allo sviluppo di una condizione di NAFLD, riscontrata in circa il 40% dei soggetti affetti, in accordo con i fattori di rischio associati<sup>5,6,7</sup>, in particolar modo nei pazienti affetti dal genotipo 3 del virus<sup>5,6,7</sup>.

Un effetto steatogeno diretto dell'HCV è stato postulato e dimostrato sia in vitro, sia attraverso esperimenti effettuati su topi transgenici<sup>8,9,10</sup>, con particolare riferimento al genotipo 3 del virus. È dimostrata un'interazione diretta del core proteico virale con la proteina microsomiale di trasferimento dei trigliceridi (MTTP), il cui ruolo consiste nella lipidazione della apolipoproteina B (apoB), strutturante le VLDL<sup>8,11</sup>.

La correlazione inversa tra la velocità di replicazione del virus HCV ed i livelli di apoB plasmatici supportano pienamente questa ipotesi<sup>8,11</sup>.

L'HCV è, inoltre, associato ad un'elevata prevalenza di obesità viscerale ed insulino-resistenza, responsabili di molteplici disordini metabolici, quali lo sbilanciamento dell'equilibrio di biosintesi ed ossidazione degli acidi grassi; questa coorte di fattori contribuisce in modo determinante alla progressione della NAFLD.

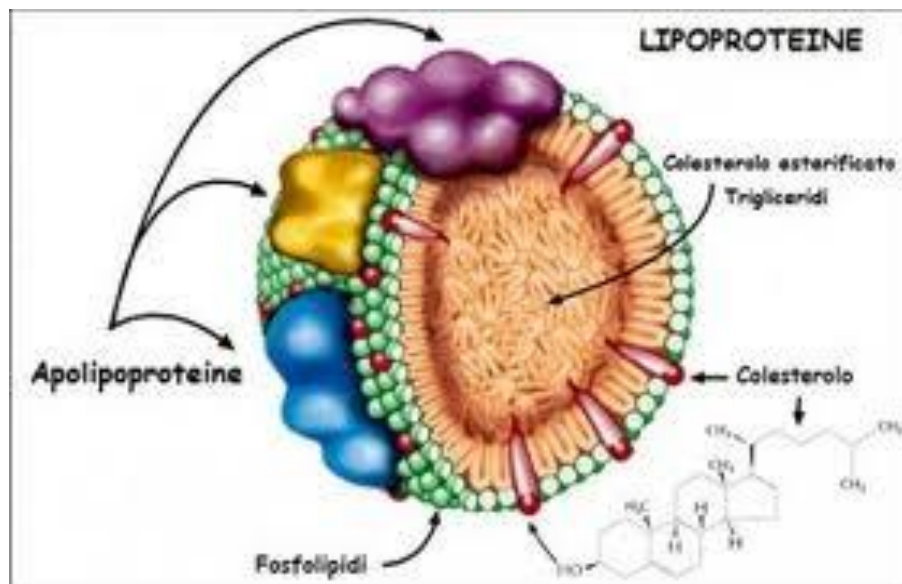
# 1 IL METABOLISMO LIPIDICO

Nel plasma i lipidi sono veicolati attraverso tre vie principali:

- 1) la *via esogena*, concernente il trasporto dei lipidi provenienti dalla dieta da parte dei chilomicroni;
- 2) la *via endogena* che ha inizio con la secrezione delle VLDL da parte del fegato;
- 3) il *trasporto inverso del colesterolo* che determina il ritorno del colesterolo al fegato, utilizzando come elementi principali le HDL. Sia la via esogena che quella endogena contribuiscono ai livelli di lipidi circolanti.

## 1.1 Le lipoproteine

Le lipoproteine sono dei complessi globulari di alto peso molecolare che hanno il compito di trasportare, attraverso i fluidi corporei, i lipidi. Questi ultimi, essendo idrofobici, non sarebbero altrimenti miscibili nel plasma. Il core di una lipoproteina rappresenta la componente di maggiori dimensioni dell'intera particella; esso contiene trigliceridi (TG) e colesterolo (C), mentre il mantello periferico è costituito da fosfolipidi, colesterolo e da una componente proteica, le apolipoproteine (Fig.1).



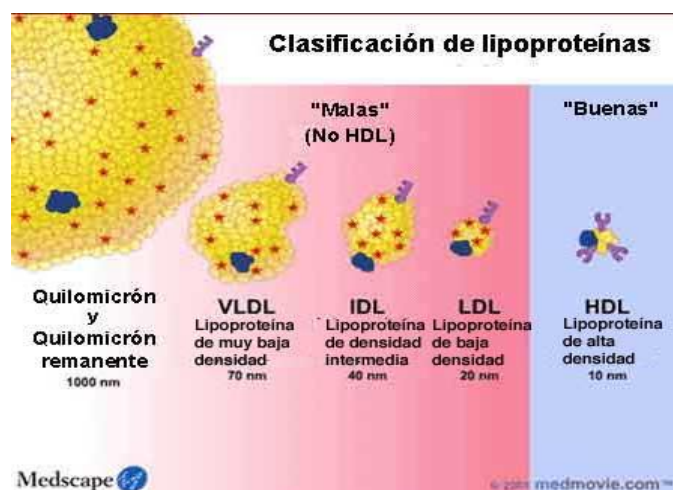
**Fig. 1:** Rappresentazione schematica di una particella lipoproteica.



Le apolipoproteine sono di natura anfipatica con una regione idrofobica, interagente con i lipidi, ed una regione idrofilica che prende contatto con l'ambiente acquoso<sup>12</sup>. Proprio per questa loro natura, le apolipoproteine agiscono da detergenti ed hanno un ruolo nel determinare e stabilizzare il diametro e la struttura lipoproteica. Le apolipoproteine svolgono ruoli molteplici: oltre ad un ruolo basale di tipo strutturale che viene realizzato mediante interazioni con i lipidi (apoA-I, apoA-II, apoB-48, apoB-100), svolgono anche ruoli funzionali. Esse, infatti, oltre a costituire il principale sito di riconoscimento per diversi recettori cellulari, sono implicate come co-fattori nell'ambito della modulazione dell'attività dei principali enzimi coinvolti nel metabolismo lipoproteico<sup>13,14</sup>.

Le lipoproteine circolanti sono di dimensioni differenti: accanto alle lipoproteine più grandi in cui prevalgono i trigliceridi del nucleo rispetto ai lipidi polari del guscio, vi sono lipoproteine più piccole in cui si riscontra prevalenza dei lipidi polari e delle proteine del guscio. Poiché esiste una relazione inversa tra diametro e densità delle lipoproteine (il guscio delle lipoproteine è più denso rispetto al nucleo), le lipoproteine più piccole risultano più dense delle lipoproteine più grandi nelle quali il rapporto tra componenti del guscio e quelli del nucleo è più basso.

Sulla base della loro densità, diametro, composizione e mobilità elettroforetica, le lipoproteine possono essere suddivise in cinque classi principali: chilomicroni, lipoproteine a bassissima densità (VLDL), lipoproteine a densità intermedia (IDL), lipoproteine a bassa densità (LDL) e lipoproteine ad alta densità (HDL) (Fig. 2).



**Fig. 2:** Classificazione delle lipoproteine.

Le lipoproteine più grandi sono i chilomicroni costituiti principalmente da trigliceridi; essi sono presenti nel plasma solo nella fase postprandiale, poiché hanno origine dall'assorbimento lipidico a livello intestinale. Le apolipoproteine presenti nei chilomicroni sono principalmente apoB-48, apoA-I e apoC oltre a piccole quantità di apoA-II, apoA-IV e apoE.

Le VLDL sono lipoproteine di origine epatica e anch'esse sono ricche in trigliceridi. La loro componente proteica è costituita principalmente, come le IDL (che sono però più ricche in colesterolo) da apoB-100, ma presentano in proporzione minore anche apoC e apoE.

Le LDL, di origine epatica, possiedono un rapporto componente proteica/componente lipidica più elevato rispetto alle VLDL. La componente apolipoproteica delle LDL è costituita per il 95% dall'apoB-100 e la restante percentuale da apoC ed apoE.

Le HDL, di origine periferica, sono le lipoproteine più piccole e dense. Circa il 45% di esse è costituito da apolipoproteine nelle seguenti proporzioni: 65% apoA-I; 10÷23% apoA-II; 5÷15% apoC-I; 1÷3% apoE e tracce di apoA-IV. Le lipoproteine ad alta densità si distinguono in: HDL<sub>2</sub> e HDL<sub>3</sub>. Le HDL<sub>3</sub> sono meno ricche in lipidi e ricevono, man mano, il colesterolo libero e fosfolipidi, trasformandosi in HDL<sub>2</sub>.

## **1.2 La via endogena**

La via endogena ha inizio con la secrezione di VLDL, da parte del fegato<sup>15</sup>. L'assemblaggio delle VLDL ha inizio ad opera della proteina di trasferimento microsomiale (MTTP) che trasporta i lipidi verso l'apolipoproteina apoB-100, in corso di sintesi. In funzione dell'ulteriore associazione con lipidi, che intercorre in un secondo tempo, si generano VLDL di diverse dimensioni: dalle VLDL<sub>1</sub>, ricche in trigliceridi (TG), a quelle più piccole e dense, ricche in colesterolo esterificato (CE) chiamate VLDL<sub>3</sub> (le sottoclassi possono essere distinte, utilizzando l'indice di flottazione di Svedberg all'ultracentrifugazione: 100-400 per le VLDL<sub>1</sub> e 60-100 per le VLDL<sub>2</sub> e 20-60 per le VLDL<sub>3</sub>).

La secrezione di apo B-100 è regolata, principalmente, dalla disponibilità di TG piuttosto che dalla loro sintesi; i TG non incorporati vengono rapidamente degradati dal fegato. L'MTTP lavora come un trasportatore, mobilitando dal pool citosolico CE, TG e fosfolipidi (PL) alle lipoproteine in formazione nel reticolo endoplasmatico. La

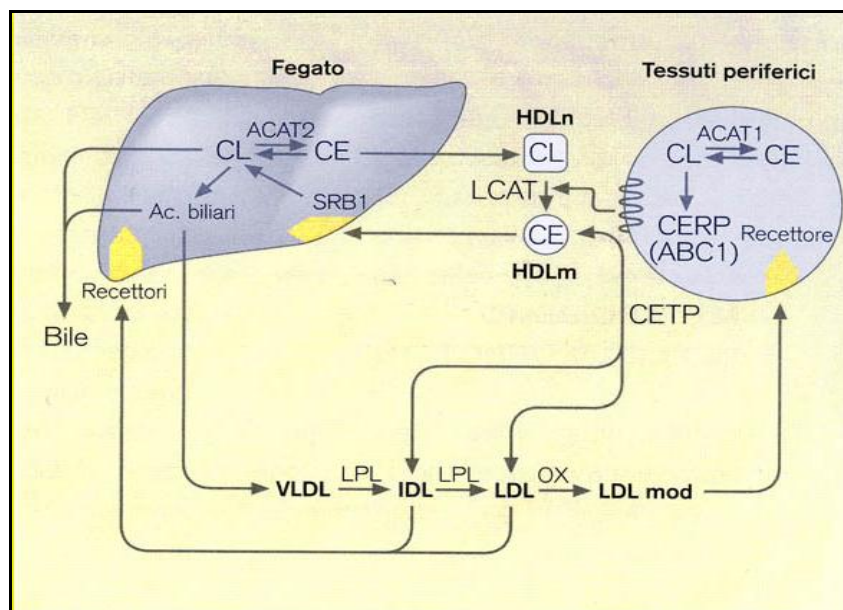
produzione di VLDL<sub>1</sub> è inibita dall'insulina in soggetti normali; questa inibizione viene meno in soggetti con diabete di tipo 2 che presentano livelli elevati di VLDL<sub>1</sub>.

Una volta in circolo le VLDL, come i chilomicroni, sono soggette all'azione della lipoproteinlipasi (LPL) che idrolizza il core ricco in TG, aumentando la percentuale di CE presente; le particelle diventano, a questo punto, più piccole e più dense. Le componenti della superficie in eccesso, in particolare colesterolo libero (FC), PL, le varie apoC e l'apoE sono trasferite alle HDL. L'attività lipolitica della LPL è stimolata dall'insulina, attivata dall'apoC-II ed inibita dall'apoC-III. L'azione della LPL trasforma le VLDL in *remnants* o IDL. La grande maggioranza dei remnants sono catturati nuovamente dal fegato con un meccanismo simile a quello dei chilomicroni. Le IDL vengono metabolizzate dalla LPL e dalla lipasi epatica (HL) che mostra una spiccata affinità per le IDL; oltre all'idrolisi dei TG e dei PL, la lipasi epatica interagisce direttamente con LRP legandosi attraverso la regione carbossi-terminale e promuovendo l'ancoraggio e l'internalizzazione delle IDL nell'epatocita. Dalla lipolisi delle IDL si generano le LDL, ricche in CE e con un minore contenuto di TG rispetto alle VLDL. Prima di interagire con i recettori cellulari, le LDL possono subire modificazioni legate, principalmente, all'attività della proteina di trasferimento degli esteri del colesterolo (CETP) che media il trasferimento di TG e CE tra lipoproteine<sup>16</sup>. In particolare, i TG delle VLDL sono trasferiti alle LDL ed alle HDL in cambio di esteri del colesterolo. Questi interscambi diminuiscono il contenuto di colesterolo-estere delle LDL ed aumentano il contenuto di TG, rendendo queste particelle più suscettibili all'azione lipolitica da parte della HL. Il risultato finale è la formazione di LDL piccole e dense (dovuto ad una riduzione del rapporto lipidi/proteine), ritenute più aterogene delle LDL normali. I recettori B-E o recettori per le LDL, presenti sulla superficie di tutte cellule, ma attivi principalmente nel fegato, sono i principali responsabili del catabolismo finale delle LDL. Il colesterolo che entra negli epatociti via recettore B-E viene esterificato dalla *acil colesterolo aciltraferasi* (ACAT) ed è immagazzinato nel citoplasma insieme con le molecole di colesterolo prodotte nelle stesse cellule. Quando serve colesterolo per la sintesi di ormoni, acidi biliari o per la membrana cellulare, la CE-idrolasi neutra riconverte il CE a FC. L'influsso cellulare di colesterolo attraverso la via del recettore B-E porta a tre eventi distinti, ma concomitanti: una diminuzione della sintesi di colesterolo e recettore B-E ed un aumento di sintesi di CE<sup>17</sup>. Questi effetti di feedback negativo sono controllati da un fattore di trascrizione, la sterol regulatory element-binding protein (SREBP) che può modulare la trascrizione di geni coinvolti

nella biosintesi degli steroli, come l'idrossimetilglutaril coenzima A sintasi (HMGCoA sintasi), l'idrossimetilglutaril coenzima A reduttasi (HMG-CoA reduttasi), i recettori B-E ed altri enzimi coinvolti nella sintesi degli acidi grassi<sup>18</sup>. L'accumulo di colesterolo diminuisce il rilascio proteolitico di SREBP dal precursore legato alla membrana. Viceversa in presenza di richiesta di colesterolo da parte della cellula, il precursore di SREBP viene tagliato in due regioni permettendo il rilascio del fattore di trascrizione solubile che si sposta nel nucleo, stimolando la trascrizione dei geni bersaglio.

Le LDL possono essere immobilizzate all'interno delle pareti vasali (mediante azione della LPL, HL, HSPG); il legame ai proteoglicani le rende suscettibili a fenomeni ossidativi, generando lipoproteine modificate, spesso identificate come LDL ossidate (Ox-LDL). Le Ox-LDL possono essere fagocitate dai macrofagi presenti nella parete vascolare infiammata, ad opera di una classe di recettori definiti scavenger receptors<sup>19</sup>. Questa famiglia di recettori a differenza dei recettori B-E non risente di un meccanismo di feedback negativo da parte dei livelli di colesterolo intracellulare, da ciò consegue che possono continuare ad introdurre colesterolo modificato trasformandosi in cellule schiumose.

Un'altra lipoproteina su cui si sono concentrate le ricerche recenti è la lipoproteina(a), Lp(a). La Lp(a) è costituita da due unità: una particella di LDL dove l'apo B-100 è legata covalentemente con un ponte disolfuro con l'Apo(a), una glicoproteina idrofila. Le sue proprietà aterogene sono legate con ogni probabilità all'omologia con una proteasi del plasminogeno. L'Apo(a) è sintetizzata nel fegato, e viene assemblata nelle lipoproteine ricche in Apo-B 100 sulla superficie degli epatociti. Il catabolismo di questa lipoproteina è ancora poco noto, una buona parte viene convertita in LDL e catabolizzata via recettore B-E. Il rene sembra il sito principale di rimozione della Lp(a); sembra infatti che la metalloendoproteasi renale degradi parzialmente l'Apo(a), favorendone poi l'escrezione con le urine attraverso un meccanismo non del tutto noto<sup>20</sup>.



**Fig. 3:** Metabolismo delle lipoproteine. CL: colesterolo libero; CE: colesterolo esterificato; HDLn: HDL native; HDLm: HDL mature; ACAT: acyl-coenzymeA cholesterol-acyltransferase; SR-B1: scavenger receptor classe 1; LCAT: lecithin cholesterol acetyltransferase.

### 1.3 HDL e trasporto inverso

Il colesterolo non può essere catabolizzato per via enzimatica nell'uomo, se non in minima parte, ed è eliminato per via epatica. Esiste, pertanto, un trasporto centripeto che riporta il colesterolo al fegato per le vie metaboliche finali. Le HDL giocano un ruolo fondamentale in questo meccanismo, denominato trasporto inverso del colesterolo (RCT)<sup>21</sup>.

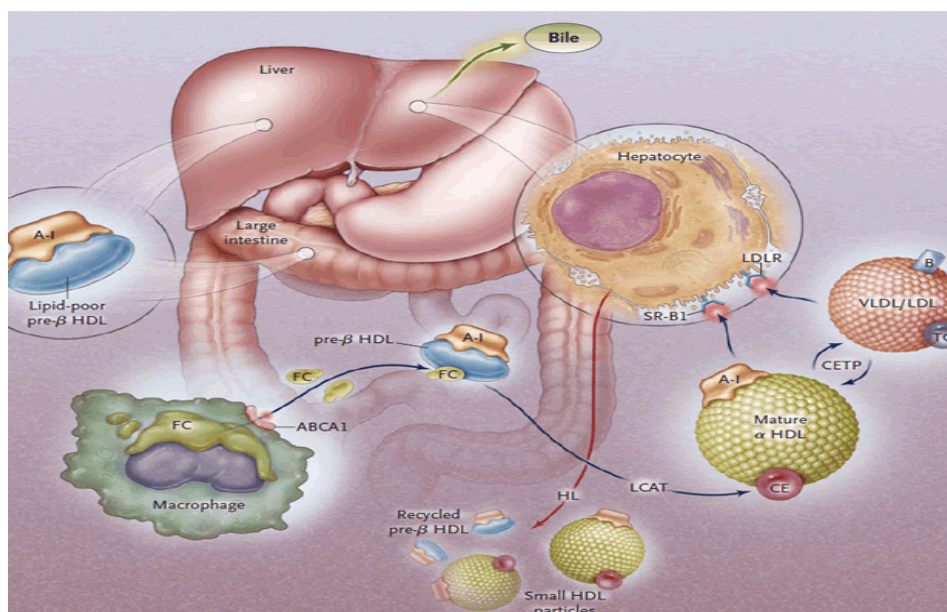
Queste lipoproteine sono molto povere di lipidi e acquisiscono fosfolipidi e colesterolo sia dalle cellule epatiche che non-epatiche. Non è ancora chiaro se questo meccanismo sia extracellulare (le HDL nascenti possono mediare l'efflusso di colesterolo da numerose cellule comprese i macrofagi e gli epatociti) o intracellulare (le HDL possono essere internalizzate e nuovamente secrete come lipoproteine lipidate, mediante un processo chiamato retroendocitosi); il processo, tuttavia, richiede l'attività di un trasportatore di membrana chiamato *ATP-binding cassette A1*(ABCA1)<sup>22</sup>. Questo trasportatore è localizzato sulla superficie cellulare e nelle membrane del complesso del Golgi, e può trasportare i lipidi dall'apparato di Golgi alla membrana cellulare, facilitandone poi l'efflusso. L'efflusso di colesterolo ABCA1-dipendente è attivato dall'apoA-I, down-regolato nelle cellule proliferanti ed in attiva differenziazione.

L'ABCA1 può essere regolato da numerosi fattori, tra cui farmaci, quali i fibrati, che ne promuovono indirettamente l'espressione<sup>23</sup>.

Una volta associato alle HDL nascenti il colesterolo libero viene esterificato ad opera della *lecitina-colesterolo acil transferasi* (LCAT), un enzima chiave attivato dall'apoA-I. Le HDL povere in lipidi diventano mature, ricche in lipidi e sferiche (a-LpA-I con mobilità elettroforetica  $\alpha$ , come conseguenza dell'uptake di colesterolo, PL ed altre apolipoproteine dalle cellule periferiche, dai chilomicroni e dalle lipoproteine ricche in apoB-100. Inizialmente, si formano le HDL<sub>3</sub> ancora dense e relativamente povere in lipidi; man mano che si arricchiscono in colesterolo libero, immediatamente esterificato ad opera della LCAT, le HDL<sub>3</sub> si fondono tra di loro ad opera della proteina di trasferimento dei fosfolipidi (PLTP), in grado anche di aggiungere nuovi fosfolipidi. Questo porta alla formazione delle HDL<sub>2</sub>, più grandi, meno dense e ricche in lipidi. Un ruolo fondamentale nel metabolismo delle HDL è quello dei recettori nucleari PPARs; in particolare l'attivazione del recettore PPAR $\alpha$  è in grado di modulare l'espressione di 5 enzimi coinvolti nel trasporto inverso di colesterolo: apoA-I, apoA-II, LPL, SR-BI e ABCA-1.

Le HDL con mobilità elettroforetica  $\alpha$  possono essere rimosse dal circolo attraverso due meccanismi: le HDL<sub>2</sub> possono interagire con il recettore epatico scavenger receptor B (SR-BI)<sup>24</sup>; quest'ultimo estrae selettivamente esteri del colesterolo e converte le HDL<sub>2</sub> (ricche in lipidi) in HDL<sub>3</sub> (povere in lipidi), oppure attraverso l'attività della CETP si arricchiscono in TG, cedendo colesterolo-estere; in questo modo diventano suscettibili all'attività lipolitica della HL, rendendole anche in questo caso HDL<sub>3</sub> povere in lipidi con il rilascio di a-LpA-I e pre-bi -LpA-1.

Le HDL contenenti apo E (una minoranza), possono essere internalizzate come intera particella dal recettore B-E e dall'LRP nel fegato. Tuttavia altre evidenze suggeriscono l'esistenza di altri recettori epatici in grado di legare ed internalizzare le HDL. Le HDL piccole (meno di 8nm) possono essere escrete a livello renale; la cubilina, recettore per il fattore intrinseco e per la vitamina B<sub>12</sub> è stato recentemente identificato come recettore in grado di legare HDL/apoA-I a livello dell'epitelio del tubulo prossimale renale. Una volta internalizzate le HDL e l'apoA-I vengono degradate nei lisosomi.



**Fig. 4:** Trasporto inverso del colesterolo.

#### 1.4 La via esogena

La via esogena inizia con l'assorbimento dei lipidi a livello intestinale e con la secrezione dei chilomicroni dall'epitelio intestinale nel sistema linfatico e conseguente ingresso nel circolo venoso, attraverso il dotto toracico linfatico<sup>25</sup>.

I chilomicroni si originano negli enterociti attraverso la riesterificazione degli acidi grassi di origine esogena e sono responsabili del trasporto dei lipidi assunti con la dieta (essenzialmente trigliceridi e colesterolo non esterificato). Questi vengono emulsionati dagli acidi biliari e dai fosfolipidi a formare le micelle, idrolizzate dagli enzimi pancreatici nel duodeno.

I prodotti di idrolisi, colesterolo e acidi grassi, vengono assorbiti dalle cellule della mucosa del digiuno ed utilizzati per la sintesi de novo di trigliceridi ed esteri di colesterolo. I trigliceridi e gli esteri del colesterolo, insieme ai fosfolipidi e alle apoproteine B-48 e A-I, II e IV, sintetizzate dall'epitelio intestinale, contribuiscono all'assemblaggio dei chilomicroni. Una volta assemblati, i chilomicroni vengono secreti e convogliati nel circolo linfatico. Nel circolo linfatico ed ematico i chilomicroni si arricchiscono di apoE, apoC-I, II, III, cedute dalle HDL.

L'apoC-II associata ai chilomicroni funge da attivatore della lipoproteinlipasi (LPL), un enzima capace di idrolizzare i trigliceridi dei chilomicroni in glicerolo ed acidi grassi liberi che vengono, a loro volta, subito captati dal muscolo e dal tessuto adiposo.

L'apoE presente sulla superficie dei chilomicroni favorisce il loro ancoraggio agli eparansolfato proteoglicani (HSPG) della membrana cellulare, rendendo accessibili i chilomicroni all'LPL<sup>26</sup>.

L'apoC-I e l'apoC-III hanno un'azione inibitoria sui processi lipolitici, in quanto facilitano la dissociazione dell'apoE dalle lipoproteine, oltre a essere in grado di mascherare i siti di legame per la LPL ed inibire l'azione dell'apolipoproteina C-II. La carenza di apoC-III porta a bassi livelli di TG circolanti. La LPL, presente sul versante endoteliale dei capillari di molti tessuti, e specialmente del tessuto adiposo, viene attivata anche dall'insulina. La LPL si lega alle apoC-II ed idrolizza i TG che compongono il core dei chilomicroni; ciò consente l'ingresso degli acidi grassi nel tessuto adiposo.

Una volta rimossi i TG (operazione che è chiaramente compromessa nei soggetti con deficit di apoC-II o LPL-asi) rimangono le apoC ed A ed i fosfolipidi che vengono trasferiti sulle HDL nascenti. Questo processo idrolitico porta ad una riduzione in massa e volume della componente lipidica dei chilomicroni che si trasformano in particelle dette *remnants*, ricchi in colesterolo, che contengono ancora la apoB-48 e l'apo-E. Più del 50% dei chilomicroni vengono captati dal fegato attraverso l'interazione con il recettore delle LDL (LDLR), una proteina di 160 kDa espressa in tutte le cellule dei mammiferi che riconosce come ligandi sia l'apoB-100 che l'apoE.

Esiste, inoltre, un'altra via attraverso la quale i chilomicroni vengono captati dal fegato, infatti i soggetti affetti da ipercolesterolemia familiare, privi del recettore hanno una normale captazione di chilomicroni. Questa via alternativa è ancora parzialmente nota ed involve, inizialmente, il passaggio dei chilomicroni nello spazio di Disse attraverso le fenestrate tra le cellule endoteliali dei capillari epatici, dove i chilomicroni si legano agli HSPG risultando favoriti nell'interazione con un altro recettore della famiglia dei LDLR, l'LRP, un recettore di superficie in grado di legare diverse proteine tra cui lipoproteine, proteasi ed inibitori di proteasi, che internalizza i chilomicroni. È stata anche proposta la possibilità che l'intero complesso chilomicroni -HSPG-LRP possa essere internalizzato.

Un altro enzima che favorisce la lipolisi dei chilomicroni è la lipasi epatica (HL), localizzato nei sinusoidi epatici. In tutti questi meccanismi proposti, l'apoE sembra svolgere un ruolo essenziale nel uptake dei chilomicroni; infatti sia i chilomicroni che le IDL (*remnants* delle VLDL) si accumulano nel plasma di topi privi del gene dell'apoE.



Inoltre individui omozigoti per la rara isoforma E2 mostrano un alterato legame delle lipoproteine ricche in TG con il LDLR portando ad una severa iperlipidemia (tipo III), nonostante la LPL e l'HL siano regolarmente funzionanti.

## 2 LA STEATOSI EPATICA

La steatosi epatica, condizione patologica molto diffusa nella popolazione occidentale, è caratterizzata da un accumulo di lipidi, prevalentemente trigliceridi, a livello epatocitario.

Si classifica in *steatosi epatica alcolica* (frequentemente correlata ad un rilevante consumo di bevande alcoliche o ad un uso protratto di farmaci citotossici) ed in *steatosi epatica non alcolica (NAFLD)*; quest'ultima riconosce nell'insulino-resistenza, nelle alterazioni di taluni fattori regolanti il metabolismo glucidico e lipidico (ad es. le ceramidi) e nell'aumento di alcune citochine (tra cui il Tumor Necrosis Factor, TNF- $\alpha$ ) i momenti patogenetici principali.

L'associazione tra la NAFLD e la sindrome metabolica, emersa da recenti studi, è oggi motivo di preoccupazione per via dell'elevata prevalenza nella popolazione generale di fattori di rischio, quali diabete e obesità. A questo proposito, una maggiore comprensione dei meccanismi coinvolti nella patogenesi della NAFLD consentirebbe di mettere in atto approcci terapeutici essenziali per la regressione della malattia epatica, nonché per la prevenzione della sindrome metabolica e delle sue complicanze.

### 2.1 La steatosi epatica non alcolica (NAFLD)

La Steatosi Epatica Non Alcolica (Non Alcoholic Fatty Liver Disease, NAFLD) è una patologia caratterizzata da un accumulo di grasso, prevalentemente trigliceridi, eccedente il 5% del peso epatico. La NAFLD è conseguenza di uno stato di insulino-resistenza e, frequentemente, si configura come parte dell'insieme di alterazioni metaboliche che accompagnano l'obesità, il diabete di tipo 2 e le dislipidemie.

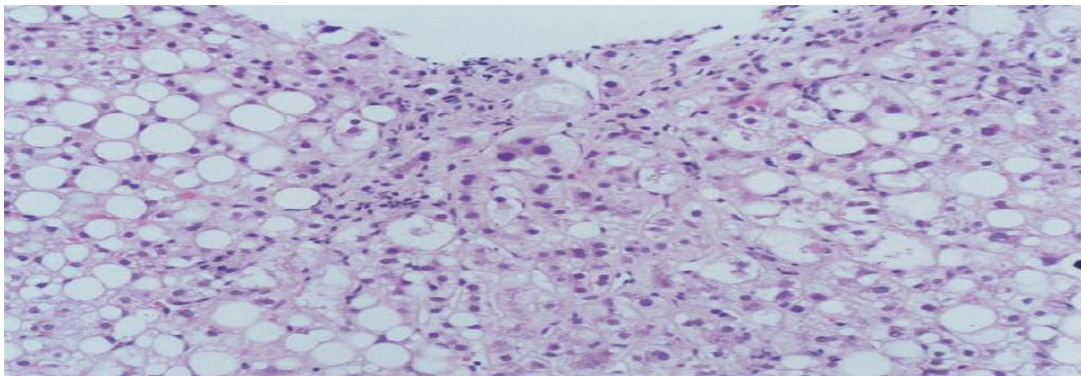
Stime di popolazione basate su criteri indiretti (elevazione delle transaminasi<sup>2,3</sup>, fegato "brillante" all'ecografia<sup>4,5</sup>) indicano che la prevalenza della NAFLD si aggira tra il 10-24% (oscilla tra il 3% circa della popolazione magra e tra il 57,5-74% degli obesi) della popolazione generale nei diversi paesi. La NAFLD può colpire ogni fascia d'età ed è stata descritta nella maggior parte dei gruppi razziali.

L'aumentata prevalenza della NAFLD nei paesi occidentali negli ultimi 10-15 anni è potenzialmente correlabile al parallelo aumento di obesità e diabete riscontrato nei diversi gruppi d'età<sup>27</sup>.

## 2.2 Aspetti istologici e storia naturale della NAFLD

Il quadro istologico della steatosi è caratterizzato dalla presenza di goccioline di grasso nel citoplasma degli epatociti senza causare un'apprezzabile infiammazione, morte cellulare o fibrosi epatica. Si possono distinguere una forma “macrovacuolare” (disposizione del grasso in un'unica grande goccia che disloca il nucleo in sede periferica) ed una forma “microvacuolare” (il grasso si raccoglie in piccole gocce che non dislocano il nucleo dell'epatocita)<sup>28</sup>. Questi due aspetti sono spesso espressione di momenti evolutivi diversi della steatosi e, in effetti, non sono infrequenti i quadri in cui le due forme sono associate.

Nello spettro delle alterazioni istologiche legate alla NAFLD si colloca la NASH (Non Alcoholic SteatoHepatitis), caratterizzata da flogosi focale, fibrosi e necrosi cellulare.



**Fig. 5:** Steatosi macrovesicolare, epatociti in degenerazione balloniforme, corpi di Mallory.

L'infiammazione tende a prevalere nella zona 3 dell'acino. L'infiltrato infiammatorio è costituito da leucociti polimorfonucleati e cellule mononucleate; si concentra attorno ad epatociti in degenerazione *balloniforme* che, talvolta, contengono corpi ialini di Mallory (Figura 5).

È stato descritto che, nella NASH, la fibrosi epatica può essere progressiva e condurre alla cirrosi ed alle sue complicanze come l'epatocarcinoma (HCC), insufficienza epatica e morte epato-correlata.

Un elevato BMI, un grave stato di insulino resistenza o la presenza di diabete di tipo 2 correlano con una maggiore probabilità di progressione della fibrosi<sup>12</sup>. La biopsia epatica costituisce il *gold standard* ed il migliore strumento diagnostico per confermare e stadiare la NAFLD<sup>29</sup>. Tuttavia, l'utilità della biopsia epatica in ogni soggetto con sospetta NAFLD è controversa. Questa procedura diagnostica andrebbe suggerita nei

pazienti con persistente aumento dei livelli sierici di aminotransferasi, in particolare se il paziente è obeso o diabetico<sup>30</sup>.

### 2.3 Patogenesi della NAFLD

Numerose evidenze suggeriscono un'associazione tra la NAFLD e la Sindrome Metabolica (SM). La SM è un'entità clinica caratterizzata da un insieme di alterazioni metaboliche, tra le quali sono incluse l'obesità, l'insulino-resistenza, l'intolleranza glucidica, la dislipidemia e l'ipertensione arteriosa<sup>31</sup>.

Circa il 90% dei pazienti con NAFLD presentano uno o più criteri diagnostici della SM e circa il 33% li presentano tutti; ciò ci consente di definire la NAFLD come "la rappresentazione epatica" della SM<sup>32</sup>.

Possiamo distinguere due tipi di NAFLD: Primaria (associata con la Sindrome Metabolica) e Secondaria (associata con altre condizioni metaboliche o iatrogene, distinte dalla Sindrome Metabolica).

È bene precisare che la fisiopatologia della NAFLD primaria non è stata ancora completamente chiarita. Dal 1998 viene adottato il modello patogenetico *two hit* del danno epatico, proposto da Day e James<sup>33</sup>. Il *first hit* porta all'accumulo iniziale di trigliceridi all'interno dell'epatocita (steatosi), causato dall'incremento dell'apporto e della sintesi epatica dei lipidi e dalla contestuale riduzione della  $\beta$ -ossidazione e dismissione in circolo. Questi squilibri metabolici sono correlati con l'insulino-resistenza, caratteristica peculiare della Sindrome Metabolica. La condizione di steatosi predisporrebbe il fegato al secondo evento (*second hit*), a seguito del quale insorge l'infiammazione, la fibrosi ed il danno epatico. Verosimilmente, i fattori che inducono il secondo evento sono lo stress ossidativo, la perossidazione lipidica, le citochine infiammatorie (principalmente il TNF- $\alpha$ ) e gli ormoni prodotti dal tessuto adiposo (adipochine).

L'obesità, il Diabete di tipo 2, l'iperlipidemia e altre condizioni associate con l'insulino-resistenza sono generalmente presenti in pazienti con NAFLD. Numerose molecole sembrano interferire con il meccanismo di trasduzione del segnale indotto dall'insulina, quali il TNF- $\alpha$ , la leptina, l'adiponectina, gli acidi grassi e le ceramidi.

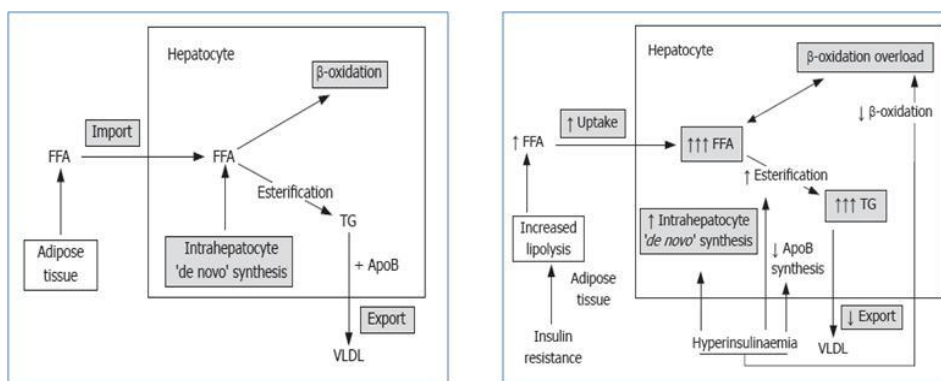
L'insulino-resistenza comporta un aumento della lipolisi periferica, dell'uptake epatico di acidi grassi (FA) e della sintesi epatica di trigliceridi. L'ossidazione e la dismissione

di acidi grassi risulta pertanto in difetto rispetto all'accumulo ed alla neosintesi degli stessi<sup>34</sup>.

Il risultante accumulo di grassi all'interno degli epatociti determina importanti conseguenze. Gli acidi grassi, infatti, interferiscono in senso negativo con il meccanismo di segnalazione intracellulare dell'insulina e causano insulino-resistenza epatica, attraverso delle vie che mediano l'attivazione di PKC- $\zeta$ , JNK, I-Kb kinase  $\beta$  e NF $\kappa$ B<sup>35</sup>.

L'insulino-resistenza epatica comporta un incremento del processo di ossidazione mitocondriale degli acidi grassi. Inoltre, gli acidi grassi ed i loro metaboliti sono ligandi di PPAR- $\alpha$  (peroxisomal proliferators-activated receptor- $\alpha$ ), un fattore di trascrizione che regola l'espressione di diversi geni codificanti enzimi coinvolti nell'ossidazione degli acidi grassi a livello mitocondriale, perossisomale, microsomiale. L'ossidazione degli acidi grassi, sia mitocondriale che perossisomale, è in grado di produrre radicali liberi dell'ossigeno (ROS), epatotossici, che contribuiscono allo sviluppo dello stress ossidativo<sup>36</sup>.

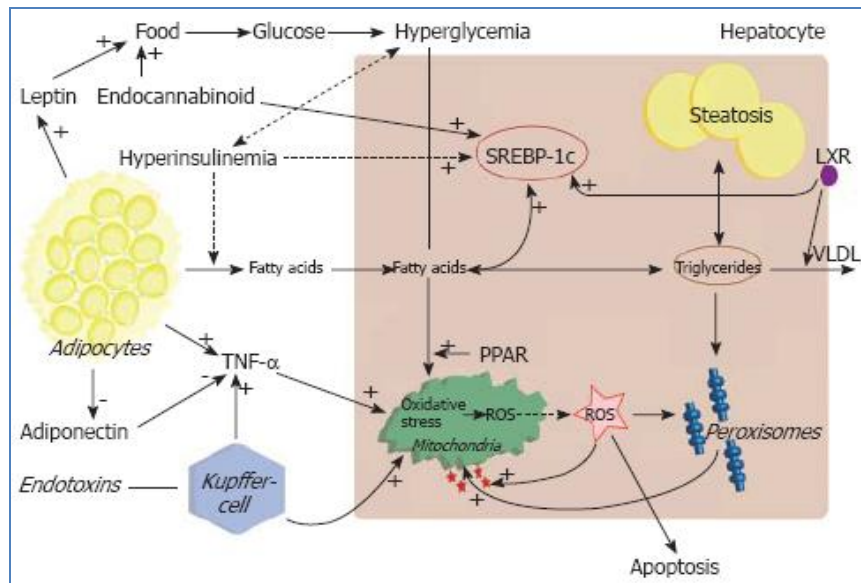
Sulla base di quanto detto sembrerebbe che l'insulino-resistenza possa determinare da sola i "due hit" nella patogenesi della NASH.



**Fig. 6:** Metabolismo lipidico epatico in condizioni fisiologiche e di insulino-resistenza.

Per quanto concerne il ruolo delle citochine infiammatorie (TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$ ) nella patogenesi della NAFLD, queste potrebbero causare insulino-resistenza epatica e sistemica, oltre che favorire il danno epatico, l'apoptosi, la chemiotassi neutrofila e l'attivazione delle cellule stellate. Uno studio ha evidenziato un'elevata espressione di TNF- $\alpha$  e del suo recettore p55 a livello epatico e nel tessuto adiposo dei soggetti con NASH, rispetto a soggetti sani. Quest'incrementata espressione correlava con il grado di fibrosi epatica.

Gli acidi grassi accumulati negli epatociti possono stimolare la produzione di citochine, attraverso la via NF- $\kappa$ B-dipendente. Un ulteriore fonte di citochine pro-infiammatorie è costituita dai macrofagi infiltranti il tessuto adiposo dei soggetti obesi. Oltre a favorire l'insorgenza di uno stato di insulino-resistenza, queste citochine sembrano ridurre la produzione di taluni peptidi prodotti dal tessuto adiposo viscerale, quali la leptina, la resistina e l'adiponectina. Questi peptidi sono stati oggetto di recenti studi volti a chiarire il loro ruolo nella patogenesi della NAFLD.



**Fig.7:** Schema della patogenesi della NAFLD in condizioni di insulino-resistenza.

Sono state osservate basse concentrazioni di adiponectina in pazienti con obesità, insulino-resistenza, diabete di tipo 2 e NAFLD<sup>37</sup>. L'iperinsulinemia induce una down-regulation del recettore dell'adiponectina, riducendone la sua attività (Figura 7). L'adiponectina ha effetti antilipogenetici che potrebbero proteggere tessuti come il fegato e il muscolo dall'accumulo di trigliceridi. L'adiponectina stimola la  $\beta$ -ossidazione mitocondriale, attraverso l'attivazione della protein-chinasi AMP-dipendente (AMPK), del PPAR- $\alpha$  e down-regola SREBP-1c (sterol regulatory element binding protein 1-c), un importante fattore di trascrizione per la sintesi *de novo* degli acidi grassi. Questi effetti provocano una riduzione dei livelli di Malonil-CoA e l'inibizione della Carnitina palmitoil transferasi-1 (CPT-1), causando un incremento dell'ossidazione degli acidi grassi e la riduzione del contenuto epatico di trigliceridi. Recenti lavori hanno dimostrato la presenza di bassi livelli sierici di adiponectina ed una

ridotta espressione epatica del suo recettore in pazienti con NASH, rispetto a soggetti con semplice steatosi.

Nei soggetti sani la leptina sembra avere un ruolo importante nella regolazione del peso corporeo. In soggetti obesi le concentrazioni di leptina risultano elevate e, presumibilmente, vi è una down-regulation del recettore della leptina che conduce ad uno stato di leptino-resistenza, sia centrale che locale a livello epatico. È stata osservata l'insorgenza di steatosi epatica in topi mutanti per la leptina ed il suo recettore, a supportare un ruolo della leptina anche nell'accumulo di trigliceridi a livello epatico. Cohen et al. hanno dimostrato che la leptina, alle concentrazioni riscontrate nei soggetti obesi, induce insulino-resistenza epatica attraverso la defosforilazione del substrato 1 dell'insulino-recettore<sup>38</sup>.

Per ciò che concerne gli studi sulla resistina possiamo concludere che, rispetto alla leptina ed all'adiponectina, vi è una minore relazione di questa con la patogenesi della sindrome metabolica e della NAFLD. Tuttavia, recentemente, si è reso noto che elevati livelli di resistina contribuiscono a dare quadri patologici severi dal punto di vista istologico. La somministrazione di anticorpi anti-resistina ha fatto rilevare un miglioramento della glicemia e dell'azione dell'insulina in topi con obesità indotta dalla dieta.

#### **2.4 Ruolo degli sfingolipidi nella NAFLD**

Negli ultimi anni una delle classi lipidiche sulla quale si sta concentrando l'interesse dei ricercatori è quella degli sfingolipidi, soprattutto quelli più semplici quali sfingosine e ceramidi.

Diversi studi hanno mostrato il coinvolgimento di tali molecole lipidiche in numerosi pathways metabolici: infatti, oltre la funzione tipicamente strutturale, oggi sta emergendo sempre più il loro ruolo di secondi messaggeri in numerosi processi cellulari. In particolare, è stato dimostrato che le ceramidi costituiscono un intermedio chiave che lega certi nutrienti (grassi saturi) e le citochine infiammatorie (TNF- $\alpha$ ) all'induzione dell'insulino-resistenza. Il loro effetto di antagonizzare l'attività dell'insulina e la loro diretta relazione con le citochine ne spiega sia la tossicità, sia la capacità di indurre stati patologici come il diabete, le malattie cardiovascolari, l'aterosclerosi e la stessa steatosi<sup>39</sup>.

Dal punto di vista strutturale, tali composti sono caratterizzati dalla presenza di un ammino-alcol a catena lunga, la sfingosina, da un acido grasso (R) e un gruppo variabile (X) che li distingue in 2 sottoclassi (sfingomieline e glicosfingolipidi) e ne determina proprietà specifiche per ognuna di esse. Gli sfingolipidi sono molecole anfipatiche per la presenza di una porzione idrofobica (la sfingosina e la lunga catena acilica dell'acido grasso) e una testa polare variabile. Tale caratteristica garantisce loro la possibilità di permanere nelle membrane ed affacciarsi, contemporaneamente, verso il compartimento citoplasmatico o extracellulari acquoso. La loro funzione varia a seconda del tipo cellulare e del gruppo variabile. Nella figura 9 sono riportate le diverse molecole lipidiche in relazione alle variazioni dei gruppi X e R. Quando il primo è rappresentato dalla fosfocolina (PC), si forma sfingomielina, presente nella guaina mielinica che riveste gli assoni; se invece la porzione variabile è saccaridica, essa determina la formazione di vari tipi di glicolipidi quali i cerebrosidi, i globosidi ed i gangliosidi, mentre se è un atomo di idrogeno si origina una ceramide.



**Fig8:** struttura degli sfingolipidi



<b>-X</b>	<b>-R</b>	<b>LIPIDE</b>
<b>-OH</b>	<b>-H</b>	Sfingosina
<b>-PO<sub>4</sub></b>	<b>-H</b>	Sfingosina-1-Fosfato
<b>-OH</b>	<b>-FA</b>	Ceramide
<b>-PC</b>	<b>-FA</b>	Sfingomielina
<b>-Glc</b>	<b>-FA</b>	Glucosil ceramide
<b>-Gal</b>	<b>-FA</b>	Galattosil ceramide (Cerebroside)
<b>-Gal-3- SO<sub>4</sub></b>	<b>-FA</b>	Cerebroside solfato (Sulfatide)
<b>-Glc-(4-1)-Gal</b>	<b>-FA</b>	Lactosil ceramide

**Fig. 9:** Schema dei sostituenti sulla struttura base sfingolipidica. FA: Fatty Acid; PC: PhosphoCholine; Glc: Glucose; Gal: Galactose

## 2.5 Sintesi e metabolismo delle ceramidi

Le ceramidi sono, quindi, composti della sfingosina e di un acido grasso, a catena variabile, localizzate nelle membrane cellulari dove sono presenti in alta concentrazione. Costituiscono una delle componenti lipidiche fonte di sfingomielina, uno dei principali lipidi del doppio strato lipidico delle membrane cellulari. La sintesi *de novo* delle ceramidi dipende, sostanzialmente, dalla disponibilità di acidi grassi saturi a lunga catena, che sono limitanti nell'iniziale step del pathway biosintetico (fig.10)<sup>37</sup>. In particolare, in questa reazione, la serina palmitoil-transferasi (SPT) catalizza la condensazione del palmitoil-CoA e della serina per produrre 3-oxosfinganina. Le successive reazioni portano alla sintesi sequenziale di sfinganina, diidroceraide e ceramide; quest'ultima è un precursore di sfingolipidi complessi. SPT è altamente specifica per acidi grassi liberi con 16±1 atomi di carbonio; il secondo acido grasso-

CoA, il cui inserimento avviene durante la trasformazione della sfinganina in diidroceramide, può essere indifferentemente un acido grasso libero saturo o insaturo. Una volta formata, la ceramide può rapidamente essere deacilata dalla ceramidasi, fosforilata dalla ceramide-kinase o glucosilata dalla glucosilceramide sintasi; oppure, per aggiunta della fosforilcolina, può generare sfingomieline, che è il più comune derivato delle ceramidi presente nelle cellule, in una reazione catalizzata dalla sfingomieline sintasi, localizzata nel complesso del Golgi o nella membrana plasmatica. In alternativa, le ceramidi possono essere prodotte dall'idrolisi della sfingomieline catalizzata dalla sfingomielinasi acida o neutra, che rimuove il frammento di fosforilcolina dalla molecola. Questa via rappresenta il principale pathway del catabolismo della sfingomieline<sup>40</sup>.

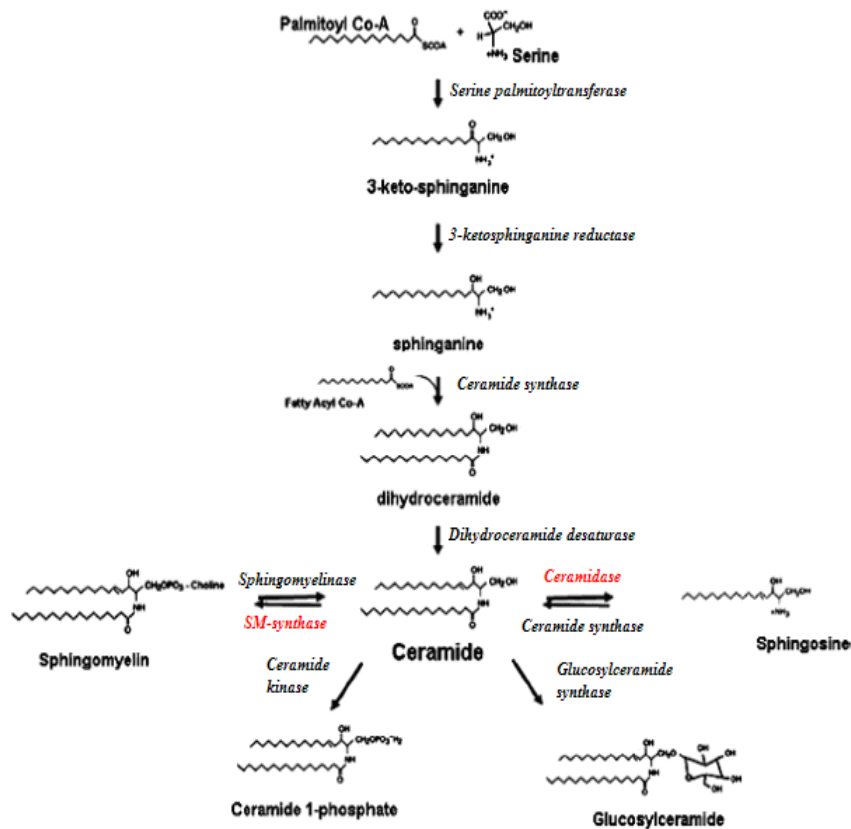


Fig. 10. Sintesi e metabolismo delle ceramidi.

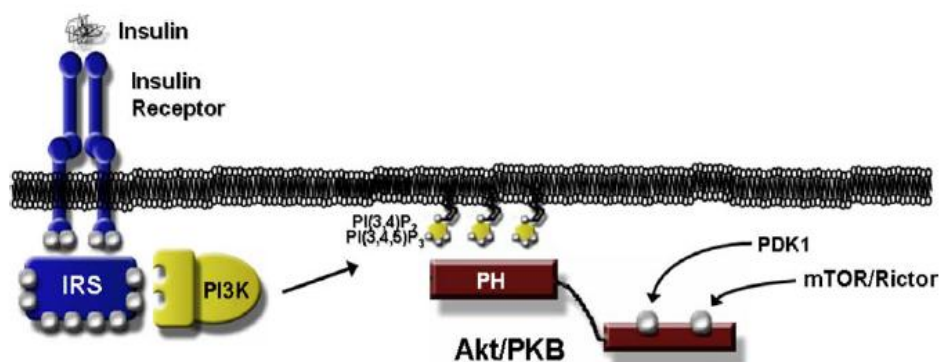
## 2.6 Targets della ceramide

La ceramide, a seconda dei tipi cellulari, si lega a differenti recettori, innescando a valle diversi effetti, in funzione del microambiente cellulare, della contemporanea attivazione di altri secondi messaggeri e dell'attività di enzimi che trasformano la ceramide in altri metaboliti.

Poiché la ceramide è coinvolta in diversi processi metabolici, la conoscenza delle basi molecolari della sua azione potrebbe rivelarsi indispensabile per la comprensione della patogenesi di svariate malattie (tumori, diabete, malattie cardiovascolari e neurodegenerative), compresa la NAFLD.

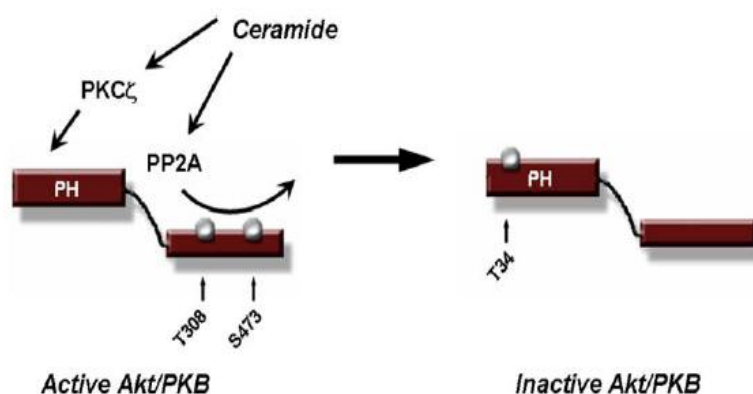
Diversi studi hanno dimostrato il ruolo chiave delle ceramidi nella regolazione dell'omeostasi glucidica e lipidica.

L'insulina è l'ormone che regola la clearance post-prandiale di carboidrati, lipidi e proteine dalla circolazione, promuovendone l'uptake e l'immagazzinamento nel fegato, nel muscolo scheletrico e nel tessuto adiposo. L'insulina avvia le sue azioni pleiotropiche attraverso una cascata di segnali intracellulari innescati dal suo recettore, una tirosin-kinasi eterotetramerica. Questo ha come substrati una famiglia di proteine IRS che, a loro volta, reclutano ed attivano una serie di enzimi effettori intracellulari, tra cui la fosfatidil-inositolo-3-kinasi (PI-3K), coinvolta nella produzione di fosfatidil-inositolo-3,4-bisfosfato e fosfatidil-inositolo-3,4,5-trifosfato, che reclutano enzimi citosolici verso la membrana plasmatica. In particolare, si legano al dominio PH di Akt/PKB, (fig.11), regolatore centrale dell'uptake di glucosio ed aminoacidi, nonché effettore nella sopravvivenza cellulare (es. protezione dall'apoptosi). Il legame coi lipidi rende disponibile due siti di fosforilazione, il cui accesso sarebbe altrimenti bloccato dal dominio PH; la fosforilazione di entrambi i siti è necessario per la completa attivazione dell'enzima.



**Fig. 11.** Attivazione di Akt/PKB da parte dell'insulina.

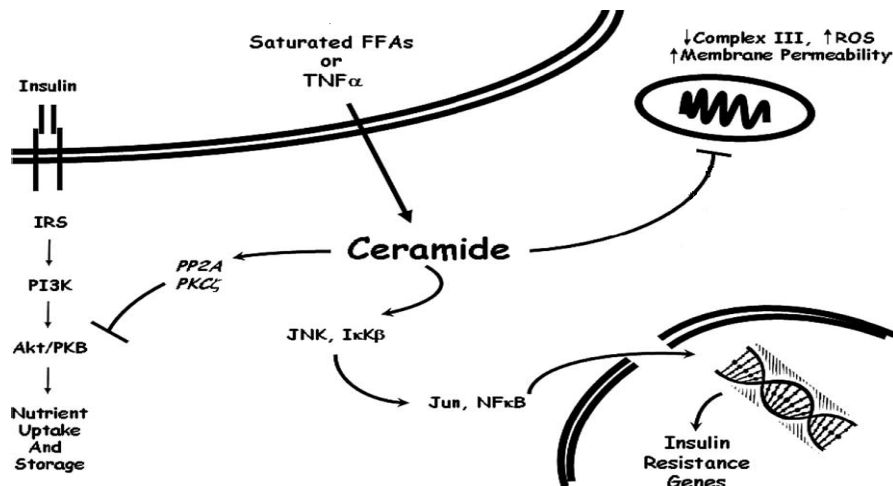
La ceramide regola Akt/PKB, inibendone la fosforilazione e, quindi l'attivazione, attraverso almeno due meccanismi indipendenti: nel primo, promuove la defosforilazione di Akt/PKB attivando direttamente PPA2, una fosfatasi responsabile della defosforilazione di Akt/PKB; nel secondo, attiverebbe un enzima PKC $\zeta$  che inibisce la traslocazione di Akt/PKB dal citoplasma alla membrana cellulare (fig.12)<sup>39</sup>.



**Fig.12:** Regolazione di Akt/PKB da parte della ceramide.

Studi recenti hanno mostrato che l'effetto inibente degli acidi grassi liberi (FFA) sull'azione dell'insulina possa avvenire attraverso un pathway che coinvolge proprio la ceramide: infatti trattando i miotubi in coltura con FFA saturi come il palmitato, aumenta il pool intracellulare di ceramide e, contemporaneamente, si ha una riduzione dell'attività di Akt/PKB<sup>40</sup>.

Altri studi hanno mostrato come l'inibizione, mediante miriocina, della palmitoil-transferasi, enzima che catalizza il primo step limitante del pathway biosintetico delle ceramidi, annulla gli effetti antagonisti del palmitato sul Akt/PKB. Inoltre, la overespressione della ceramidasi acida, enzima che catalizza la degradazione delle ceramidi in sfingosina, previene l'insulino-resistenza indotta dal palmitato. Tali studi suggeriscono fortemente che la ceramide è un intermedio obbligato che correla gli acidi grassi saturi all'inibizione dell'effetto dell'insulina. La figura 13 schematizza i processi metabolici che presuppongono un coinvolgimento più o meno diretto della ceramide.



**Fig.13:** Regolazione dei processi metabolici da parte della ceramide.

È stata dimostrata, inoltre, una relazione diretta tra TNF- $\alpha$  e ceramide, in cui il TNF- $\alpha$  sarebbe responsabile di un aumento del contenuto di ceramidi all'interno delle cellule dell'endotelio vascolare<sup>40</sup>; inoltre, potrebbe agire sulla sfingomielinasi e determinare un incremento della formazione di anione superossido, e in generale di ROS (reactive oxygen species) all'interno delle stesse cellule. Questi effetti sono stati trovati accentuati in studi sperimentali condotti su animali esposti a citochine infiammatorie, in cui la produzione epatica di lipoproteine arricchite in sfingomielina e ceramidi era significativamente aumentata<sup>41</sup>. D'altra parte è stato trovato che la ceramide promuove l'interleuchina-6 (IL-6) e, conseguentemente, la proteina C reattiva (PCR); questo dimostra i diretti effetti pro-infiammatori, nonché la partecipazione di tali molecole lipidiche alla patogenesi della NAFLD.

## 2.7 Ruolo degli acidi grassi nella NAFLD

Un aumento degli acidi grassi circolanti sembra essere un fattore determinante nella patogenesi della NAFLD.

Gli acidi grassi sono di rado liberi in natura, ma sono ampiamente presenti negli organismi viventi in forma esterificata come componenti principali di varie classi lipidiche (principalmente trigliceridi, fosfolipidi, esteri del colesterolo, sfingolipidi etc), presiedendo a varie funzioni strutturali, energetiche e metaboliche.

È noto che, rispetto all'ossidazione di proteine e carboidrati, quella degli acidi grassi genera più energia. Essi vengono depositati come riserve lipidiche nel tessuto adiposo, il quale è costituito da cellule metabolicamente attive, gli adipociti, che in caso di eccessivo introito calorico accumulano gli acidi grassi sotto forma di trigliceridi. Questi ultimi durante il digiuno vanno incontro a lipolisi con conseguente rilascio in circolo di acidi grassi liberi e glicerolo che vengono captati dal fegato.

Nel periodo post-prandiale, il rilascio di insulina dal pancreas comporta un aumento della lipogenesi ed una riduzione della lipolisi e dell'ossidazione mitocondriale degli acidi grassi. Pertanto una condizione di insulino-resistenza è correlata ad un aumento della lipolisi periferica e ad un incremento della liberazione di FFA.

Diversi studi hanno mostrato come un alto livelli di acidi grassi liberi giochi un ruolo chiave nella patogenesi della NAFLD. Tra i principali pathways coinvolti nel processo patogenetico di tale condizione ricordiamo uno stato di insulino-resistenza ed un'anomala produzione di citochine, mediatori dell'infiammazione.

Il primo potenziale meccanismo attraverso il quale gli FFA sembravano interferire con il segnale insulinico fu descritto nel 1963 dalla teoria del ciclo glucosio-acidi grassi di Randle<sup>42</sup>, la quale si basava sulla competizione tra substrati lipidici e glucidici nel processo ossidativo. Un incremento di FFA comporta un aumento dei livelli di acetyl-CoA, con conseguente riduzione dell'attività della piruvato deidrogenasi ed incremento del citrato citosolico. Ciò determina, infine, un decremento della glicolisi e dell'uptake del glucosio.

Da recenti studi è emerso come un incremento degli FFA comporta un accumulo di derivati lipidici, quali ceramidi e diacilglicerolo (DAG), con conseguente effetto inibente sull'azione dell'insulina.

Inoltre è stato mostrato che un accumulo di FFA induce il rilascio, da parte degli adipociti o dei macrofagi infiltrati nel tessuto adiposo, di elevati livelli di citochine, interferendo in tal modo con la trasmissione del segnale insulinico e attivando i processi infiammatori che sono poi responsabili del danno epatico.

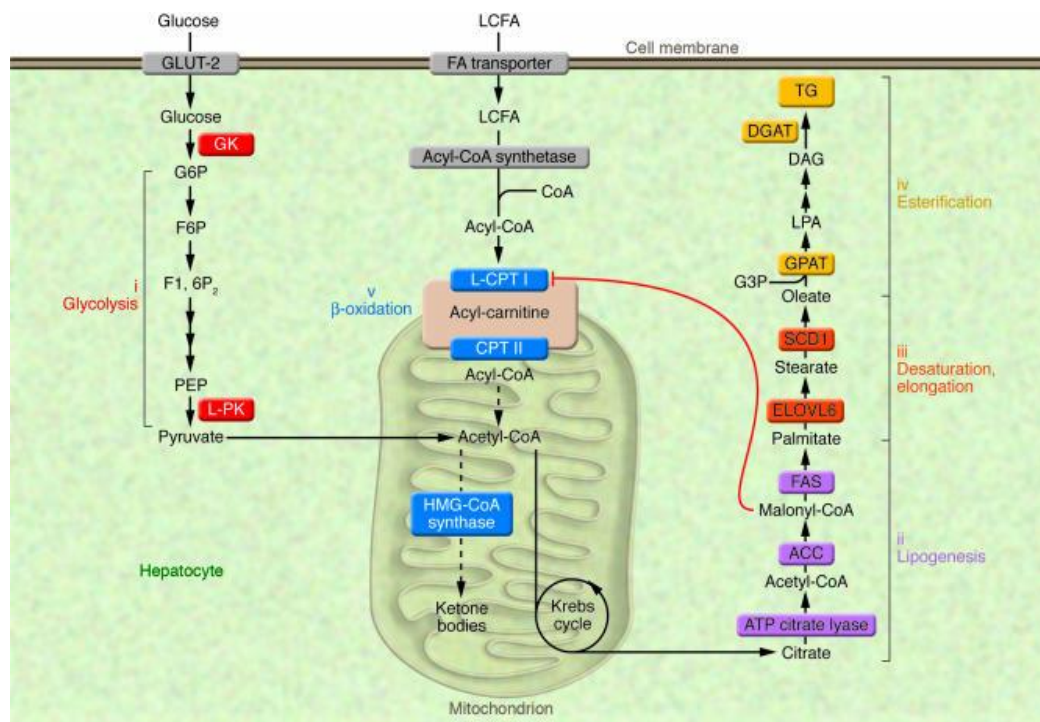
A conferma di ciò è stato osservato che in pazienti con NASH i livelli sierici di FFAs sono aumentati.

Il pool di acidi grassi disponibili per la sintesi di trigliceridi dipende dall'equilibrio che si instaura tra produzione e consumo.

Gli FFA immagazzinati nel tessuto adiposo rappresentano la principale fonte di TG epatici; sono presenti anche altre fonti quali la *lipogenesi epatica de novo* (DNL) e gli

acidi grassi introdotti con la dieta, che possono entrare nel fegato per “diffusione” (in presenza di un surplus di acidi grassi) o attraverso l’uptake epatico dei chilomicroni remnants.

Diversi studi hanno dimostrato un’aumentata DNL epatica in soggetti con NAFLD rispetto ai soggetti sani. In effetti l’insulina up-regola due enzimi centrali nella DNL epatica, ovvero l’Acetil-CoA carbossilasi (ACC) e la sintetasi degli acidi grassi (FAS); gli stessi enzimi sono down-regolati dall’adiponectina.



**Fig. 14:** Le vie metaboliche della sintesi dei trigliceridi nell’epatocita.

La  $\beta$ -ossidazione degli acidi grassi, uno dei pathway fondamentali per la produzione di energia soprattutto in condizioni di digiuno prolungato o di esercizio fisico, avviene nei mitocondri.

L’enzima che promuove l’ingresso degli acidi grassi attraverso la membrana mitocondriale è la Carnitina Palmitoil Transferasi I.

L’aumento delle disponibilità di acidi grassi nella NAFLD induce un incremento della  $\beta$ -ossidazione mitocondriale, fino alla saturazione del sistema, un’aumentata produzione di acetyl-CoA, di NADH e FADH (ciclo di Krebs) e del trasporto di elettroni attraverso la catena respiratoria: meccanismo potenzialmente responsabile della produzione di ROS<sup>43</sup>.

Numerosi studi hanno dimostrato che l'enzima stearoyl-CoA desaturase-1 (SCD-1) gioca un ruolo importante in molte patologie del metabolismo incluse l'obesità, l'insulino resistenza e la dislipidemia.

Mentre nel topo sono presenti diverse isoforme del gene codificante la SCD, nell'uomo è stato individuato solo un gene funzionale localizzato sul cromosoma 10.

L'espressione della proteina è ubiquitaria, raggiungendo alti livelli nei tessuti lipogenici come fegato e tessuto adiposo; i fattori che ne regolano maggiormente l'espressione sono la dieta ricca di contenuto glucidico e lipidico, nonché ormoni quali insulina, estrogeni, GH.

L'SCD è il principale enzima lipogenico coinvolto nella sintesi degli acidi grassi monoinsaturi (MUFA), in particolare l'oleico ed il palmitoleico (figura 15), che sono i MUFA più rappresentati nei fosfolipidi di membrana, nei trigliceridi, negli esteri del colesterolo<sup>44</sup>.

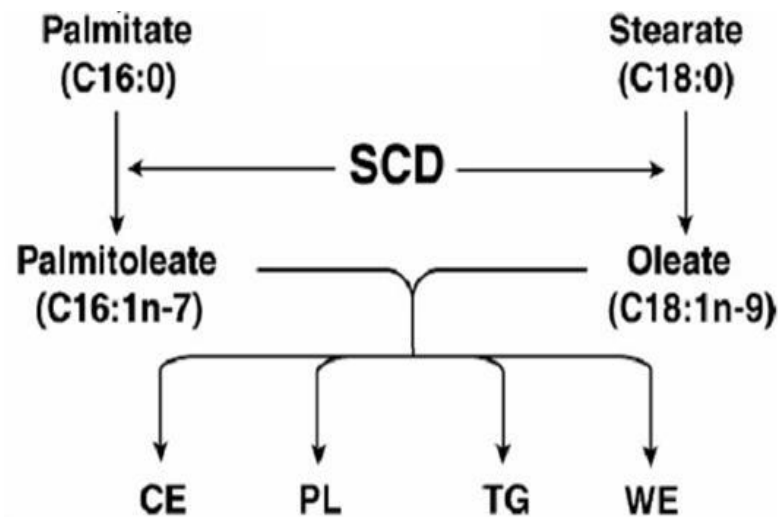


Fig. 15: Reazioni catalizzate dall'enzima SCD-1.



Per capire meglio il ruolo della SCD-1 nel metabolismo epatico è necessario osservare cosa accade nella condizione di un suo deficit.

Attraverso studi condotti su topi knockout, Jiang et al.<sup>45</sup> hanno dimostrato che l'inibizione della SCD-1 previene l'obesità indotta da una dieta ad elevato contenuto di grassi e la steatosi epatica. Gutiérrez-Giàrez<sup>46</sup> hanno invece osservato la capacità di prevenire l'insulino-resistenza epatica dieta-indotta a seguito di una inibizione a breve termine dalla SCD-1.

Tali studi sottolineano l'importante ruolo svolto dalla SCD nelle patologie metaboliche quali obesità, insulino resistenza e la steatosi epatica.

Tuttavia, nonostante i numerosi studi effettuati, ad oggi, non si conosce con certezza il meccanismo attraverso il quale SCD-1 o il suo prodotto, i MUFA, influenzano il metabolismo.

### 3 EPATITE VIRALE C (HCV)

Le malattie epatiche rappresentano un problema di notevole interesse sia dal punto di vista epidemiologico che clinico e socio-sanitario. Circa il 70% dei casi è riconducibile ad infezioni virali e circa 250 milioni di soggetti sono affetti dal virus dell'epatite C (HCV). Sicuramente anche altri fattori possono essere determinanti, oltre ai virus epatitici; in quest'ottica un ruolo chiave è assunto da fattori quali l'abuso alcolico, l'obesità e gli stati dismetabolici.

È bene sottolineare che il danno epatico cronico di qualsivoglia natura, se protratto nel tempo, conduce inevitabilmente ad uno stato patologico che può evolvere fino alla cirrosi epatica o sviluppare un tumore primitivo del fegato (epatocarcinoma) o, ancora, manifestarsi in una condizione di insufficienza d'organo. Eventi che, inesorabilmente, determinano il decesso di migliaia di individui o la necessità di trapianto epatico.

Da un punto di vista clinico è noto che le malattie epatiche possono assumere un andamento progressivo e caratterizzato da persistente citolisi epatocitaria e deposizione di fibrosi nel lobulo, fino allo stesso sovvertimento della struttura interessata, allo sviluppo di cirrosi e scompenso epatico. Il virus dell'epatite C è stato identificato come entità nosologica solo dal 1989<sup>47,48</sup>. Indipendentemente dalla modalità di trasmissione dell'infezione, dopo una fase acuta, che spesso è asintomatica, si assiste ad una cronicizzazione dell'infezione. Questa seconda fase di malattia va dallo stato di portatore asintomatico a forme croniche di variabile attività ed evolutività, fino allo stadio di cirrosi ed alla frequente degenerazione in epatocarcinoma.

L'insorgenza della cirrosi, intesa come stato di sovvertimento sclero-nodulare del parenchima epatico, è il momento più importante nell'evoluzione della patologia e si ritiene che interessi circa il 30% dei soggetti<sup>49</sup>. Dal momento in cui si instaura la cirrosi inizia una fase irreversibile che, in 10-15 anni, porta nella maggior parte dei casi allo scompenso epatico e all'insorgenza di complicanze (ascite, epatocarcinoma) e, spesso, rende necessario il trapianto epatico<sup>50</sup>. La malattia, riconducibile ad un'infezione dell'agente HCV, fu all'inizio denominata *epatite non-A e non-B*. L'identificazione dell'agente responsabile fu molto difficile per le sue caratteristiche e, solamente grazie all'avvento di tecniche biomolecolari fu possibile identificarlo e caratterizzarlo nel 1988, definendolo virus dell'epatite C (HCV). Il genoma di HCV è costituito da una molecola di RNA a filamento singolo e di senso positivo ed ha molta similarità con i *Pestivirus* e *Flavivirus*. HCV viene classificato in un genere a sé stante, *Hepacivirus*

della famiglia *Flaviviridae*. Ha forma sferica, è provvisto di pericapside (envelope) ed ha diametro di circa 36-62 nm e densità di circa 1,08g/mL.

Il genoma di HCV è costituito da una molecola di RNA di circa 9400 nucleotidi e viene tradotto in un unico polipeptide dal quale per successiva digestione si generano le diverse proteine virali. L'RNA genomico è caratterizzato da una parte codificante centrale e da due estremità non-codificanti<sup>51</sup>. La porzione HCV è caratterizzato da estrema variabilità genomica che ha portato alla distinzione di 6 diversi genotipi, caratterizzati da una omologia di sequenza del 65%, all'interno dei quali si identificano diversi sottotipi, con omologia superiore al 90%. L'attuale nomenclatura internazionale<sup>52</sup> considera sei tipi di HCV, suddivisi in 11 sottotipi strutturalmente correlati, cioè con una omologia del 77-79%, mentre variabili individuali entro un singolo sottotipo possono avere similarità di sequenza superiore all'88%. I genotipi 1, 2 e 3 sono ubiquitari, mentre quelli di tipo 4 e 5 sono presenti in Africa e il genotipo 6 in Asia.

In seguito all'infezione da HCV, l'azione di diversi mediatori dell'infiammazione contribuisce al reclutamento di cellule infiammatorie a livello del fegato per contrastare la replicazione virale. In questa prima fase la risposta immunitaria è in grado di controllare abbastanza efficacemente la replicazione virale, tant'è vero che nei pazienti immunocompromessi (pazienti HIV positivi o trapiantati) si ha una rapida progressione della malattia con danno epatico severo. D'altro canto, l'azione delle cellule immunitarie ed infiammatorie reclutate può a loro volta contribuire al danno necrotico-infiammatorio con conseguente fibrosi epatica. La cirrosi è lo stadio finale di questa progressione. Il fegato, per resistere a questa infiammazione persistente subisce una serie di modifiche che consistono nella proliferazione dei dotti biliari e nella formazione di setti fibrosi. Quest'ultimi conferiscono al fegato cirrotico la caratteristica forma nodulare. All'esame microscopico del fegato cirrotico si notano la formazione di piccoli vasi sanguigni lungo i setti e la generazione di organi simili-linfoidi. La conseguenza di questo processo è la distruzione dell'architettura epatica con alterazione del flusso sanguigno epatico seguito da alterazioni metaboliche ed immunologiche del fegato. Come detto, durante l'infezione da HCV, l'infiammazione cronica, la rigenerazione tessutale e la fibrosi sono gli elementi che portano alla progressiva riduzione della funzionalità epatica. I mediatori dell'infiammazione e della risposta immunitaria sono i principali regolatori di questi processi quindi i maggiori responsabili dell'esito di un infezione da HCV. Quando la risposta immunocompetente fallisce durante l'infezione,

come purtroppo avviene frequentemente con HCV, si stabilisce un'infezione cronica. Questa provoca infiammazione, rigenerazione e fibrosi che può esitare in cirrosi ed epatocarcinoma.

#### **4 CORRELAZIONE TRA INFEZIONE HCV E METABOLISMO LIPIDICO**

L'infezione HCV ed il metabolismo lipidico sono strettamente correlati, come dimostrato dal fatto che il ciclo vitale del virus, in tutte le sue fasi (circolazione ematica del virus, uptake nelle cellule epatiche e successivo efflusso, replicazione), è mediato dalle molecole lipidiche<sup>53</sup>. Inoltre la steatosi epatica è frequentemente riscontrata in pazienti affetti da epatite C cronica (CHC), nell'ordine dal 40% all'80% dei casi, con percentuali attorno al 40%, dopo esclusione di tutte le cause note di steatosi epatica<sup>5</sup>.

Secondo questa classificazione dei pazienti, esistono (e verosimilmente coesistono, in gran parte dei casi) probabilmente due distinti pathways, *virale* e *metabolico*, inducenti steatosi. In particolare, evidenze cliniche e sperimentali suggeriscono che il genotipo 3 (G3) dell'HCV può interferire direttamente con il metabolismo lipidico attraverso almeno tre distinti, non mutuamente esclusivi, meccanismi (mancato bilanciamento dei processi di secrezione e degradazione, nonché incremento del processo di sintesi<sup>54</sup>, mentre il genotipo 1 (G1) dell'HCV è generalmente considerato privo di qualunque attività intrinseca steatogena, agendo piuttosto come promotore dell'insulino-resistenza (IR), un fattore di rischio ben noto, in termini di steatosi<sup>55</sup>.

I pazienti G1 CHC mostrano un'elevata prevalenza di IR ed è stato accertato che l'HCV promuova direttamente IR a livello epatico e periferico, attraverso differenti meccanismi molecolari (up-regulation del tumor necrosis factor- $\alpha$ , down-regulation di soppressori del cell signaling delle citochine e della protein-fosfatasi PPA2) in un complesso contesto in cui i primitivi disordini metabolici e genetici, verosimilmente, giocano un ruolo di primo piano<sup>56</sup>.

La rilevanza clinica della steatosi in soggetti CHC, specialmente indotti dal G1, è principalmente ascrivibile all'abilità del genotipo in questione di interferire direttamente con la naturale evoluzione della CHC, essendo la steatosi indipendentemente associata con la severità e la progressione della fibrosi epatica<sup>57</sup>, con il carcinoma epatocellulare<sup>58</sup> e con l'assenza di risultati terapeutici dopo terapia con PEG-inteferone e ribavirin<sup>57</sup>.

Sebbene alcuni studi abbiano valutato l'alterazione del profilo lipidomico epatico, in soggetti NAFLD, attraverso un approccio metabolomico<sup>44,59</sup>, esistono pochi dati relativi

alla composizione del grasso epatico<sup>1,61</sup> ed alla presenza di specifiche molecole lipidiche associate al grado di severità del danno epatico, nei soggetti CHC, malgrado la rilevante prevalenza della steatosi in questi pazienti. Gli sfingolipidi (SL), una classe eterogenea di lipidi polari, e gli acidi grassi (FA) è noto giochino un ruolo di primo piano nel processo di accumulo dei grassi a livello epatico, promuovendo il danno d'organo<sup>63,64</sup>.

## 5 LA SPETTROMETRIA DI MASSA

La spettrometria di massa è una tecnica analitica di delucidazione strutturale basata sulla ionizzazione di una molecola e sulla sua successiva frammentazione in ioni di diverso rapporto massa/carica ( $m/z$ ). A differenza delle tecniche spettroscopiche, però, questo è un metodo d'analisi distruttivo (la molecola non rimane intatta dopo il processo) e, soprattutto, non si basa sull'interazione tra radiazioni e materia. Il principio su cui si basa consiste nella ionizzazione della molecola in esame, attraverso l'espulsione di un elettrone; il catione radicalico che ne deriva (*ione molecolare*) in parte si frammenta dando molecole e/o radicali neutri (non rilevati dallo strumento), in parte generando cationi e/o radicali cationi (*ioni frammento*). Lo ione molecolare ed i vari ioni che si originano per frammentazione (cationi e radicali cationi) sono, quindi, discriminati sulla base del loro rapporto massa/carica e rivelati da un detector. L'esperimento di spettrometria di massa consiste dunque nella *ionizzazione* di molecole in fase gassosa, nella *separazione* dei diversi ioni prodotti e nella loro *rivelazione*. Il risultato di questo processo è lo *spettro di massa* che rappresenta l'abbondanza relativa degli ioni, in funzione del loro rapporto massa/carica<sup>65</sup>.

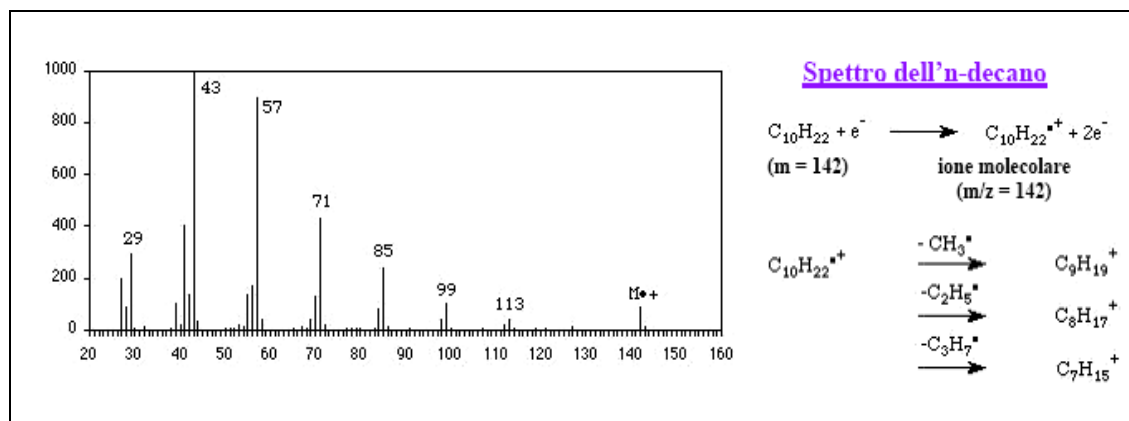


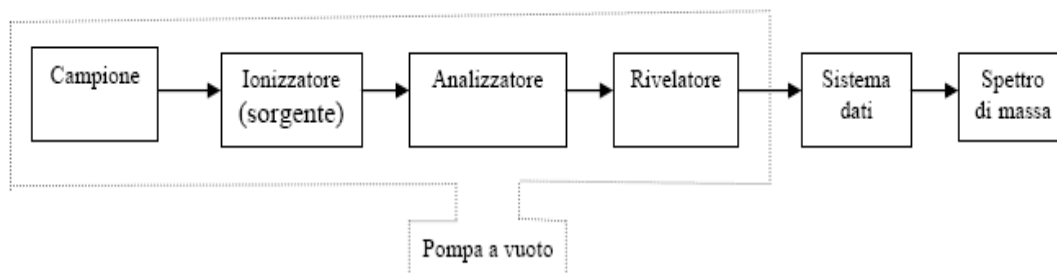
Fig. 16: Spettro di massa del n-decano.

Questa tecnica consente di misurare le masse molecolari, sia nominali che esatte, e di ottenere dei profili di frammentazione specifici per ciascun composto, di cui costituiscono quindi un'impronta digitale. Si può così individuare la formula di struttura di composti sconosciuti, anche avendone a disposizione piccole quantità.

## 5.1 Lo spettrometro di massa

L'interpretazione dello spettro di massa consiste nello studio dei segnali dovuti agli ioni generati nell'esperimento, dai quali si può ricostruire a ritroso la struttura molecolare originale.

Lo spettrometro di massa può essere così schematizzato:



Da notare che il vuoto (che si aggira intorno ai  $10^{-6} \div 10^{-5}$  torr) è necessario per impedire una perdita di ionizzazione a causa dell'urto con i gas atmosferici.

## 5.2 Introduzione del campione (Sample Inlet System)

L'introduzione del campione nella camera di ionizzazione può essere operata sia allo stato solido, usando una sonda, che allo stato liquido o gassoso, usando un sistema di valvole; queste permettono di accedere alla camera di ionizzazione senza che questa venga a contatto con l'esterno. La quantità di prodotto necessario per registrare uno spettro è dell'ordine dei  $\mu\text{g}/\text{ng}$ .

È possibile interfacciare lo spettrometro di massa con l'uscita di un sistema GC o HPLC. Queste tecniche "accoppiate", note come GC-MS e HPLC-MS, sono estremamente utili nell'analisi di miscele di prodotti.

## 5.3 Camera di ionizzazione

Quando una molecola viene investita, in fase vapore, da un fascio di elettroni di notevole energia cinetica si può avere, per urto, la sua ionizzazione a ione positivo o negativo. In genere gli strumenti sono regolati per lavorare unicamente con ioni positivi, i quali possono, spontaneamente o per urto, decomporsi in una serie di frammenti di massa inferiore e questi a loro volta in altri.

Ogni molecola avrà, quindi, una propria *frammentazione caratteristica e specifica* che dipenderà sia dalla natura delle molecole, sia dalle condizioni operative di ionizzazione.

Il campione viene ionizzato in un'apposita camera di ionizzazione, in cui il fascio di elettroni viene prodotto da una *sorgente ionica*, un componente del sistema che varia a seconda della tecnica utilizzata. In genere gli elettroni sono emessi da un filamento incandescente di tungsteno o di renio e passano attraverso un condotto, generante il raggio, nella parte centrale della camera dove è localizzato il campione gassoso. La frazione di elettroni che non urta contro le molecole è raccolta da un'apposita trappola, le molecole che non sono ionizzate sono allontanate dalla pompa ad alto vuoto, mentre quelle ionizzate sono accelerate e convogliate verso l'analizzatore.

Il sistema di ionizzazione svolge un ruolo essenziale nella spettrometria di massa, perché da esso dipende anche il numero, la natura e l'abbondanza dei frammenti molecolari che compaiono nello spettro di massa. Per questo motivo le tecniche utilizzate sono numerose e alcune di esse danno origine a particolari varianti nella spettrometria di massa. Tra i vari dispositivi, alcuni consentono di analizzare solo frammenti positivi, altri invece, permettono la rivelazione anche di ioni negativi. Inoltre alcune tecniche di ionizzazione sono decisamente potenti, operano cioè ad alta energia e portano ad una frammentazione spinta (*tecniche hard*), altre invece operano a bassa energia producendo un numero inferiore di ioni (*tecniche soft*).

## 5.4 Sorgenti

In base al tipo di sorgente utilizzata, la ionizzazione primaria del campione viene realizzata in vario modo. Le tecniche più utilizzate sono:

- 1) Impatto elettronico (E.I)
- 2) Ionizzazione chimica (C.I.)
- 3) Electrospray (E.S.I.)

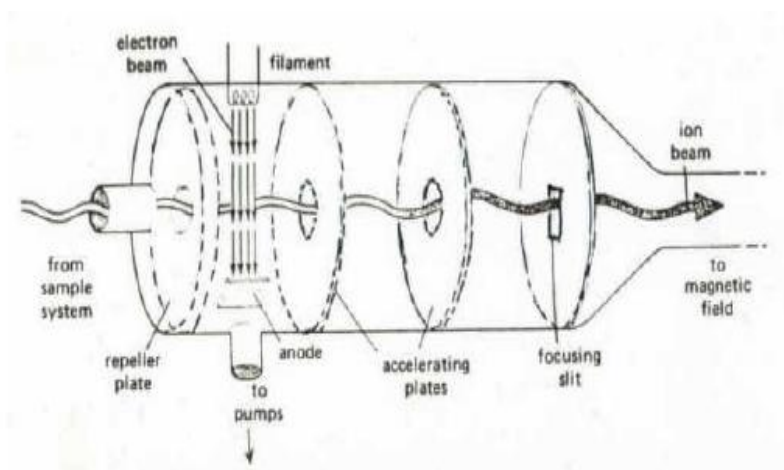
### *1) Impatto elettronico (E.I.), Electronic Impact Ionization:*

La ionizzazione per impatto elettronico è la tecnica più comune. Un filamento di tungsteno incandescente emette un fascio di elettroni che, accelerati verso un anodo posto dalla parte opposta al filamento, acquistano un'elevata energia ( $\approx 70$  eV). Quando questi elettroni vengono a contatto con la sfera elettronica di una molecola (electronic



impact) le trasferiscono la loro energia, provocando l'espulsione di un elettrone con formazione di un radical catione (*ione molecolare*)  $M^{+\bullet}$ .

Poiché l'energia necessaria per ionizzare una molecola organica è di circa 13-14 eV, i radical cationi sono prodotti ad un'energia vibrazionale molto alta che ne può determinare la frammentazione con formazione di un radicale e di un catione.



Tutti gli ioni positivi (cationi e radical cationi) sono respinti da una piastra, tenuta ad un potenziale positivo, verso una serie di piastre forate, tenute a potenziale positivo crescente, dette piastre acceleratrici.

Nel loro tragitto, gli ioni subiscono un'accelerazione proporzionale al potenziale  $V$  delle piastre acceleratrici e vengono espulsi, attraverso una fenditura di uscita, con un'energia cinetica:

*Energia cinetica acquistata dagli ioni:*  $\frac{1}{2} m \cdot v^2 = z \cdot V$

- $m$  è la massa dello ione
- $v$  è la velocità dello ione
- $z$  è la carica ionica (in genere = 1)
- $V$  è il potenziale della griglia

Si può, quindi, far percorrere agli ioni la giusta traiettoria per giungere al rivelatore, variando l'intensità del campo magnetico  $B$ , oppure quella del potenziale delle griglie  $V$  (di solito si fa variare  $B$ ). Così per ogni valore  $B \cdot r / V$  arriveranno al rivelatore solo gli ioni che possiedono il valore  $m/z$  soddisfacente la precedente equazione. Questo tipo di ionizzazione è *hard*. Gli ioni vengono generati ad un livello energetico molto alto e si possono avere frammentazioni estese che lasciano poco o nulla dello ione molecolare.

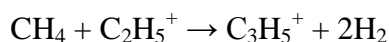
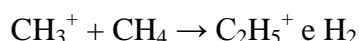
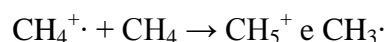
Per risolvere questo problema sono state messe a punto altre tecniche di ionizzazione, dette tecniche *soft* (e sono le seguenti).

## 2) Ionizzazione chimica (C.I.), Chemical Ionization

La ionizzazione chimica viene utilizzata quando gli ioni molecolari prodotti con il metodo dell'impatto elettronico sono troppo poco stabili e si frammentano completamente.

Questa è una tecnica di ionizzazione *mild*, consistente nell'interazione tra il campione vaporizzato ed un reagente ionizzato che, di solito, è un acido di Brønsted-Lowry in fase gassosa.

I più usati reagenti, di questo tipo, sono quelli derivanti dalla ionizzazione ad impatto elettronico:

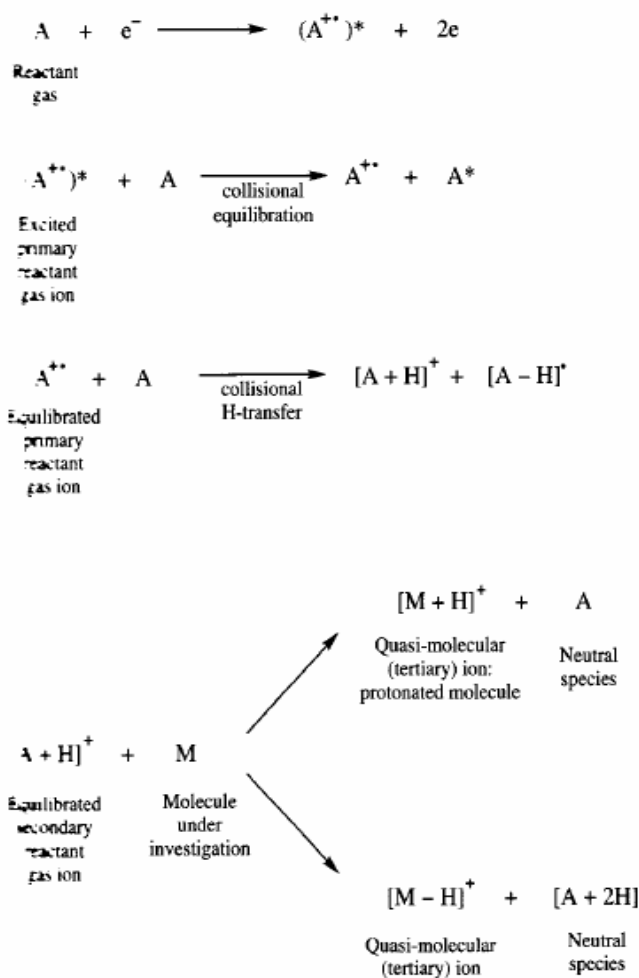


Se la molecola M ha un'affinità per il protone più alta di quella del metano, allora si avrà la formazione dello ione M-H<sup>+</sup>.



Gli ioni M-H (detti *quasimolecolari*) non possiedono una energia così elevata e, quindi, subiscono una minore frammentazione. In genere la ionizzazione chimica dà dei frammenti più significativi di quanto non faccia la ionizzazione elettronica. Infatti dopo C.I. i legami C-C tendono a rompersi solo se il prodotto della rottura è particolarmente stabile. Frequentemente lo scheletro degli atomi di carbonio rimane intatto e il cleavage è limitato a legami tipo C-O, C-S, C-N. Ne deriva che la C.I. è particolarmente adatta a molecole come idrocarburi, alcoli, esteri, ammine, amminoacidi e piccoli peptidi che in condizioni di E.I. darebbero una frammentazione eccessiva.

In pratica il metodo consiste nell'introdurre, insieme al campione, del metano in forte eccesso. Statisticamente sarà il metano ad essere ionizzato per impatto elettronico, generando  $\text{CH}_4^+$ ; questo addotto, incontrando un'altra molecola di  $\text{CH}_4$ , forma  $\text{CH}_3^+$  e  $\text{CH}_5^+$ , che funziona da acido per una molecola organica M, generando l'acido coniugato  $\text{MH}^+$ . Questa specie non viene generata ad un livello vibrazionale eccitato e non frammenta. La particolarità è che nello spettro vedremo lo ione molecolare + 1.



### 3) Ionizzazione elettrospray (E.S.I.), Electron Spray Ionization

Il campione, sciolto in un solvente polare, è nebulizzato a pressione atmosferica dentro la camera di ionizzazione attraverso un ago tenuto ad un alto potenziale elettrico. Le goccioline di spray, caricate positivamente per azione del campo elettrico, vengono attratte verso una "lente di estrazione di ioni" che, grossolanamente, è costituito da un capillare mantenuto sotto vuoto ed a potenziale negativo; in tal modo il solvente evapora e gli ioni carichi sono accelerati verso l'analizzatore.

Questa tecnica di ionizzazione è largamente usata negli strumenti HPLC-MS.

## 5.5 Analizzatore

L'analizzatore consente di differenziare gli ioni generati in base al loro rapporto massa/carica.

I più comuni sono:

- L'analizzatore magnetico
- L'analizzatore a doppia focalizzazione
- L'analizzatore a quadrupolo
- L'analizzatore a trappola ionica

### *Analizzatore magnetico*

È l'analizzatore più usato, perché consente di ottenere le risoluzioni migliori. È costituito da un tubo lungo circa 1 metro, piegato con un raggio di curvatura  $r$  ed immerso in un campo magnetico  $H$ . Gli ioni che escono dalla camera di ionizzazione entrano nel tubo analizzatore e, per effetto del campo magnetico, subiscono una deviazione dalla loro traiettoria rettilinea (*deflessione*). La nuova traiettoria curvilinea ha un raggio di curvatura  $r$  che è direttamente proporzionale alla quantità di moto dello ione ( $mv$ ) ed inversamente proporzionale al campo magnetico  $H$ .

Le relazioni in gioco sono le seguenti:

$$\text{Energia cinetica degli ioni: } \frac{1}{2} m \cdot v^2 = z \cdot V$$

$z$  = carica ionica

$V$  = potenziale di accelerazione

$$\text{Interazione campo magnetico / ione: } H \cdot z = (m \cdot v / r) \quad H z = m v / r$$

$H$  = intensità del campo magnetico

$r$  = raggio di deflessione

Poichè dall'energia cinetica degli ioni abbiamo che:

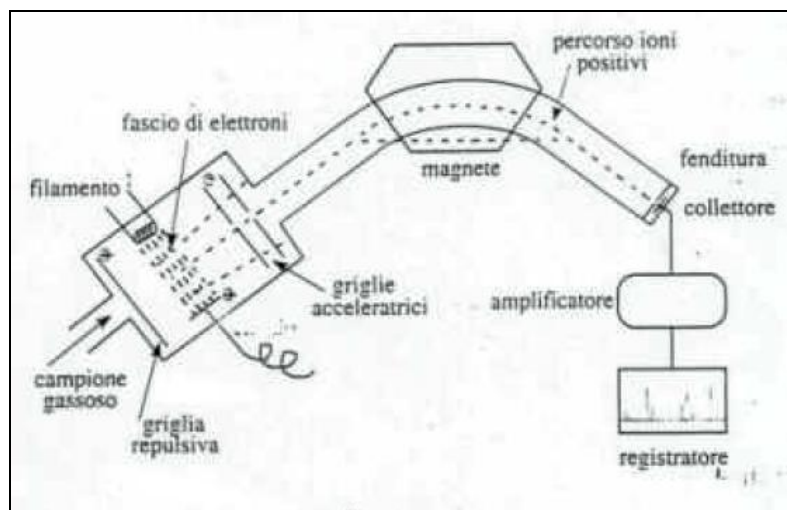
$$v^2 = 2 \cdot z \cdot V / m$$

Combinando la prima espressione con la seconda si ottiene:

$$H^2 \cdot z^2 = \frac{2 \cdot z \cdot V \cdot m}{r}$$

$$\frac{m}{z} = r^2 \cdot \left[ \frac{H^2}{2V} \right]$$

Di conseguenza, per un certo valore della coppia H e V esisterà un solo valore di massa m per cui il raggio di deflessione r coincide con il raggio di curvatura del tubo r'. Gli ioni che hanno questo valore di massa escono dal tubo, gli altri no. Operando a potenziale V costante e facendo una scansione di campo H è possibile fare uscire dal tubo gli ioni a diversa massa in tempi diversi. Gli ioni che escono dal tubo vengono raccolti da un fotomoltiplicatore che traduce l'intensità degli ioni in corrente elettrica (rivelatore). Gli strumenti sono tarati (si usano dei perfluorocheroseni) in modo che a ciascun valore di campo corrisponda un certo valore di massa. In questo modo la corrente ionica è registrata in funzione non del campo B, ma della massa m. Si ottiene così lo *spettro di massa*, che è un istogramma che riporta in ascisse i valori di massa crescente (gli strumenti sono tarati in genere da 30 a 1000 uma) e in ordinate la corrente ionica.



**Fig. 17:** Percorso degli ioni positivi.

### *Analizzatore a doppia focalizzazione*

Aggiungendo dopo l'analizzatore magnetico un filtro elettrostatico, il percorso degli ioni positivi viene focalizzato ulteriormente in direzione dal campo elettrico statico. Nel settore elettrostatico gli ioni non vengono separati in funzione del rapporto massa/carica, ma solo focalizzati in base alla loro energia traslazionale; questo perché altrimenti nel settore successivo, quello magnetico, ioni con ugual rapporto  $m/z$  ma differente energia traslazionale seguirebbero traiettorie diverse, diminuendo la risoluzione dello strumento. Così la risoluzione può raggiungere 100.000 e oltre. Ciò permette di misurare la *massa esatta* fino alla quarta cifra decimale. Gli spettrometri ad alta risoluzione di questo genere sono apparecchiature complicate e costose e, quindi, il loro impiego non è molto diffuso.

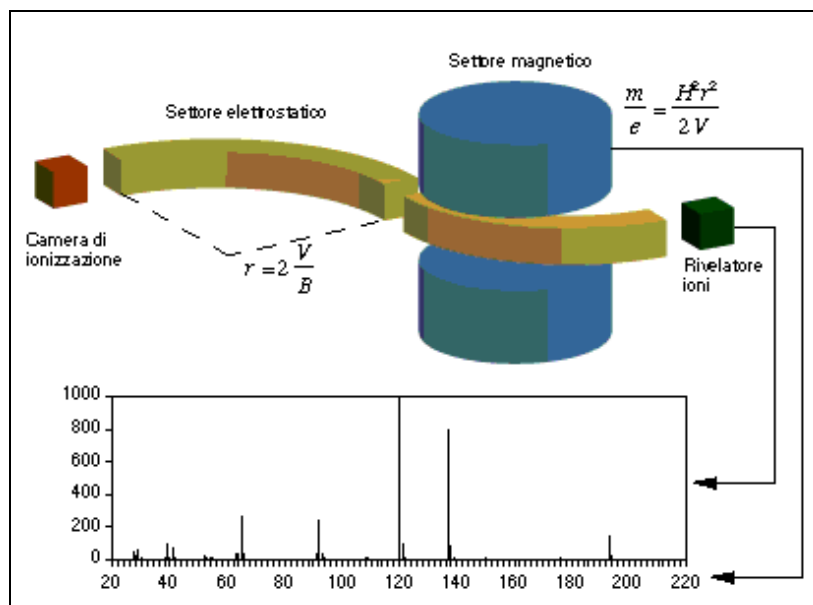
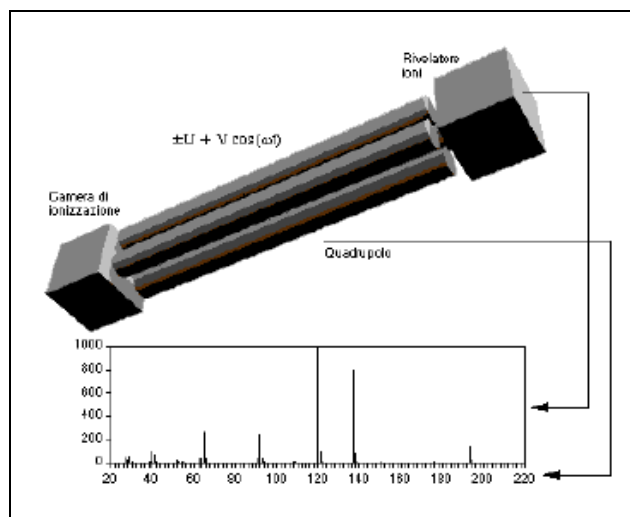


Fig. 18: Analizzatore a doppia focalizzazione.

### *Analizzatore a quadrupolo*

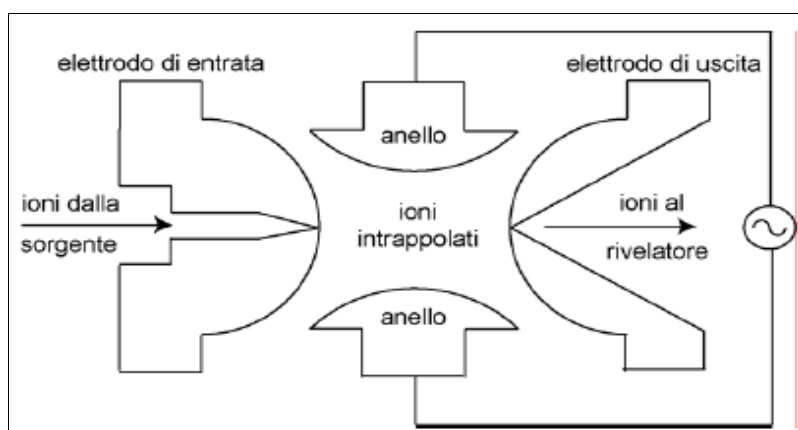
È costituito da quattro barre cilindriche metalliche, lunghe circa 20 cm. che delimitano il "cammino" percorso dagli ioni provenienti dalla camera di ionizzazione e diretti al detector. Le barre sono mantenute ad un potenziale elettromagnetico oscillante, in modo che quando le due sbarre verticali hanno potenziale positivo, quelle orizzontali hanno potenziale negativo (e viceversa). Gli elettroni, accelerati dalle piastre, entrano nel tunnel delimitato dalle barre, dove vengono respinti dai poli positivi ed attratti dai negativi. Tuttavia, a causa dell'oscillazione del quadrupolo, gli ioni assumono una traiettoria a zigzag e finiscono con lo scaricarsi su una delle barre, tranne quelli che, per un certo valore di frequenza di oscillazione, possiedono un'energia cinetica tale per cui il moto diventa sinusoidale e riescono ad uscire dal tunnel ed entrare nel sistema di rivelazione (fotomoltiplicatore). Operando, quindi, una scansione di frequenza di oscillazione del campo è possibile far uscire ioni a massa molecolare crescente. Rispetto all'analizzatore a tubo, il quadrupolo ha una risoluzione più bassa (< 1000), ma tempi di scansione inferiori ed un minor costo.



**Fig. 19:** Analizzatore a quadrupolo.

### *Analizzatore a trappola ionica*

Può essere considerato una variante dell'analizzatore a quadrupolo; questo dispositivo, infatti, anziché permettere agli ioni di attraversare il campo del quadrupolo, trattiene tutti gli ioni al suo interno. Questa variante dell'analizzatore a quadrupolo usa tre elettrodi (un elettrodo anulare posto fra due elettrodi semisferici di entrata e uscita) per intrappolare ed accumulare gli ioni in una cavità di volume ristretto, la cosiddetta trappola ionica (ion trap), al fine di ottenere un'elevata sensibilità. I due elettrodi laterali hanno un piccolo foro al centro, attraverso il quale passano gli ioni. Lo spettro di massa è generato variando il potenziale elettrico in modo da espellere in sequenza, dalla trappola verso il rivelatore, gli ioni secondo un valore  $m/z$  crescente.



**Fig. 20:** Analizzatore a trappola ionica.



## Analizzatore a tempo di volo (TOF)

Il principio su cui si basa questo analizzatore è che ioni di differente valore massa/carica hanno uguale energia, ma differente velocità dopo l'accelerazione subita nella camera di ionizzazione.

Ne deriva che il tempo che ciascuno impiega per attraversare l'analizzatore è differente.

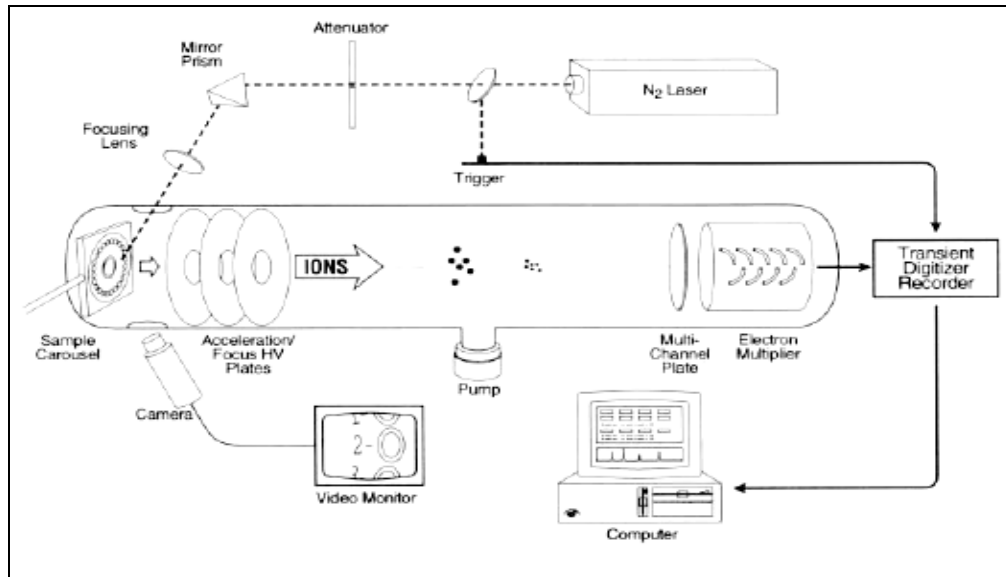


Fig. 20: Analizzatore a tempo di volo.

## 5.6 Ion Cyclotron Resonance (FT-MS)

Gli ioni generati da un filamento vengono intrappolati in una cella cubica, in cui per opera di un campo magnetico unitamente ad un campo elettrico assumono un'orbita cicloidale con frequenza dipendente dal rapporto  $m/z$ .

## 5.7 Tandem Mass Spectroscopy (MS/MS)

In questa spettrometria si usano due spettrometri di massa in serie.

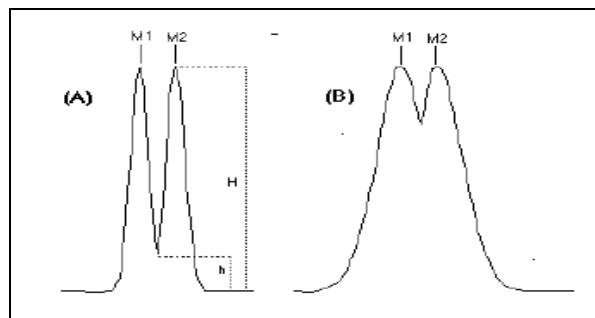
## 5.8 Rivelatore

Come collettore e rivelatore degli ioni si usa comunemente un moltiplicatore elettronico, costituito da una serie di elettrodi in cascata. Quando uno ione arriva sul primo elettrodo questo emette un fascio di elettroni che vanno a colpire il secondo elettrodo, il quale a sua volta emette una quantità maggiore di elettroni e così via.

Il risultato è una forte amplificazione del segnale che viene poi digitalizzato ed elaborato dal calcolatore dello spettrometro, per l'elaborazione dello spettro di massa. Naturalmente, nel caso del metodo FTMS il sistema di rivelazione è invece un ricevitore di radiofrequenza che, a sua volta, è collegato al calcolatore per l'analisi di Fourier dell'interferogramma, da cui si ottiene lo spettro di massa<sup>65,66</sup>.

### 5.9 Risoluzione dello strumento

Il potere risolutivo dello strumento determina la capacità di separare tra di loro ioni di uguale massa nominale, ma di diversa massa esatta. Nell'esame delle caratteristiche di uno strumento è necessario stabilire cosa si intenda per "separare". Nella figura, gli ioni sono in entrambi i casi separati, ma ovviamente la risoluzione è maggiore nel caso A. I dati di potere risolutivo sono per convenzione misurati su coppie di segnali separati tra di loro da una valle (h) alta il 10% dell'altezza (H).



**Fig. 21:** Esempificazione del potere risolutivo dello strumento.

Il potere risolutivo viene quindi definito come:

$$\text{Potere Risolutivo} = \frac{\text{Massa 1}}{\text{Massa 2} - \text{Massa 1}}$$

La risoluzione di uno strumento può essere regolata agendo su fenditure micrometriche che restringono la dispersione del fascio ionico. Riducendo l'ampiezza delle fenditure aumenta la risoluzione (fino al limite dello strumento), ma diminuisce la sensibilità (meno ioni raggiungono il rivelatore).

Il livello di informazione che possiamo ottenere da uno spettrometro di massa dipende dal suo potere risolutivo. Strumenti a bassa risoluzione forniscono solo la massa nominale degli ioni. Strumenti ad alta risoluzione forniscono la massa esatta degli ioni che, in genere, definisce univocamente la composizione elementare degli ioni corrispondenti.

Ad esempio, in uno strumento a bassa risoluzione CO, C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> ed N<sub>2</sub> forniscono un unico segnale a massa nominale 28; in uno strumento ad alta risoluzione si possono osservare invece tre ioni separati di massa esatta.

Lo strumento in questo caso per separare CO da N<sub>2</sub> si dovrà usare uno strumento che abbia un potere risolutivo:

$$\frac{28}{28,006148 + 27,994915} = \frac{28}{0,011233} = 2492,65 \approx 2500$$

Per risolvere picchi con differenze di rapporto m/z inferiori ci vogliono strumenti con potere risolutivo maggiore.

### 5.10 Lo spettro di massa

Lo spettro di massa si presenta, quindi, come un insieme di linee verticali (*picchi*) di intensità diversa, ciascuna corrispondente al valore di massa di uno ione frammento.

Il picco a valore di massa più elevato è quello relativo allo ione molecolare. In genere, la corrente ionica è normalizzata a 100, ossia il picco più alto (*picco base*) ha valore 100, indipendentemente dal suo valore assoluto.

Dallo spettro di massa si può risalire, dunque, alla struttura di un composto incognito, attribuendo ai singoli ioni una composizione elementare e ricostruendo i meccanismi di frammentazione seguendo schemi tipici per le varie classi di composti.

Nell'interpretazione di uno spettro si segue una procedura abbastanza semplice:

- identificazione dello ione molecolare
- identificazione di ioni caratteristici
- identificazione di processi di frammentazione caratteristici
- ricostruzione della struttura della molecola sulla base della conoscenza di meccanismi di frammentazione standard<sup>67</sup>

### 5.11 Il picco dello ione molecolare

Lo ione molecolare si genera dalla molecola originale M per eliminazione di un elettrone: è un radicale catione contenente un elettrone a spin spaiato, indicato dal simbolo •



La sua massa è praticamente uguale a quella della molecola originaria, dato che la perdita di massa dovuta all'espulsione dell'elettrone è trascurabile. In pratica, assegnando con certezza il picco dello ione molecolare di una sostanza pura si determina immediatamente la massa molecolare M. Tuttavia il picco può essere poco intenso o addirittura assente nel caso di molecole facilmente frammentabili (l'intensità del picco dipende dalla stabilità della specie che lo genera); la sua intensità è maggiore per molecole lineari e minore per molecole ramificate, inoltre in una serie omologa diminuisce all'aumentare della massa molecolare. In generale si osserva la seguente scala di intensità per le diverse classi di composti organici:

- Picco molto intenso aromatici > olefine coniugate > alcani a catena lineare corta.
- Picco poco intenso chetoni > ammine > esteri > eteri > acidi, aldeidi, ammidi, alogenuri.
- Picco assente molecole ramificate, alcoli terziari, nitrili, nitrocomposti.

In generale quindi, a parità di struttura, l'intensità del picco decresce all'aumentare del PM. Nel dubbio, se il picco è troppo basso, si può ricorrere alla misura alternativa dello spettro con ionizzazione chimica, che essendo più blanda dell'impatto elettronico dà

poca frammentazione ed un picco intenso corrispondente alla massa  $M + 1$ . Se infatti agissimo diminuendo la differenza di potenziale tra filamento ed anodo (nell'impatto elettronico) dai normali 70 eV a 10÷15 eV, il picco aumenterebbe di intensità, ma diminuirebbe in modo marcato la sensibilità dello strumento. In certi casi l'identificazione del picco dello ione molecolare può essere verificata con la cosiddetta *regola dell'azoto*, secondo cui:

1. Se la molecola contiene solamente C, H, O, S, Alogeni o un numero pari di atomi di azoto, lo ione molecolare è di massa nominale **pari**.
2. Se la molecola contiene un numero dispari di atomi di azoto, la massa nominale dello ione molecolare è **dispari**. Lo stesso discorso vale per la massa nominale.

### 5.12 Picchi isotopici

Il picco dello ione molecolare è spesso accompagnato da altri picchi, in genere più deboli, a massa  $M+1$ ,  $M+2$  etc, dovuti ai cosiddetti *isotopomeri*, cioè alle molecole contenenti isotopi degli elementi che le costituiscono. La maggior parte degli elementi che compongono i composti organici, infatti, possiede diversi isotopi naturali, di cui di solito il più leggero è il più abbondante. Per tre elementi – carbonio, idrogeno e azoto – il principale isotopo pesante è quello la cui massa è superiore di un'unità a quella dell'isotopo più comune. Quando questi elementi sono presenti in un composto organico lo spettro di massa mostra dei piccoli picchi isotopici a  $M+1$ . Nel caso di ossigeno, zolfo, cloro e bromo, le masse dei principali isotopi pesanti sono superiori di due unità a quelle degli isotopi più abbondanti. Perciò la presenza di questi elementi è rivelata dai picchi isotopici a  $M+2$ . Dallo studio dei picchi isotopici e conoscendo le percentuali di abbondanza naturale dei vari isotopi, è possibile risalire alla formula molecolare. Inoltre la presenza di alcuni atomi come cloro e bromo, che hanno composizioni isotopiche peculiari ( $^{35}\text{Cl}$  e  $^{37}\text{Cl}$  3:1;  $^{79}\text{Br}$  e  $^{81}\text{Br}$  circa 1:1), può facilmente essere ipotizzata, osservando le intensità dei picchi isotopici dello ione che rispecchieranno quelle relative all'abbondanza naturale dell'atomo in questione.

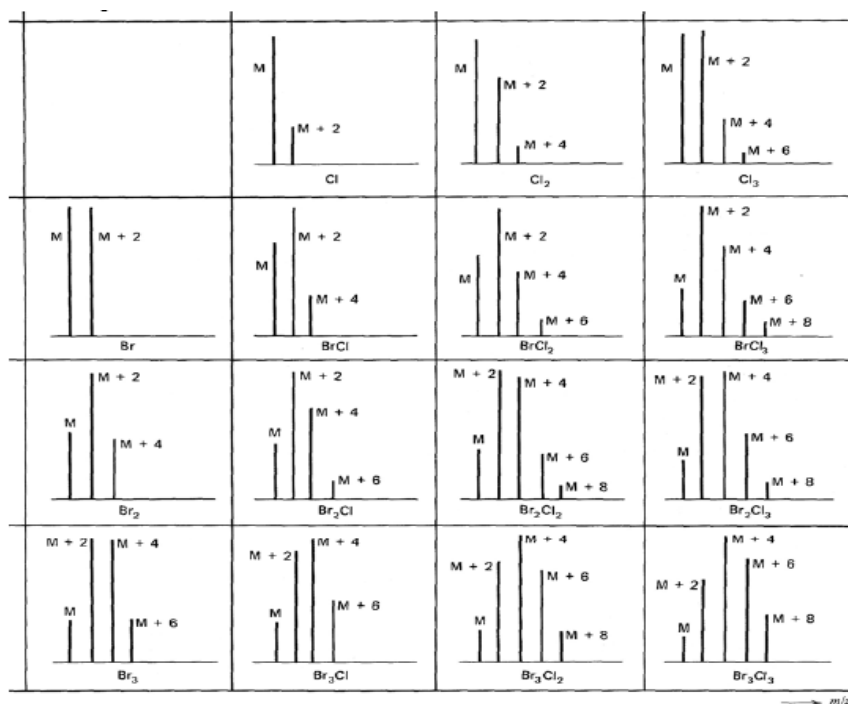


Fig. 22: Rappresentazione dei picchi isotopici.

Se nella molecola sono presenti solo C, H, N, O, F, P, I, le intensità percentuali approssimative attese per (M+1) ed (M+2) possono essere calcolate usando le seguenti formule:

$$\%(M + 1) = [(1.1 \cdot \text{numeri atomici di C}) + (0.38 \cdot \text{numeri di atomi di N})]$$

$$\%(M + 2) = [(1.1 \cdot \text{numeri atomici di C})^2 / 200 + (0.2 \cdot \text{numeri di atomi di O})]$$

In generale, diciamo che se in una molecola sono presenti più di un atomo di un elemento costituito da due isotopi, le abbondanze dei picchi si ottengono dal risultato della seguente espressione binomiale:

$$(a + b)^m$$

a = % abbondanza isotopo più leggero

b = % abbondanza isotopo più pesante

m = numero degli atomi dell'elemento presente nella molecola

### 5.13 Ioni doppiamente carichi

Come detto, lo spettro di massa si presenta come un insieme di righe verticali (*picchi*), ciascuna corrispondente ad un certo valore di massa  $m$ . Il picco a valore di  $m$  più elevato è lo ione molecolare, gli altri corrispondono a ioni-frammento derivati per frammentazione dello ione molecolare. L'altezza dei picchi è normalizzata a 100. Il picco più alto è il *picco base*; questo corrisponde allo ione-frammento più stabile e può coincidere o meno con lo ione molecolare. Nella camera di ionizzazione (soprattutto quando si usa l'elettrospray) può accadere che alcuni ioni subiscano un'ulteriore sottrazione di elettroni, con formazione di *ioni doppiamente carichi* ( $M^{++}$ ). Questi vengono focalizzati come se fossero ioni di massa  $(M/2)^+$ . Nonostante questo fenomeno sia molto raro, è comunque corretto mettere in ascisse non la massa  $m$ , ma il rapporto  $m/z$ , dove  $z$  è la carica dello ione.

### 5.14 Ioni metastabili

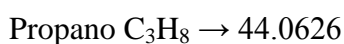
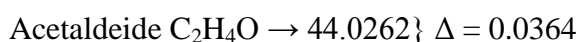
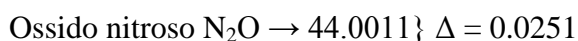
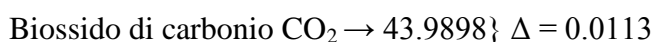
Spesso la frammentazione di uno ione  $m_1$  non avviene nella camera di ionizzazione, ma nella zona immediatamente precedente l'analizzatore magnetico, per dare uno ione di massa  $m_2$ . L'energia traslazionale dello ione  $m_2$  sarà  $(m_2/m_1)$  eV. Ne deriva che lo ione formatosi  $m_2$  non apparirà ad un valore di  $m/z$  eguale ad  $m_2$  bensì ad:

$$m^* = m_2^2/m_1$$

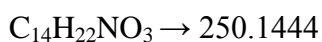
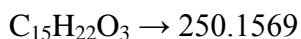
Ioni di tale tipo vengono detti metastabili; sono riconoscibili perché hanno valori non interi di  $m/z$ , sono più larghi e meno abbondanti dei picchi normali. Correlando i picchi di massa  $m_1$  ed  $m_2$ , ossia trovando quali sono i picchi, che soddisfano l'equazione  $m^*$ , si possono estrarre importanti informazioni sulle molecole e le loro frammentazioni<sup>67,68</sup>.

### 5.15 Spettri di massa esatta

Gli spettrometri ad alta risoluzione permettono di determinare la massa con una accuratezza fino alla quarta cifra decimale, ciò che comunemente si definisce la *massa esatta*. Dato che le masse dei nuclidi non sono intere, la massa molecolare esatta è un parametro che caratterizza univocamente la formula bruta della sostanza. Es. quattro molecole di massa 44 e differenti formule brute hanno le seguenti masse esatte:



La differenza minima 0.01 è facilmente misurabile con uno spettrometro avente una risoluzione di almeno  $44/0.01=4400$ . Naturalmente all'aumentare della massa molecolare è necessaria risoluzione maggiore. Per esempio le due molecole di massa circa 250:



differiscono di 0.0125 e quindi la risoluzione deve essere  $250/0.0125 = 20000$ . Ma anche questo valore è raggiungibile da spettrometri ad alta risoluzione ( $\approx 100000$ ). La massa esatta può essere determinata anche indirettamente, facendo un confronto della massa nominale con lo spettro di una sostanza di riferimento di cui sia nota la massa esatta. Poiché:

$$\frac{m}{z} = \frac{B^2 r^2}{2V}$$



mantenendo costante B e facendo variare il potenziale di accelerazione V si può calcolare il valore di m/z confrontandolo col rapporto tra m/z e V di un picco di riferimento di cui si conosce la massa esatta.

La conoscenza della massa esatta e quindi della formula bruta permette il calcolo del *grado di insaturazione (GI)* che definisce la somma del numero dei doppi legami, degli anelli e del doppio dei tripli legami presenti nella molecola. Il GI si calcola con la formula

$$GI = \text{Tetravalenti} - \frac{\text{Monovalenti}}{2} + \frac{\text{Trivalenti}}{2} + 1$$

**Atomi Tetravalenti = C, Si, etc.**

**Atomi Trivalenti = N, P, etc.**

**Atomi Monovalenti = H, Alogeni, etc.**

### 5.16 Frammentazione

Lo ione molecolare è una specie estremamente ricca di energia e, specialmente nel caso di molecole complesse, le sue sorti possono essere molto diverse. Esso può decomporsi in varie modalità ed i frammenti prodotti possono subire un ulteriore processo di scissione<sup>68,69</sup>. Le principali frammentazioni delle molecole organiche si distinguono in:

Scissioni primarie (avvengono sullo ione molecolare)

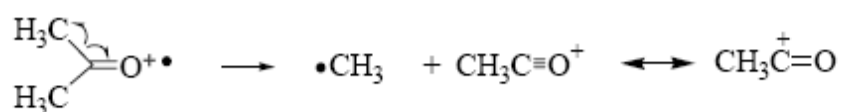
Scissioni secondarie (avvengono sui frammenti)

Scissioni semplici (con rottura di un legame semplice fra due atomi)

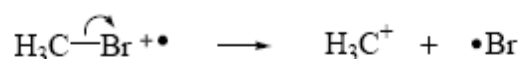
Scissioni multiple o riarrangiamenti (reazioni di frammentazione con rottura di due legami covalenti)

Ricordiamo, inoltre, che la scissione di un legame sullo ione molecolare può essere *omolitica*, cioè con separazione dei due elettroni del legame, oppure *eterolitica* senza separazione.

Esempio di scissione omolitica:



Esempio di scissione eterolitica:

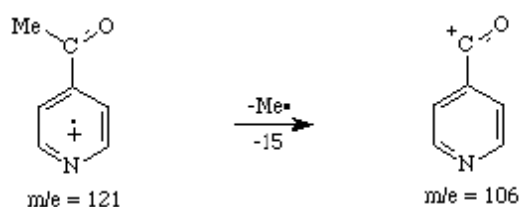
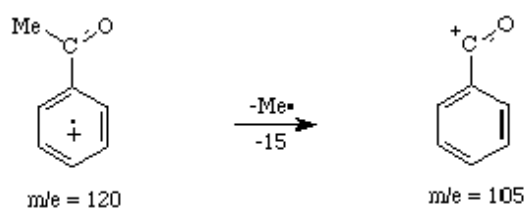


### Scissioni primarie

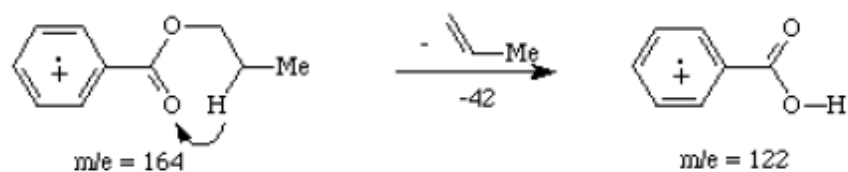
Sono quelle che avvengono direttamente sullo ione molecolare. Si verificano con perdita di un radicale (a numero dispari di elettroni)<sup>69</sup>.

Forniscono un frammento cationico a numero pari di elettroni. Se lo ione molecolare non contiene azoti ed ha quindi massa pari, i frammenti così generati hanno massa dispari.

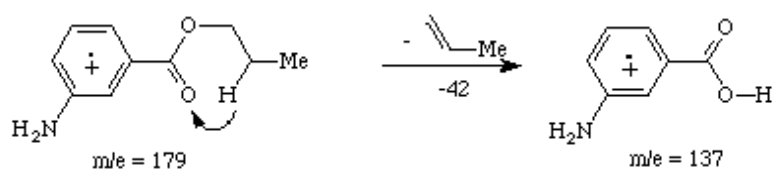
Se ione molecolare e frammenti contengono un numero dispari di atomi di azoto, la regola è invertita.



con perdita di una molecola neutra. Il frammento è ancora un radicale catione a numero dispari di elettroni. Se nella molecola non sono contenuti atomi di azoto, le masse nominali di ione molecolare e frammento sono in questo caso entrambe pari.

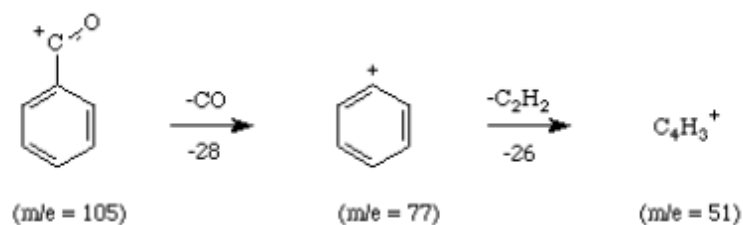


Se è presente un atomo di azoto (o in generale un numero dispari di atomi di azoto) nello ione molecolare e nel frammento carico, entrambe le masse sono dispari.



### Scissioni secondarie

Gli ioni generati dalle frammentazioni primarie possono ancora contenere un eccesso di energia e possono subire a loro volta processi di frammentazione:

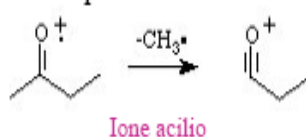


### Scissioni semplici

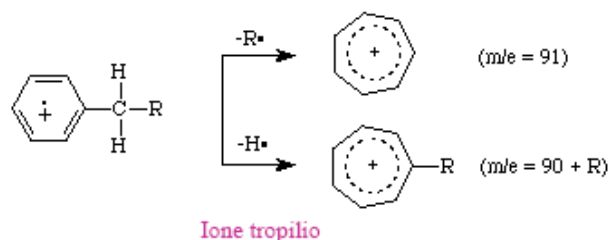
Sono reazioni di frammentazione con rottura di un legame semplice tra due atomi. Quando queste scissioni interessano il catione radicalico producono sempre un catione ed un radicale libero. Possono essere di vario tipo:

**SCISSIONI IN  $\alpha$  ATTIVATE**, avvengono in  $\alpha$  ad eteroatomi e a gruppi funzionali.

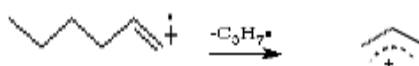
I legami carbonio-carbonio adiacenti al gruppo carbonilico di un'aldeide o di un chetone si rompono con relativa facilità in quando si formano ioni acilio stabilizzati per risonanza.



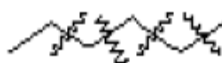
**SCISSIONE BENZILICA**, negli alchilbenzeni si verifica la perdita di un atomo di idrogeno o di un radicale metilico con formazione dello ione tropilio (ione estremamente stabile). Questa frammentazione si traduce in un picco molto intenso a  $m/z$  91.



**SCISSIONE ALLILICA**; frequentemente la frammentazione degli alcheni produce carbocationi allilici.



**SCISSIONI IN  $\alpha$  NON ATTIVATE**, frammentazioni che avvengono in composti che non hanno eteroatomi e non hanno particolari insaturazioni (idrocarburi alifatici).



M-15; M -29; M -43; ecc.

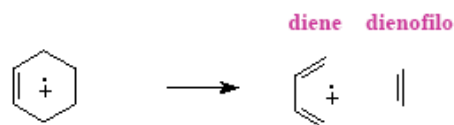
### Scissioni multiple (o riarrangiamenti)

Sono reazioni di frammentazione con rottura di due legami covalenti.

Quando si verificano a carico di uno ione radicale i prodotti sono un altro catione radicale ed una molecola neutra

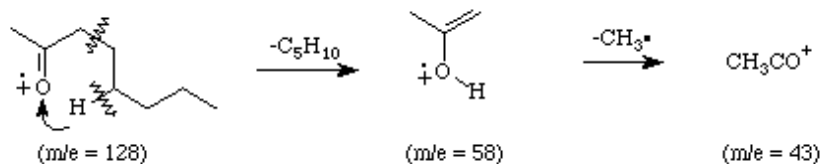
**CICLOREVERSIONE DI DIELS-ALDER:** generalmente sistemi ciclici insaturi a sei termini possono dare una reazione di Diels-Alder inversa, con formazione di un alchene (dienofilo) e di un catione radicale (diene).

Es.



**TRASPOSIZIONE DI MCLAFFERTY:** questo riarrangiamento è tipico dei chetoni, degli acidi e degli esteri alifatici.

L'idrogeno migrante si deve trovare sull'atomo in  $\gamma$  rispetto a quello portante l'eteroatomo, in modo che si possa avere uno stato di transizione ciclico a sei membri.



## 6 USO DI ISOTOPI STABILI NELLO STUDIO DEI SISTEMI BIOLOGICI

La diretta misurazione della attività metabolica o del flusso attraverso critici pathway biochimici con isotopi stabili potrebbe dare una precisione analitica e una quantificazione necessaria per prendere decisioni circa la farmacologia e la tossicologia di nuove sostanze chimiche. Infatti, gli isotopi stabili e i radioisotopi sono stati usati per decenni dai biochimici e dai fisiologi per misurare le attività di pathway metabolici in vivo. Tuttavia questi approcci, di recente, sono stati limitati ai laboratori accademici a causa della loro complessa natura e del loro basso throughput.

L'uso dei traccianti isotopici può essere applicato anche in vitro, su modelli cellulari per analizzare il flusso metabolico (produzione, degradazione) di una determinata molecola.

Determinare flussi attraverso i pathway metabolici è fondamentale per capire regolazioni metaboliche ancora sconosciute. Le misure statiche della composizione lipidica forniscono indicatori validi di outcomes di equilibrio di processi regolatori, mentre l'analisi di pathway cinetici e dinamici definisce gli effetti regolatori inerenti al normale metabolismo, allo sviluppo e alla malattia. L'uso di precursori marcati con isotopi stabili per studiare le dinamiche della sintesi dei lipidi ha avuto un'evoluzione distintiva. Infatti Schoenheimer e Rittenberg<sup>70</sup>, nei loro studi in vivo, dopo aver infuso giornalmente acqua deuterata  $^2\text{H}_2\text{O}$  in topi nutriti con una dieta senza grassi, tra il 21° e il 98° giorno dall'infusione estraevano dal fegato gli acidi grassi, per valutare la quota di acidi grassi deuterati<sup>70</sup>. Uno studio di arricchimento isotopico in vitro, usando un isotopo stabile del palmitato [1,2,3,4- $^{13}\text{C}_4$ ] su cellule HL60 e conducendo un'analisi di distribuzione di massa dei suoi isotopomeri, ha permesso di studiare il metabolismo di ceramidi esogene a lunga catena<sup>71</sup>.

## 6.1 Traccianti isotopici

Si definisce tracciante “tracer” una sostanza introdotta in un sistema in equilibrio (INPUT) allo scopo di valutare i parametri cinetici del metabolita oggetto dello studio che viene definito tracciato o “tracce “. Per definizione le formule matematiche riferite al tracciante vengono indicate in minuscolo, quelle del tracciato in maiuscolo. Ad esempio le masse del tracciante/tracciato al tempo t sono indicate come q(t)/Q(t). Lo studio dei traccianti nasce dall’ utilizzo di isotopi rari, normalmente non presenti, o presenti in bassa concentrazione, all’ interno dell’ organismo e la cui introduzione dall’ esterno nel sistema biologico permette di rappresentare un input quasi ideale. Ogni elemento atomico ha diversi isotopi di cui uno è più abbondante in natura, altri rari

	$^{12}\text{C}$	98,89%	$^1\text{H}$	99,985%
es:	$^{13}\text{C}$	1,11%	$^2\text{H}$	0,015%
	$^{14}\text{C}$	$\cong 0\%$	$^3\text{H}$	$\cong 0\%$ (sono radiattivi e instabili)

Negli studi con traccianti tali isotopi sono inseriti in molecole che fungono da tracciante in relazione al sistema in esame: nel caso del metabolismo del Glucosio possiamo avere un tracciante radioattivo [1-  $^{14}\text{C}$ ] Glucosio dove l’atomo in posizione 1 è marcato con o l’analogo stabile [1-  $^{13}\text{C}$ ] Glucosio. Negli studi sul metabolismo proteico possono essere somministrati aminoacidi marcati, sia radioattivi come la [35S] Metionina o stabili come la [1- $^{13}\text{C}$ ] Leucina. Gli isotopi atomici rappresentano dei traccianti quasi ideali. Un tracciante ideale deve : a) essere indistinguibile per l’organismo rispetto al metabolita che deve tracciare b) essere misurabile con precisione c) essere innocuo per l’organismo d) non perturbare il sistema. I traccianti utilizzati negli studi cinetici appartengono a due grandi classi:

**traccianti radioattivi:** ogni isotopo radioattivo decade in modo costante e specifico emettendo energia di decadimento che è la grandezza misurata in:

unità di misura:

**dps** (disintegrazioni per sec.) Bequerel

**dpm** (disintegrazioni per mm.)

**curie** ( $3.7 \times 10^{10}$  dps)

Il tracciante radioattivo è instabile, in quanto scompare dall' organismo in relazione alla eliminazione da parte del corpo umano ma anche alla sua velocità di decadimento espressa come equazione differenziale del tipo:

$$\frac{dP^*}{dt} = -\lambda P^* \quad \text{oppure semplificando} \quad P^* = P_0 e^{-\lambda t}$$

dove  $P_0$  rappresenta la quantità iniziale. Il tempo di dimezzamento ( $t_{1/2}$ ) è il tempo impiegato per avere  $P_0/2$  ed è espresso come

$$t_{1/2} = \ln(2)/\lambda \quad \text{es :}$$

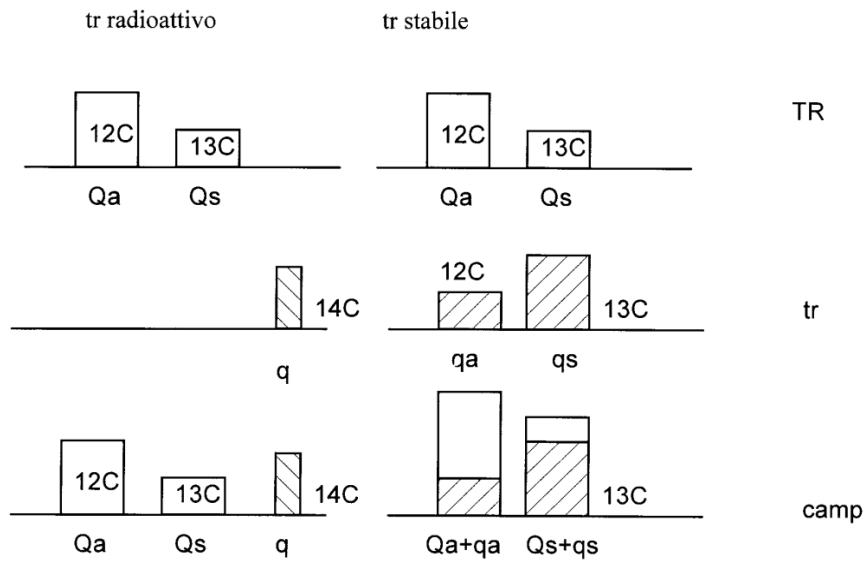
$^{14}\text{C}$	$\cong$	5570	anni
$^3\text{H}$	$\cong$	12	anni
$^{99}\text{Tc}$	$\cong$	6	ore

se il  $t_{1/2}$  è alto allora il decadimento naturale è trascurabile nei tempi dell'esperimento ma se è basso (vedi  $^{99}\text{Tc}$ ) allora i valori misurati vanno corretti per il decadimento dell' isotopo.

## 6.2 Traccianti stabili

Il tracciante stabile utilizza l' isotopo meno abbondante ma non radioattivo dell' atomo in questione. In questo caso i vantaggi sono rappresentati dalla minore pericolosità del tracciante, in quanto non radioattivo, ma presenta una maggiore difficoltà di misura, e le formule vengono complicate dal fatto che l' isotopo stabile è spesso presente in quantità apprezzabile nel sistema. Nel sistema in esame quando vengono eseguite misure si ottengono campioni; i quali contengono in diversa misura tracciante e tracciato. Questo è espresso nello schema seguente:





Nello schema e' rappresentato il caso dei traccianti più comuni negli studi di cinetica, quello degli isotopi del Carbonio. Dallo schema si evince che nel caso dei traccianti radioattivi il tracciante q, ad esempio C14, è nettamente separato dal tracciato, sia nella componente di isotopo abbondante Qa (C12) che di isotopo stabile Qs (C13). Ciò non è vero per i traccianti stabili, per i quali il campione è la risultante della presenza del tracciante e del tracciato, per cui la presenza dell'isotopo abbondante e di quello stabile rappresentano la somma di entrambi:  $C12 = Qa + qa$  e  $C13 = qs + Qs$ .

Questo ha comportato una riformulazione delle misure per permettere di adeguare la misura dei traccianti radioattivi e quella dei traccianti stabili. (25)

$$\text{rapporto isotopico } r(t) = \frac{Qs + qs}{Qa + qa}$$

$$\text{abbondanza isotopica } a(t) = \frac{Qs + qs(t)}{Qa + qa(t) + Qs + qs(t)} = \frac{r(t)}{1 + r(t)}$$

$$\text{arricchimento } e(t) = a(t) - a_n \text{ dove } a_n = \frac{Qs}{Qa} \text{ da cui } \frac{r(t)}{1 + r(t)} - \frac{rn}{1 + rn}$$

dove  $rn = Qs/Qa$ .

$$\text{rapporto tr/TR } z(t) = q(t)/Q = \frac{qa(t) + qs(t)}{Qa + Qs}$$

il rapporto  $z(t)$  è l'unica misura lineare in  $q$  e quindi può usufruire delle considerazioni ed eq. valide per il tracciante radioattivo.

## **7 SCOPO DELLO STUDIO**

I dati presenti in letteratura sottolineano un' influenza sul metabolismo lipidico del virus dell'HCV; ma i dati inerenti la variazione del pattern lipidomico dell'infezione HCV e della steatosi indotta dal virus non derivano da studi condotti sui soggetti HCV infetti, ma sono riconducibili a colture di cellule infettate.

L' obiettivo di questo studio è quello di investigare, attraverso un approccio metabolomico, con particolare riferimento alle alterazioni del profilo lipidico, le manifestazioni metaboliche della NAFLD e dell'infezione da HCV.

La valutazione del pattern lipidomico epatico di soggetti HCV infetti con e senza steatosi e di soggetti non HCV positivi, anch'essi con e senza steatosi, è eseguita utilizzando come campione di partenza le esigue quantità di materiale ottenuto mediante ago-biopsia. Gli sfingolipidi epatici (SL) sono analizzati mediante l'utilizzo della tecnica della Gas-Cromatografia accoppiata alla Spettrometria di Massa (GC-MS), metodica d'elezione per la discriminazione quali-quantitativa delle molecole lipidiche.

Inoltre un altro obiettivo del suddetto studio è validare in vitro i risultati ottenuti dalle analisi condotte sulle biopsie. A tale scopo verranno condotti esperimenti di cinetica di incorporazione di un isotopo stabile dell'acido palmitico nella produzione delle varie classi di ceramidi a corta e a lunga catena su una linea cellulare di epatoma umano (HepG2), resa steatosica con supplementazione di acido miristico.

Gli sgingolipidi saranno valutati nel terreno di coltura mediante l'analisi in Gas Cromatografia accoppiata alla Spettrometria di Massa (GC-MS) e nei lisati cellulari mediante l'analisi in Cromatografia Liquida accoppiata alla Spettrometria di Massa (LC-MS).

## **8 MATERIALI E METODI**

### **8.1a Studio su campioni bioptici**

Lo studio è stato condotto su un gruppo di 30 pazienti (8 G1 CHC FL, 14 G1 not FL, 8 NAFLD) e 14 controlli, reclutati presso il Day Hospital del Dipartimento di Gastroenterologia ed Epatologia dell'Università degli Studi di Palermo, secondo i seguenti criteri di inclusione:

- a) Diagnosi istologica di G1 CHC o NAFLD, attraverso ago-biopsia epatica effettuata meno di 6 mesi prima dalla data di arruolamento;
- b) G1 CHC caratterizzata dalla presenza di anti-HCV ed HCVRNA, con persistenti anormali livelli di alanina-aminotransferasi (ALT), assunzione di alcool <20g/die negli ultimi 12 mesi o più, non sottoposto a terapia antivirale;
- c) Diagnosi di NASH, basata su cronici elevati livelli di ALT per almeno 6 mesi, assunzione di alcool < 20g/die, steatosi istologica (>5% degli epatociti) con necroinfiammazione e/o fibrosi, ed anti-HCV negativo;
- d) Disponibilità di tessuto epatico congelato.

Sono stati, invece, criteri di esclusione:

- a) Cirrosi in stato avanzato;
- b) Carcinoma epatocellulare;
- c) Altre cause di epatopatia o multiple eziologie;
- d) Infezione da virus dell'immunodeficienza (HIV)
- e) Pregresso trattamento con terapia antivirale, farmaci immunosoppressori e/o utilizzo regolare di farmaci inducenti la steatosi;
- f) Nessuna dipendenza attiva da sostanze d'abuso per via iv.

Quattordici soggetti, sottoposti a colecistectomia, senza affezioni epatiche e trascurabile abitudine al consumo di alcool, sono stati arruolati nello studio come controlli negativi HCV ed FL. Tutti i controlli presentavano valori di ALT nella norma e nessuna evidenza di infezione virale (anti-HCV, anti-HIV ed antigene di superficie per l'epatite B negativo).

Lo studio è stato condotto nel rispetto dei principi della Dichiarazione di Helsinki.

I reperti epatici sono stati immediatamente conservati in ghiaccio, in sede di prelievo, e successivamente processati.

Tutti i soggetti posti in osservazione hanno fornito il *consenso informato*, autorizzando la partecipazione allo studio, la conservazione, la manipolazione e l'analisi dei loro campioni biotici.

### **8.2a Procedure standard di laboratorio**

I dati clinici ed antropometrici sono stati rilevati in concomitanza della procedura di prelievo del tessuto epatico. Il BMI è stato calcolato in base al peso (in kilogrammi) ed all'altezza (in metri). Il colesterolo totale (TC), il colesterolo-HDL (HDL-C), il colesterolo-LDL (LDL-C), i trigliceridi (TG), la glicemia, l'insulina e la conta piastrinica sono stati determinati mediante le procedure standard di laboratorio.

Il grado di insulino-resistenza (IR) è stato determinato attraverso il modello homeostasis model assessment (HOMA), utilizzando la seguente equazione<sup>72</sup>:

$$\text{Insulin-resistance (HOMA-IR)} = \text{Fasting insulin (UI/mL)} \cdot \text{Fasting glucose (mmol/L)} / 22.5$$

Tutti i pazienti HCV sono stati valutati per l'HCV-RNA al momento della biopsia, mediante *polymerase chain reaction* qualitativa (CobasAmplicor HCV test, version 2.0; limit of detection 50 IU/mL). I campioni HCV-RNA positivi sono stati quantificati mediante Versant HCV RNA 3.0 bDNA (Bayer, Tarrytown, NY), espressi in IU/mL. La genotipizzazione è stata condotta mediante INNO-LiPA HCV II (Bayer).

### **8.3a Valutazione istologica**

Le porzioni di tessuto state codificate e valutate da un patologo non a conoscenza dell'identità e della storia clinica dei pazienti. Il grasso epatico è stato valutato come percentuale di epatociti contenenti goccioline lipidiche (minimo 5%) e considerato variabile continua. Le biopsie dei pazienti CHC sono state classificate per grado e stadiazione, secondo i criteri di Scheuer<sup>73</sup>, mentre il gruppo NAFLD è stato classificato secondo Kleiner<sup>74</sup>.

I rimanenti frammenti biotici, conservati a -80 °C, sono stati scongelati ed omogeneizzati manualmente in un volume esiguo di soluzione tampone, utilizzando un sonicatore Branson (setting = 20% output power, 2 cicli di 1 minuto ciascuno). Sugli omogenati è stato determinato il contenuto proteico, attraverso il metodo BCA (Pierce, U.S.A.) ed il campione è stato suddiviso in tre aliquote, poste a -173°C in azoto liquido; un'aliquota è stata utilizzata per la determinazione dei trigliceridi e due per l'analisi lipidica.

#### **8.4a Determinazione dei TG epatici**

La determinazione dei trigliceridi epatici è stata adattata dai protocolli noti in Letteratura<sup>75</sup>. Il contenuto in TG è stato quantificato attraverso l'estrazione dei lipidi totali, dall'omogenato. La componente lipidica è stata portata a secco in corrente d'azoto e nuovamente solubilizzata in tampone fosfato salino (PBS) contenente 100 mm/L di taurocolato. Il contenuto in TG è stato determinato per interpolazione mediante un kit commerciale enzimatico-colorimetrico (Roche, Basel, Switzerland), su una scala di calibrazione a cinque punti, nello stesso tampone taurocolato.

#### **8.5a Identificazione e quantificazione delle classi Sfingolipidiche mediante GC-MS**

SM e CER sono state identificate e quantificate secondo il metodo di Bligh-Dyer, adattato alle esigue quantità di campione ottenuto dalla procedura di ago-biopsia.

Un'aliquota di omogenato contenente da 60 a 150 µg in proteine è stata scongelata ed i volumi di estrazione sono stati modificati proporzionalmente alla quantità di campione da processare. La miglior quota di recupero è stata ottenuta con la seguente procedura di base. Dopo addizione di 5µg di CER C17:D18:1 (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, USA), come standard interno, l'aliquota è stata portata al volume di 0.25mL con tampone salino fosfato (PBS) e la componente lipidica è stata estratta mediante estrazione sequenziale con:

0.95 mL di miscela triclorometano/metanolo (1:2 )

0.31 mL di triclorometano

0.31 mL di H<sub>2</sub>O milliQ

La fase organica, essiccata in corrente di N<sub>2</sub>, è stata derivatizzata attraverso incubazione overnight a T<sub>amb</sub>, con una miscela (1:1) di 25 µL di acetonitrile e BSTFA-TMCS (99:1) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

Il campione è stato nuovamente incubato a 40 °C per 30' e, successivamente, 1 µL di questa soluzione è stata caricata manualmente nell'iniettore GC di un Agilent 6890 GC/5973N MS, montante una colonna a bassa polarità, da 30m, HP-1 (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, USA).

I cromatogrammi sono stati acquisiti in modalità Single Ion Monitoring. Il frammento m/z 311 può essere utilizzato come ione di riferimento per gli SL a base D18:1, poiché esso mostra la miglior purezza di picco, come verificato attraverso il caricamento di quantità

crescenti di miscele standard su una matrice cellulare (dato non mostrato). Un caratteristico cromatogramma relativo ad una biopsia epatica è riportato nella figura 24. Le catene di acidi grassi sfingolipidici sono state identificate attraverso i loro contro-ioni predominanti  $m/z$  ( $370+n*28$ ). I caratteristici contro-ioni ( $m/z$ ) degli SL identificati sono mostrati nella figura 25 e nella figura 26. Gli SL sono stati identificati attraverso una scala di calibrazione di standard commerciali caricati su una matrice di tessuto epatico sano.

Poiché SM e CER si frammentano in modo analogo nell'iniettore GC attraverso un processo di thermal cracking, è stata utilizzata un'unica scala di calibrazione basata sulla C16:0D18:1 (Avanti Polar Lipids) per la quantificazione degli SL a media catena ed una scala di calibrazione, mediante C24:0D18:1 (Avanti Polar Lipids), per la quantificazione di SL a lunga catena.

Le condizioni cromatografiche erano le seguenti:

#### ***OVEN***

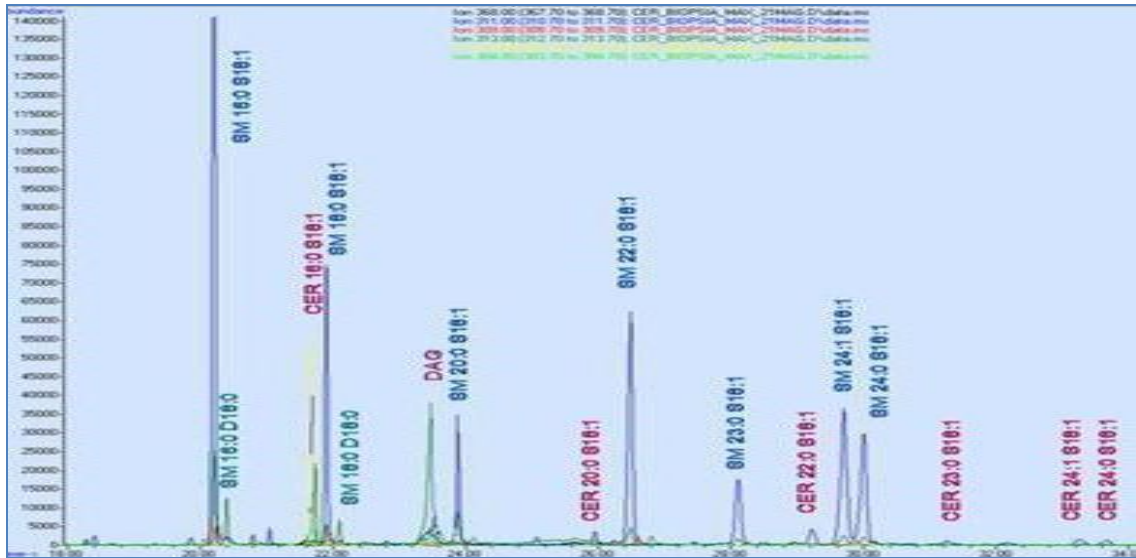
Initial temp: 225 °C	(On)	Maximum temp: 325 °C
Initial time: 5.00 min		equilibration time: 1.00 min
Ramps:		
#	Rate	Final temp
1	6.00	325 °C
2	0.0 (Off)	
Final time		
		20.00
Post temp: 300 °C	Post time: 5 min	Run time: 41.67 min

#### ***FRONT INLET*** (Split/Splitless)

Mode: Splitless  
 Initial temp: 310 °C (On)  
 Pressure: 16.05 psi (On)  
 Purge flow: 60.0 mL/min  
 Purge time: 1.00 min  
 Total flow: 63.7 mL/min  
 Gas saver: On  
 Saver flow: 20.0 mL/min  
 Saver time: 2.00 min  
 Gas type: Helium

#### ***COLUMN***

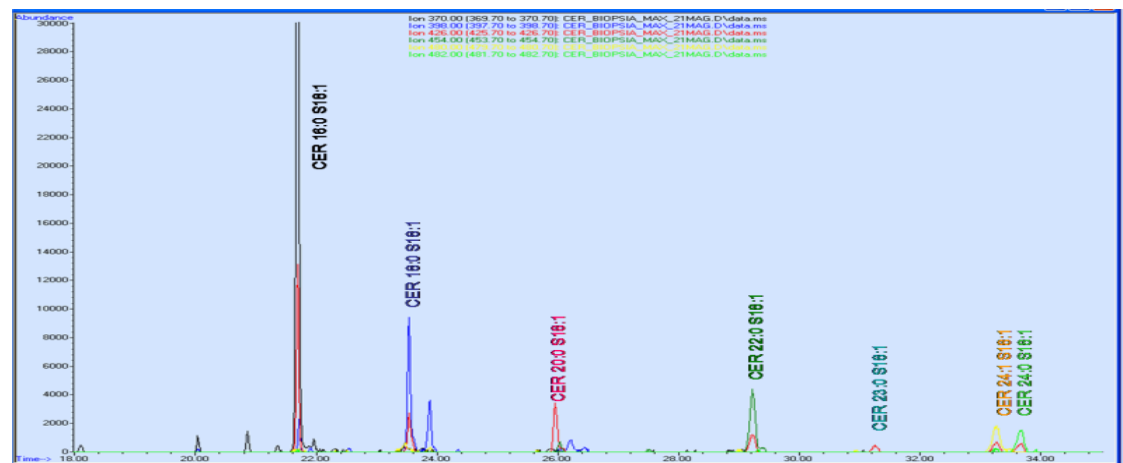
Capillary column *AGILENT 19091S-433 HP-5MS 5% Methyl Siloxane*  
 Max temp: 325 °C  
 Nominal length: 30.0 m  
 Nominal diameter: 250.00 µm  
 Nominal film thickness: 0.25 µm  
 Mode: constant flow  
 Initial flow: 0.9 mL/min  
 Nominal inlet pressure: 16.05 psi  
 Average velocity: 37 cm/sec  
 Inlet: Front Inlet  
 Outlet: MSD  
 Outlet pressure: vacuum



**Fig. 23:** Un caratteristico cromatogramma di sfingomieline (blu) e ceramidi (rosso) in un campione epatico di un soggetto HCV. Non è mostrato lo standard interno.



**Fig. 24:** Contro-ioni (m/z) utilizzati per identificare le sfingomieline in campioni epatici



**Fig.25:** Contro-ioni (m/z) utilizzati per identificare le ceramidi in campioni epatici



## 8.6a STATISTICA

Le concentrazioni di SL sono state espresse in relazione alla quantità di proteine tissutali. A causa della bassa consistenza dei campioni osservati nello studio, le differenze tra i gruppi sono state stimate attraverso i test non parametrici di Mann-Whitney.

Un'analisi discriminante è stata utilizzata per identificare quelle variabili in grado di separare i gruppi HCV (steatosici e non steatosici), dai gruppi controllo (soggetti NAFLD e sani).

Al fine di eludere la over-parametrizzazione del modello, soltanto le variabili che mostravano differenze significative nel test di Mann Whitney sono state incluse nel calcolo. È stato dunque applicato un approccio di esclusione delle variabili a ritroso. La valutazione delle le variabili è stata operata secondo la correlazione di Spearman. I dati relativi ai soggetti sani sono stati aggiunti alla correlazione tra i profili lipidomici e le misure istologiche, in modo tale da massimizzare il più basso grado di correlazione includendo un livello zero (staging, grading e FL istologica risultarono essere zero nei soggetti sani). Tutti i calcoli statistici sono stati operati utilizzando il software statistico (SYSTAT inc., CA, U.S.A.).

## 8b STUDI CONDOTTI SULLE CELLULE

### 8.1b Condizionamento con acidi grassi

Le cellule della linea HepG2 sono state piastrate in una piastra da 24 well e fatte crescere in DMEM-FCS 10%; dopo aver raggiunto la confluenza dell' 80% le cellule sono state rese steatosiche effettuando un condizionamento per 24 ore con l'acido miristico alla concentrazione finale di 1 mM in DMEM-FCS 7%. Il terreno delle cellule controllo è stato normalizzato per il volume di etanolo corrispondente al volume dell'acido miristico aggiunto nelle cellule steatosiche. Tutti gli esperimenti sono stati condotti in duplicato.

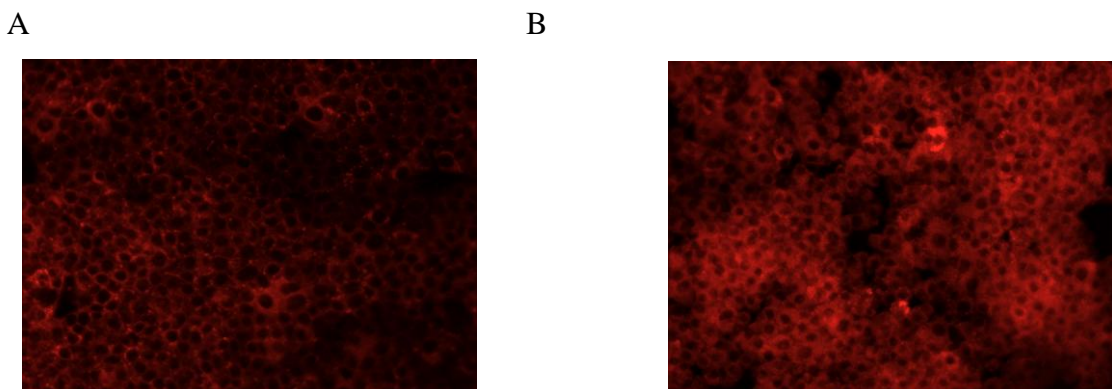
### 8.2b Valutazione del grado di steatosi mediante colorazione con NILE RED

Il contenuto di grasso intracellulare è stato determinato fluorimetricamente mediante la colorazione con il Nile Red, un colorante vitale lipofilo.

Dopo le 24 ore di incubazione con la quantità di 1 mM di acido miristico le cellule sono state fissate e permeabilizzate e successivamente colorate con il Nile Red e il colorante nucleare DAPI, per normalizzare la lettura del Nile Red in base alla densità cellulare di ogni pozzetto.

Dopo la colorazione con il colorante lipofilo la misurazione della fluorescenza è stata determinata mediante l'uso di un lettore di piastra multilabel (VICTOR™ X4, PerkinElmer).

Inoltre la valutazione del grado di steatosi è stata effettuata mediante l'acquisizione di immagini con un microscopio a fluorescenza (LEICA DMI 4000B).



**Fig.26:** immagini microscopio a fluorescenza ;A) colorazione Nile Red di cellule HepG2 non trattate e B) colorazione Nile Red di cellule Hepg2 trattate con 1mM di acido miristico

Le cellule sono state fissate per 10' a temperatura ambiente con la formaldeide al 3,7%; son state successivamente permeabilizzate con il detergente Triton X100.

Dopo un lavaggio con PBS 1X sono state incubate per 15' con una soluzione di Nile Red alla concentrazione di 1µg/ml e poi sono state incubate con un colorante nucleare, il DAPI. Dopo un lavaggio con PBS 1X è stata effettuata una lettura della fluorescenza mediante un lettore di piastra multilabel. (Nile Red Ex: 485 nm -Em: 572 nm ; DAPI Ex: 355 nm-Em: 460 nm)

La lettura dei pozzetti contenenti le cellule steatosiche hanno avuto una lettura di circa due volte quella dei pozzetti contenenti le cellule controllo.

### **8.3b Analisi di incorporazione di un isotopo stabile dell'acido palmitico (acido palmitico-15,15,16,16,16-d5 ) nelle varie classi di ceramidi**

Le cellule HepG2 dopo essere state rese steatosiche con il trattamento con l'acido miristico sono state lavate con PBS 1X e incubate con l' isotopo stabile dell'acido palmitico alla concentrazione finale di 150µM in DMEM-FCS 7%. La cinetica di incorporazione dell' isotopo stabile è stata condotta per le successive 24 ore facendo il prelievo dei terreni di coltura e delle cellule ai tempi 0, 30 minuti, 1 ora, 3 ore, 6 ore e infine 24 ore.

Allo scadere di ogni tempo della cinetica è stato effettuato il prelievo del terreno di coltura ed il prelievo delle cellule da ogni pozzetto mediante l' uso di uno scraper.

Dal terreno sono stati estratti gli acidi grassi e valutati mediante l' uso della tecnica di GC-MS, in particolar modo è stato valutato il rapporto tra l' acido palmitico deuterato in 5 atomi di H (acido palmitico-15,15,16,16,16-d5; 98 atom % D;Sigma Aldrich ) e l' acido palmitico non deuterato.

Sulle cellule è stata condotta un'analisi di sfingolipidomica estraendo le molecole lipidiche e analizzandole mediante l' uso della tecnica di Cromatografia Liquida accoppiata alla Spettrometria di Massa. Questa ultima analisi è servita a studiare l'arricchimento isotopico delle ceramidi.

#### **8.4b Protocollo di estrazione degli acidi grassi dal terreno di coltura**

Un'aliquota di 75 µl di terreno di coltura di ogni pozzetto è stata disciolta in 2,5 ml di una soluzione di metanolo:acetil cloride (50:1), contenente 270 µg di acido eptadecanoico, usato come standard interno. I campioni sono stati incubati per 45' ad una temperatura di 26°C ;la reazione di metilazione è stata arrestata aggiungendo 1,5ml di una soluzione al 6% di K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Sono stati aggiunti 500 µl di esano puro e i tubi di reazione sono stati centrifugati per 10' a 2000 g. Dopo la centrifugazione è stata recuperata tutta la fase superiore ed è stata successivamente portata a secco sotto corrente di N<sub>2</sub>. La componente organica è stata risolubilizzata in 150 µL di esano; un'aliquota di 1 µL di fase organica superiore è stata caricata nel sistema GC-MS, mediante auto campionatore.

La separazione cromatografica è eseguita su un Trace GC Ultra system accoppiato ad un spettrometro di massa ITQ 900 Ion Trap.

#### **8.5b Protocollo di estrazione degli sfingolipi dai lisati cellulari**

Le cellule di ciascun pozzetto, sono state raccolte con un scraper in 1 ml di H<sub>2</sub>O e sonicate per 10'. I lisati ottenuti sono stati concentrati fino ad un volume di 120 µl con un concentratore sottovuoto (CONCENTRATOR 5301; Eppendorf). Come standard interni sono stati utilizzati la ceramide C17 e il trieptadecanoato, questi ultimi sono stati aggiunti al fondo del tubo di estrazione ed essiccati sotto corrente di N<sub>2</sub>. La miscela di estrazione è rappresentata da una miscela di DCM (DiCloro Metano):METANOLO 2:1 (v/v).

*Protocollo di estrazione :*

- 1) 120 µl di lisato cellulare sono stati miscelati a 120 µl di soluzione DCM (DiCloro Metano):METANOLO 2:1 (v/v)
- 2) Sono stati aggiunti 760 µl di Metanolo
- 3) Il campione è stato vortexato per 20''
- 4) Sono stati aggiunti 1520 µl di DCM (DiCloro Metano)
- 5) Il campione è stato vortexato per 20''
- 6) Sono stati aggiunti 480 µl di H<sub>2</sub>O
- 7) Il campione è stato vortexato per 10''
- 8) Il campione è stato lasciato a temperatura ambiente per 10'
- 9) I tubi di reazione sono stati centrifugati alla velocità di 8000 g per 10', alla temperatura di 10°C
- 10) È stata recuperata la fase inferiore mediante l' uso di una siringa

11) Il campione è stato portato a secco sotto corrente di N<sub>2</sub>

12) Il campione è stato risospeso in 100 µl di una soluzione ACN:IPA: H<sub>2</sub>O (65:30:5)

Il sistema impiegato è stato un UPLC Accela (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA) dotato di autocampionatore ed equipaggiato di una colonna Hypersil GOLD PFP, 50×2.1 mm, 1.9 µm p.s. (ThermoFisher Scientific, Bellefonte, PA) termostata a 30°C. È stato applicato un gradiente lineare dal 50% di Fase Mobile A (H<sub>2</sub>O + 0.1% FA) al 95% di Fase Mobile B (Metanolo + 0.1% FA) con un'andatura complessiva di 5 minuti.

Flusso: 500 µL/min. Lo spettrometro di massa impiegato è un Q-Exactive Orbitrap (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA), uno strumento ad alta risoluzione.

La sorgente utilizzata è una sorgente APCI operante in modalità positiva.

## 9 RISULTATI E DISCUSSIONE

### 9.1a Risultati degli studi condotti sulle biopsie

La sottostante Tabella 1 mostra i parametri clinici e biochimici dei soggetti reclutati nello studio. I soggetti sono classificati in 4 gruppi distinti:

- soggetti HCV con steatosi (FL HCV)
- soggetti NAFLD (NAFLD)
- soggetti HCV non steatosici (Not FL HCV)
- soggetti sani (Not FL Controls)

Le differenze statisticamente significative sono state valutate tra i gruppi con analoga *condizione steatosica*.

I soggetti Not FL erano significativamente più giovani, presentavano valori più bassi di colesterolo totale ed LDL-colesterolo e valori più elevati di ALT, rispetto ai controlli Not FL. I soggetti FL HCV presentavano valori più bassi di colesterolo totale, LDL-colesterolo, trigliceridi, insulina plasmatica ed HOMA index rispetto al gruppo NAFLD.

	FL HCV	NAFLD	Not FL HCV	Not FL Controls
<b>Clinical</b>				
Subjects by Gender (M/F)	8 (4/4)	8 (4/4)	14 (8/6)	14 (10/4)
Age(years)	52.5(25-67)	52(23-71)	<b>45(19-68)*</b>	71(47-85)
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	26.7(22-50.8)	29.0(25.3-33.5)	24.1(20.2-39)	25.3(23.6-27.5)
<b>Biochemical</b>				
total cholesterol (mmol/L)	<b>4.5(3.5-5.8)*</b>	5.2(4.8-6.9)	<b>4.1(3.1-5.8)*</b>	4.8(3.3-6.4)
HDL-cholesterol (mmol/L)	1.3(0.9-3)	1.1(0.6-2)	1.4(0.8-1.9)	1.2(0.5-2.1)
trigliceride(mmol/L)	<b>1.0(0.8-1.9)*</b>	1.4(0.9-2.5)	0.8(0.4-1.4)	1.1(0.6-1.8)
LDL-cholesterol (mmol/L)	<b>2.4 (1.4-3.1)*</b>	3.2 (3.0-4.9)	<b>2.2 (1.7-3.5)*</b>	3.3(2.3-3.9)
Fasting glucose (mmol/L)	4.8(4-5.7)	5.1(4.3-7.1)	4.6(3.6-5.5)	5.0(1-10.9)
plasma insulin (pg/mL)	<b>11.8(5.7-23)*</b>	17.5(10.8-59.8)	7.8(2.2-18.2)	9.2(1.2-17.6)
HOMA index	<b>2.9(1.2-4.8)*</b>	4.0(2.5-18.8)	1.6(0.4-4)	2.0(1.1-4.5)
ALT (U/L)	61.5(29-495)	51(27-158)	<b>45.5(20-478)*</b>	17.5(8-57)
platelet count (x 10 <sup>3</sup> )	209(136-422)	193(101-351)	227(129-295)	256(95-644)
HCV RNA (n copies x 10 <sup>3</sup> )	456(82-2627)	na	400(1-1450)	na
<b>Hystology</b>				
Grading °	2(2-3)^	1(1-3)§	2(1-3)^	0(0-0)
Staging °	2(1-3)^	2(0-4)§	2(0-4)^	0(0-0)
Hepatocyte fat @	30(10-60)	10(10-50)	0(0-0)	0(0-0)

**Tab. 1:** Parametri clinico-biochimici ed istologia dei gruppi di soggetti in valutazione.

Mann Whitney tests: FL HCV vs NAFLD; Not FL HCV vs Not FL Controls. \* p < 0.05

° Comparazione tra i gruppi *non applicabile*

^ Classificazione di Scheuer

§ Classificazione di Kleimer

@ percentuale di epatociti contenenti goccioline di grasso

## 9.2a Profili degli sfingolipidi epatici

Le differenze nei profili di SL, tra i gruppi in osservazione, sono evidenziati nelle Tabella2. I dati relativi agli SL sono stati normalizzati in funzione del contenuto proteico epatico. Il profilo sfingolipidico è simile tra i gruppi NAFLD ed FL HCV, sebbene il valore medio relativo agli SL nel gruppo FL HCV risulta spesso più elevato (più del doppio) rispetto al gruppo NAFLD, pur senza esser significativamente differente. Per contrasto tutte le SM e le CER a lunga catena, con l'eccezione della base 24:0, risultano incrementate nei soggetti Not FL HCV, se valutate contro i relativi controlli. L'incremento degli SL nei soggetti Not FL HCV raggiunge livelli comparabili con entrambi i gruppi FL (dati non mostrati). I dati relativi agli SL, valutati nel loro insieme, confermano elevata espressione epatica di SM e CER a lunga catena nei soggetti Not FL HCV, se comparati ai controlli Not FL.

	FL HCV	NAFLD	Not FL HCV	Not FL Controls
<b>Sphingomielins</b>				
C16:0D18:1	0.85(0.12-2.1)	0.54(0.39-2.12)	0.64(0.32-1.17)	0.55(0.26-1.32)
C18:0D18:1	0.22(0.04-0.49)	0.11(0.08-0.54)	0.13(0.07-0.22)	0.12(0.05-0.25)
C20:0D18:1	0.14(0.02- 0.27)	0.07(0.04-0.32)	<b>0.08(0.02-0.18)**</b>	0.05(0.01-0.13)
C22:0D18:1	0.34(0.05-0.82)	0.2(0.12-0.78)	0.26(0.04-0.54) <sup>o</sup>	0.08(0.02-0.46)
C23:0D18:1	0.15(0.01-0.35)	0.09(0.03-0.23)	0.1(0.01-0.18) <sup>o</sup>	0.02(0-0.18)
C24:1D18:1	0.19(0.02-0.6)	0.1(0-0.25)	0.11(0.01-0.22)	0.06(0.02-0.2)
C24:0D18:1	0.16(0.02-0.52)	0.11(0.06-0.32)	0.14(0.01-0.39) <sup>o</sup>	0.04(0.01-0.32)
<b>Ceramides</b>				
C16:0D18:1	0.25(0.09-0.98)	0.12(0.06-0.91)	0.13(0.03-0.47)	0.07(0.02-0.16)
C22:0D18:1	0.01(0.003-0.03)	0.008(0-0.023)	<b>0.005(0 - 0.017)**</b>	0(0-0.006)
C23:0D18:1	0.002(0 - 0.009)	0.001(0-0.006)	<b>0.002(0 - 0.006)**</b>	0(0-0.002)
C24:1D18:1	0.004(0 - 0.02)	0.002(0-0.06)	0(0-0.003)	0(0-0.003)
C24:0D18:1	0.01(0 - 0.021)	0.004(0-0.013)	<b>0.003(0-0.009)**</b>	0(0-0.003)
<b>Aggregated</b>				
medium chain SM	1.08(0.17-2.59)	0.66(0.48-2.66)	0.77(0.39-1.4)	0.67(0.31-1.42)
long chain SM	1.01(0.16 - 2.58)	0.6(0.33-1.92)	<b>0.73(0.1-1.53)**</b>	0.28(0.09 - 1.31)
medium chain CER	0.25(0.09 -0.98)	0.12(0.06-0.91)	0.13(0.03-0.47)	0.067(0.02-0.16)
long chain CER	0.03(0.003-0.08)	0.019(0 -0.078)	<b>0.012(0-0.04)**</b>	0.002(0-0.01)

**Tab. 2:** Profilo degli sfingolipidi nei gruppi di soggetti in valutazione

Mann Whitney \* p < 0.05; \*\* p < 0.005

<sup>o</sup> Comparazione tra i gruppi *non applicabile*

Le variabili che differiscono maggiormente nei tests di Mann Whitney sono utilizzate nella Tabella 3 per discriminare i due gruppi HCV dai rispettivi gruppi di controllo, mediante un set di due analisi multivariate discriminanti. In particolare, un unico SL (C16:0D18:1) discrimina correttamente 8/8 (100%) degli FL HCV e 7/8 (88%) dei soggetti NAFLD. L'acido grasso C16:1 (palmitoleic) ed una combinazione di sette SL discrimina correttamente 13/14 (93%) dei soggetti Not FL HCV e 14/14 (100%) soggetti sani.

	FL model	Not FL model
Classification rate	0.94 (15/16)	0.96 (27/28)
HCV class. Rate	1.00(8/8)	0.93(13/14)
Not HCV class. Rate	0.88 (7/8)	1.00(14/14)
Wilks Lambda	0.321	0.197
<b>Standardized coefficients</b>		
C14:0	+1.912	-*
C16:1	*	+0.729
C17:1	-1.05	-*
C16:0D18:1 SM	+1.61	-*
C18:0D18:1 SM	-*	+1.454
C23:0D18:1 SM	-*	-1.353
C24:1D18:1 SM	-*	-2.164
C24:0D18:1 SM	-*	+1.528
C16:0D18:1 CER	-*	-1.015
C22:0D18:1 CER	-*	-1.244
C24:1D18:1 CER	-*	+1.368

**Tab. 3:** Analisi discriminante di FL e Not FL HCV vs i gruppi Controllo.

\* Excluded by the discriminant backward model



### 9.3a Correlazione tra le caratteristiche istologiche epatiche ed il profilo sfingolipidi epatici nei pazienti CHC

Il grado di severità della necro-infiammazione epatica (grading), della fibrosi epatica (staging) e dell'accumulo di grasso a livello epatocitario (steascore) sono correlate con i livelli di SL. Le correlazioni significative sono riportate nella Tabella 4.

Grading e staging presentano andamenti sovrapponibili e sono correlate con tutti gli SL a lunga catena, fatta eccezione per la ceramide CER C24:1D18:1.

L'accumulo di grasso a livello epatocitario è positivamente correlato con tutti gli SL a lunga catena, con l'eccezione della sfingomieline SM C20:0D18:1, della sfingomieline SM C24:0D18:1 e della ceramide CER C23:0D18:1, che raggiungono appena il grado di significatività.

	<b>Fibrosis (grading)</b>	<b>Necrosis/inflammation (staging)</b>	<b>Fatty liver histology score</b>
<b>Sphingomielins</b>			
C20:0D18:1	+0.454*	+0.464*	+0.274
C22:0D18:1	+0.568*	+0.540*	+0.304*
C23:0D18:1	+0.595**	+0.588**	+0.367*
C24:1D18:1	+0.36*	+0.348*	+0.345*
C24:0D18:1	+0.556*	+0.533*	+0.288
<b>Ceramides</b>			
C16:0D18:1	+0.536*	+0.446*	+0.477
C22:0D18:1	+0.533*	+0.501*	+0.334*
C23:0D18:1	+0.403*	+0.392*	+0.222
C24:1D18:1	+0.228	+0.218	+0.536*
C24:0D18:1	+0.563*	+0.497*	+0.467*
<b>Aggregated</b>			
medium chain SM	+0.233	+0.288	+0.184
long chain SM	+0.542*	+0.537*	+0.333*
medium chain CER	+0.536*	+0.446*	+0.477*
long chain CER	+0.534*	+0.506*	+0.466*

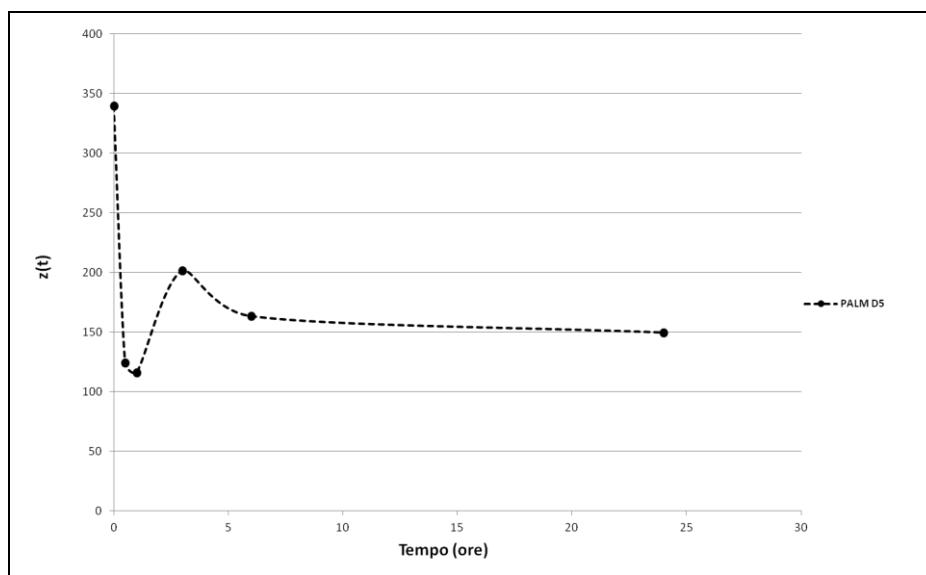
**Tab. 4:** Correlazione tra i parametri del grado di severità dell'infezione HCV con gli sfingolipidi epatici.

Spearman Rho; \* = p value < 0.05; \*\* = p value < 0.005. (Sono mostrate solo le correlazioni significative).

### 9.1b Risultati ottenuti dagli studi in vitro condotti sulle cellule HePG2

Nello studio della cinetica di incorporazione dell'isotopo stabile dell'acido palmitico (acido palmitico-15,15,16,16,16-d5) è stato inizialmente valutato il rapporto presente nel terreno di coltura tra l' isotopo D5 e l' isotopo più abbondante in natura. Come si osserva nella figura 27 l' isotopo deuterato al punto zero è in un rapporto di 60:1 con il palmitato freddo, ma immediatamente in seguito alla sua redistribuzione tra l' interno e l'esterno della cellula, si determina una riduzione del rapporto tra gli isotopi, rappresentata da una ripida discesa della curva.

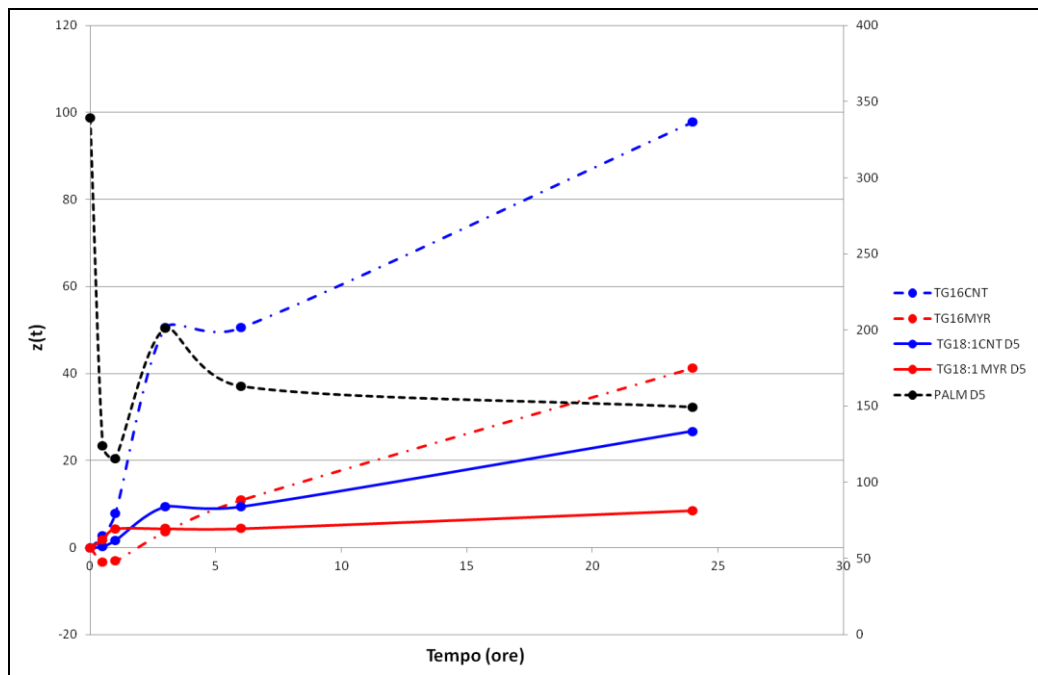
L' isotopo d5 entra nei compartimenti intracellulari e quindi la sua quota rimasta nel terreno si diluisce e si ha una discesa esponenziale; l' andamento atteso dopo questa discesa sarebbe un stato di equilibrio a valori più bassi di quelli iniziali; ma come si osserva dal grafico dopo la fase di discesa c' è una perturbazione dell'equilibrio con un picco in salita, per poi alle 6 ore di incubazione tornare ad uno steady state del pool dell' isotopo del palmitato, che prosegue per tutte le 24 ore della cinetica.



**Fig27:** andamento dell' isotopo stabile dell' acido palmitico (acido palmitico-15,15,16,16,16-d5) misurato nel mezzo di coltura nella 24 ore della cinetica

Il picco relativo all' isotopo del palmitato rappresenta un processo tardivo di ricomparsa del isotopo nel terreno di coltura. Un' ipotesi che spiegherebbe questo andamento può essere l' incorporazione del palmitato nelle lipoproteine che successivamente subiscono

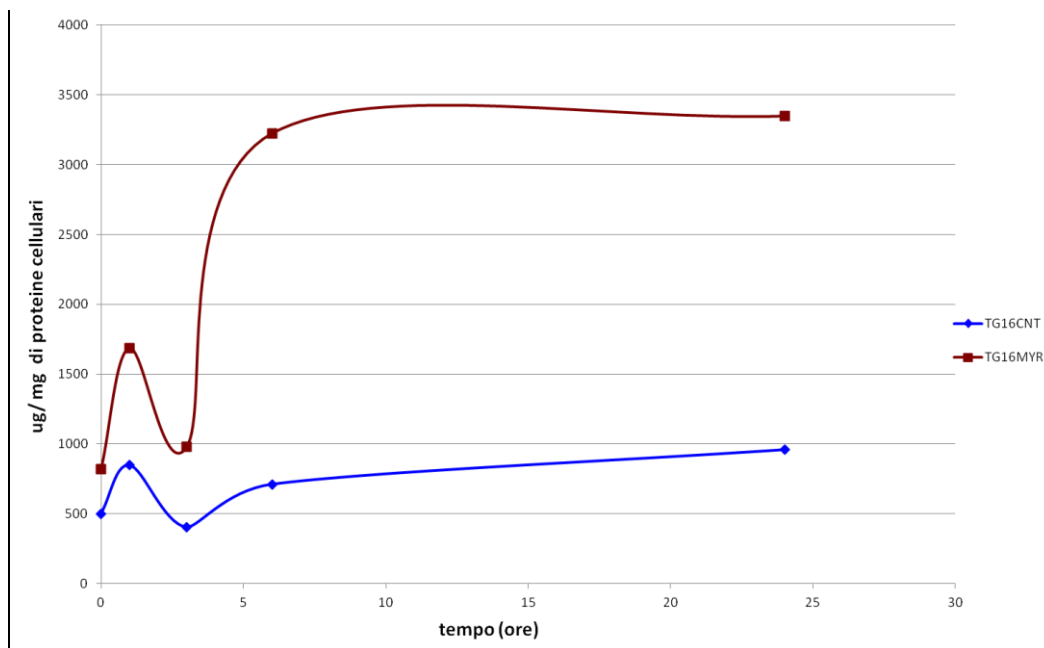
l' export cellulare; nel compartimento extracellulare vengono idrolizzate dalle lipasi e viene rilasciato l' acido palmitico marcato che era stato intrappolato all' interno. Questa perturbazione presenta nella curva relativa all' isotopo d5 si ripercuote anche nella sua cinetica di incorporazione nei vari prodotti, tra cui le ceramidi e i trigliceridi. La figura 28 mostra la velocità di incorporazione dell' isotopo nei trigliceridi (TG16,TG18:1); come si può osservare la velocità di incorporazione nelle cellule controllo (curve blu) è maggiore di quella nelle cellule steatosiche (curve rosse;)



**Fig28:** cinetica di incorporazione dell' acido palmitico D5 nei trigliceridi C16 e C18:1

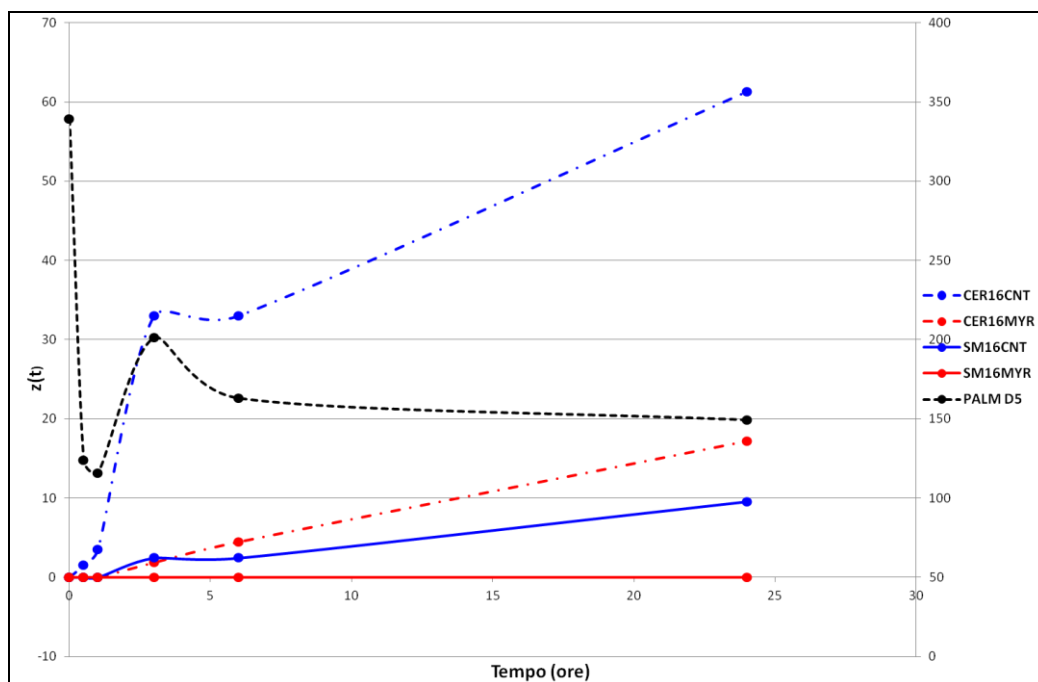
Le cellule condizionate con l' acido miristico sembrano accumulare una maggiore quantità assoluta del trigliceride C16 (figura 29).

Questo è giustificato dal fatto che le cellule sono steatosiche e come atteso hanno accumulato trigliceridi nel compartimento intracellulare.



**Fig. 29:** quantità assoluta , espressa in  $\mu\text{g} / \text{ml}$  di proteine cellulari, di trigliceridi C16 marcati con il palmitato D5

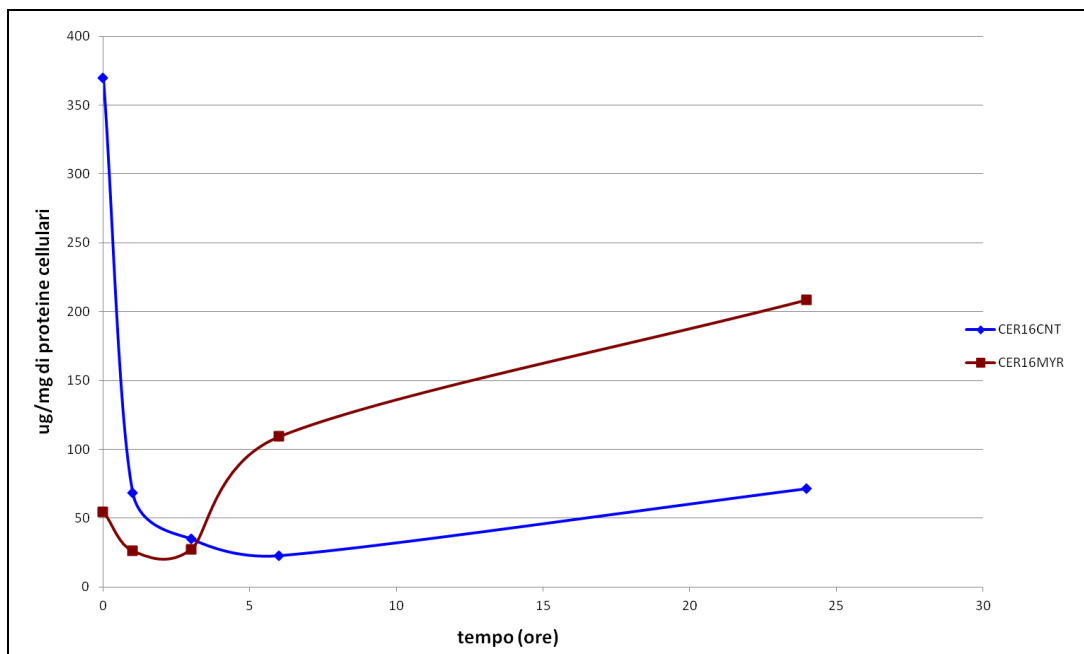
È stata valutata la velocità di incorporazione dell' isotopo D5 nelle ceramidi C16,C22 e C24:0 e C24:1.



**Fig30:** cinetica di incorporazione del palmitato D5 nelle ceramide C16 e nella corrispondente sfingomielina

In figura 30 è rappresentata la cinetica di incorporazione del palmitato deuterato nella ceramide C16, nelle cellule controllo (CER16CNT) e nelle cellule steatosiche (CER16MYR). Come si può osservare la velocità di incorporazione è maggiore nelle cellule controllo (CER16CNT) piuttosto che nelle cellule condizionate con l'acido mirististico (CER16MYR).

Come atteso nelle cellule controllo la cinetica della sfingomielina corrispondente (SM16CNT) è più lenta di quella della ceramide, ma comunque più veloce della stessa sfingomielina nelle cellule steatosiche (SM16MYR). L'andamento riflette il fatto che la sfingomielina viene prodotta dalla idrolisi della ceramide e quindi la comparsa del tracciante in essa deve essere successiva a quella che avviene nella ceramide.



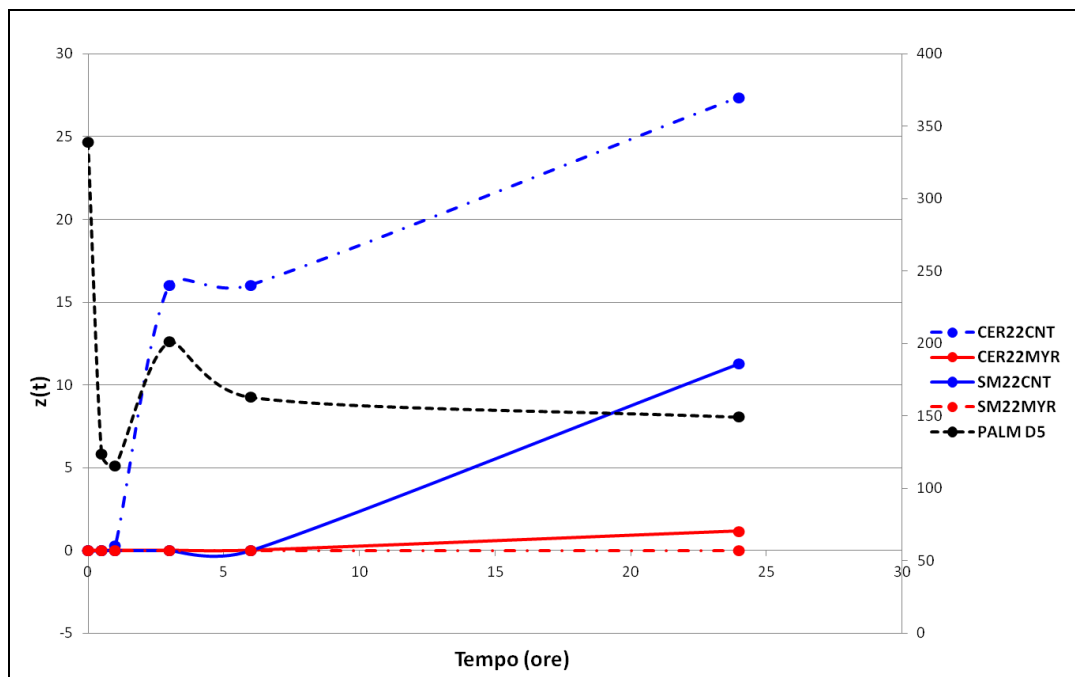
**Fig.31:** quantità assoluta, espressa in  $\mu\text{g} / \text{ml}$  di proteine cellulari, della ceramide C16 nelle cellule controllo (CER16CNT) e nelle cellule steatosiche (CER16MYR)

La figura 31 mostra la quantità assoluta della ceramide C16, riscontrabile a differenti tempi, nelle cellule controllo e nelle cellule miristiche. Si può notare come anche la quantità assoluta subisce un' iniziale turbolenza in entrambi i campioni, questo probabilmente dovuto ad un blocco iniziale della produzione della ceramide e ad una successiva ripartenza della stessa.

Nonostante la velocità di incorporazione dell' isotopo sia più lenta nelle cellule steatosiche piuttosto che nelle cellule controllo, la quantità assoluta della molecola risulta maggiore nelle cellule trattate (CER16MYR).(fig. 31)

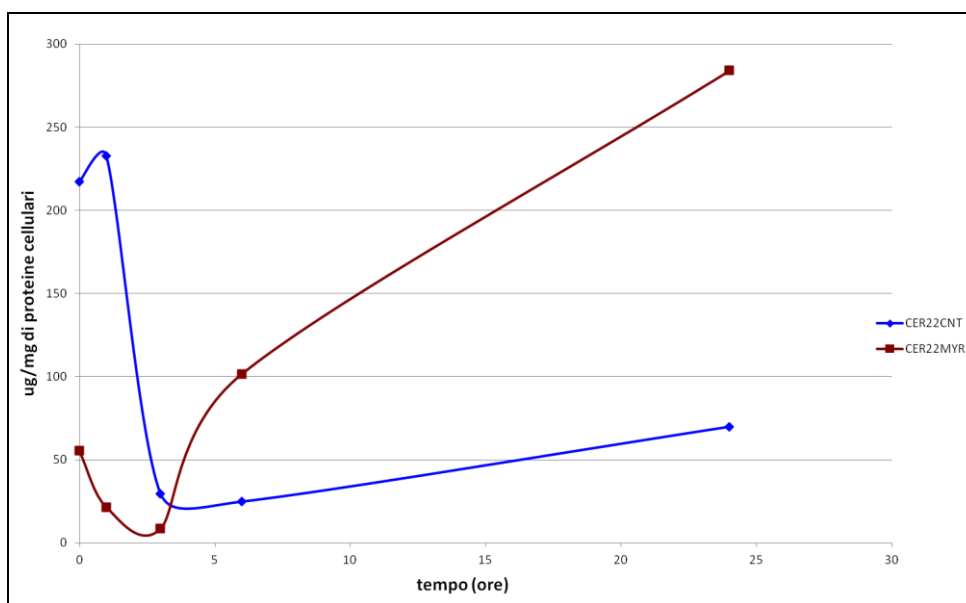
Questi dati ottenuti, fanno supporre che nonostante la sintesi della ceramide C16 nelle cellule steatosiche risulti più lenta, anche il suo catabolismo subisce una downregolazione, determinandone come risultato un accumulo nel tempo.

La cinetica di incorporazione del palmitato D5 nella ceramide più lunga C22, ha mostrato un andamento paragonabile a quella relativa alla ceramide C16, con una velocità di incorporazione maggiore nelle cellule controllo.(fig. 32). Dopo un' iniziale fase di adattamento all'immissione del nuovo mezzo contenente il tracciante, la cinetica mostra un andamento più lineare.



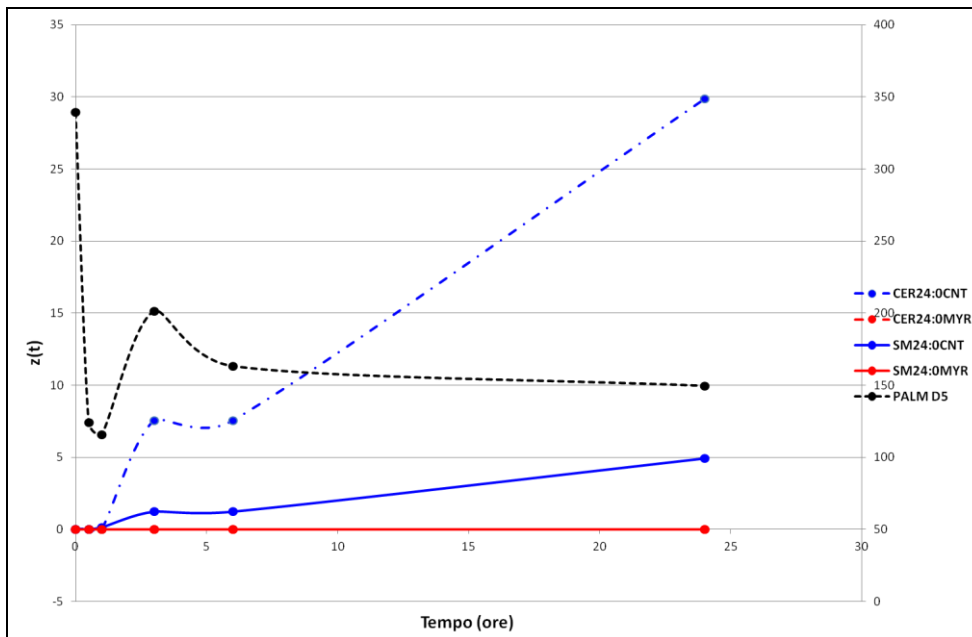
**Fig. 32:** cinetica di incorporazione del palmitato D5 nella ceramide C22 e nella corrispondente sfingomielina (SM22)

La quantità assoluta della ceramide C22 (fig.33) nelle cellule steatosiche è maggiore rispetto alle cellule controllo e nella stessa condizione di steatosi è maggiore rispetto alla ceramide C16.

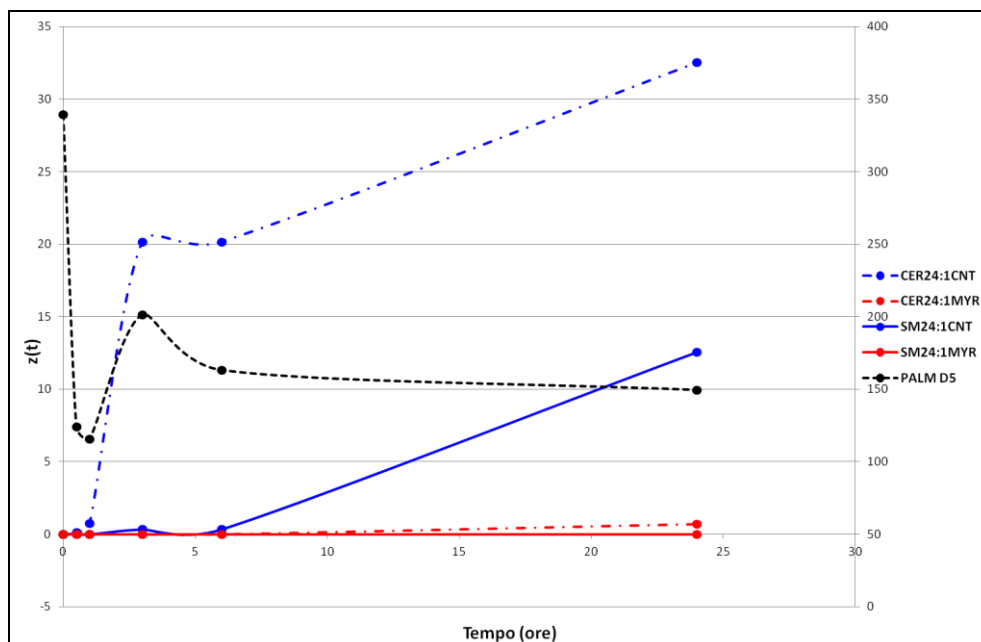


**Fig.33:** quantità assoluta, espressa in  $\mu\text{g} / \text{ml}$  di proteine cellulari, della ceramide C22 nelle cellule controllo (CER22CNT) e nelle cellule steatosiche (CER22MYR)

La sintesi delle ceramidi C240 e C24:1(fig.33;fig.34) è anch'essa più veloce nelle cellule non trattate, con uno schiacciamento della curva di incorporazione ancora più marcato rispetto a quello osservato per le altre classi di ceramidi analizzate. Ciò fa supporre che i processi metabolici riguardanti le ceramidi nelle cellule steatosiche risultano down regolati.



**Fig.33** : cinetica di incorporazione del palmitato D5 nella ceramide C24:0 e nella corrispondente sfingomieline (SM24:0)



**Fig.34**: cinetica di incorporazione del palmitato D5 nella ceramide C24:1 e nella corrispondente sfingomieline (SM24:1)



## 10 CONCLUSIONI

In questo studio è stato evidenziato che i soggetti HCV G1 CHC presentano un'elevata espressione epatica di SL, evento associato alla severità del danno epatico. È stato, inoltre, confermato che il profilo lipidomico della steatosi epatica è l'espressione di un processo mediato dall'insulino-resistenza.

La steatosi epatica è una caratteristica comune in grado di incidere sulla severità del danno epatico nei soggetti G1 CHC<sup>5,55</sup>. Malgrado ciò, pochi studi hanno valutato qualitativamente il profilo lipidico di questi pazienti<sup>1,61</sup>.

Un importante risultato di questo studio consiste nel fatto che, per la prima volta, è stato mostrato il pattern di SL epatici nei soggetti G1 HCV. Abbiamo osservato che i valori medi degli SL nei pazienti G1 HCV steatosici sono confrontabili, o addirittura più elevati (più del doppio), con quelli dei soggetti NAFLD, sebbene questa evidenza non sia statisticamente significativa.

Le CER a lunga catena sono significativamente incrementate nei pazienti G1 HCV non steatosici, comparati ai controlli. Questi risultati suggeriscono che il metabolismo dell'HCV e degli SL sono correlati. I dati sperimentali, evidenziando una stretta interazione tra HCV e SL, supportano quest'evidenza, come dimostrato dal fatto che l'inibizione del pathway biosintetico degli sfingolipidi incide sull'attività della palmitoil-transferasi<sup>63</sup>, un enzima chiave nella replicazione virale; inoltre, le SM sono in grado di legarsi alla polimerasi RNA-dipendente dell'HCV (RdRp), promuovendo il legame della proteina virale ai lipid rafts<sup>84,86</sup>, attraverso un meccanismo virale, genotipo-specifico<sup>63</sup>.

Ancora pochi lavori sono incentrati sull'analisi delle CER nei tessuti epatici. Un precedente report ha fallito nel dimostrare l'accumulo di ceramidi nel fegato NAFLD<sup>44</sup>, sebbene lo stesso gruppo avesse evidenziato l'incremento del contenuto in ceramidi nel tessuto adiposo infiammato dei pazienti NAFLD<sup>83</sup>. I profili lipidomici riportati dagli autori dimostravano che solo la componente a lunga catena di ceramidi e sfingolipidi fossero over-esprese nel tessuto adiposo, essendo questo dato in accordo con l'accumulo di SL a lunga catena evidenziato, a livello epatico, in entrambi i modelli NAFLD ed HCV FL.

Un altro importante risultato di questo studio consiste nell'evidenza che non solo il contenuto epatico di SL risulta incrementato nei pazienti G1 CHC, ma esso è anche associato alla severità del danno epatico, in termini sia di attività necro-infiammatoria che di fibrosi. Le correlazioni evidenziate sono in linea con il ruolo da secondi

messaggeri, assunto dagli SL, nei pathways di trasduzione del segnale<sup>86</sup>. Infatti le CER sono in grado sia di modulare il segnale del recettore insulinico, interferendo con il complesso Akt/PKB, sia di modulare l'espressione genica, insulino-resistenza indotta, attraverso la cascata JUN Ikk- $\beta$ <sup>86</sup>, sia di indurre apoptosi e morte cellulare attraverso la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e l'attivazione del pathway di JNK, sia di interferire con il ciclo di replicazione cellulare attraverso CAPK/Raf/Akt<sup>86</sup>.

Abbiamo, inoltre, evidenziato che l'attività necro-infiammatoria epatica e la fibrosi sono direttamente correlate con gli acidi miristico e palmitoleico ed inversamente correlate con la classe dei PUFA. Un basso contenuto epatico di PUFA nei soggetti HCV steatosici è stato riscontrato anche da altri autori<sup>87</sup> ed il suo ruolo nell'indurre infiammazione a livello epatico è stata postulata, tenendo conto che la mancata attivazione dei recettori PPAR- $\alpha$  potrebbe esser responsiva dell'attività del pathway di NFkB/AP-1 nell'indurre infiammazione ed, infine, danno epatico<sup>82</sup>.

Il limite principale di questo studio consiste nell'esiguo numero di campioni esaminati, il che può spiegare la mancanza della significatività statistica tra alcuni parametri che appaiono nettamente differenti tra soggetti CHC e relativi controlli.

Un più elevato numero di campioni patologici e controlli su cui condurre lo studio, naturalmente auspicato da tutti gli autori, è ostacolato dalla stessa essenza della procedura di biopsizzazione, alla sua invasività nonché al rischio ad essa associato.

Un altro limite di questo studio è rappresentato dall'incertezza nella quantificazione di metaboliti a concentrazione molto bassa; questi ultimi, inducendo un'elevata dispersione dei dati, riducono sensibilmente la possibilità di evidenziare differenze statisticamente significative nel confronto tra alcuni composti.

In conclusione, , abbiamo evidenziato un'elevata espressione dei livelli di SL epatici nei soggetti G1 CHC positivamente correlata con la severità del grado di necro-infiammazione e fibrosi. Di conseguenza, ulteriori studi sono necessari al fine di valutare il ruolo degli sfingolipidi a lunga catena come punto di innesco del danno epatico nei soggetti G1 CHC.

Lo studio di sfingolipidomica condotto su una linea cellulare di epatoma umano resa steatosica, con un trattamento di acido miristico, ha confermato che la condizione di steatosi determina un accumulo di ceramidi ed in particolare una maggiore concentrazione di ceramidi a lunga catena (Ceramide C22).

L'accumulo riscontrato non sembra attribuibile ad una maggiore sintesi degli sfingolipidi, ma al ridotto catabolismo, poiché la velocità di incorporazione dell'

isotopo stabile dell'acido palmitico nei metaboliti analizzati risulta più lenta in condizioni di steatosi.

I dati dello studio condotto in vitro confermano i risultati ottenuti dall'analisi dei campioni bioptici.

Ulteriori esperimenti di cinetica in vitro dovranno essere condotti per superare i limiti tecnici riscontrati. In particolare modo, si dovranno migliorare le condizioni sperimentali per eliminare lo stato di squilibrio nelle fasi iniziali della cinetica, probabilmente attribuibile all'immissione di terreno fresco al tempo zero. La supplementazione di fattori di crescita e molecole regolatrici presenti nel siero, potrebbe infatti perturbare le condizioni di equilibrio raggiunte dalle cellule nelle precedenti 24 ore di trattamento con acido miristico.

## 11 BIBLIOGRAFIA

**1 Roe B**, Kensicki E, Mohny R, Hall W. Metabolomic Profile of Hepatitis C Virus-Infected Hepatocytes. *PLoS One*. 2011;6(8):e23641. Epub 2011 Aug 11.

**2 Hoofnagle JH**. Course and outcome of hepatitis C. *Hepatology*. 2002 Nov;36(5 Suppl 1):S21-9.

**3 Chemello L**, Cavalletto L, Bernardinello E, Boccato S, Casarin P, Cavinato F, Urban F, Pontisso P, Cecchetto A, Gatta A, Alberti A Comparison of thrice weekly vs daily human leucocyte interferon-alpha therapy for chronic hepatitis C. TVVH Study Group. *J Viral Hepat*. 1999 Jul;6(4):321-7.

**4 Miyake Y.**, Y. Kozutsumi, S. Nakamura, T. Fujita, and T. Kawasaki. Serine palmitoyltransferase is the primary target of a sphingosine-like immunosuppressant, 1995. ISP-1/myriocin. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 211:396–403.

**5 Asselah T**, Rubbia-Brandt L, Marcellin P, Negro F. Steatosis in chronic hepatitis C: why does it really matter? *Gut* 2006; 55: 123-130.

**6 Czaja AJ**, Carpenter HA, Santrach PJ, Moore SB. Host- and disease-specific factors affecting steatosis in chronic hepatitis C. *J Hepatol* 1998; 29: 198-206.

**7 Thomopoulos KC**, Arvaniti V, Tsamantas AC, Dimitropoulou D, Gogos CA, Siagris D, Theocharis GJ, Labropoulou-Karatza C. Prevalence of liver steatosis in patients with chronic hepatitis B: a study of associated factors and of relationship with fibrosis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2006; 18: 233-237.

**8 Marcellin P**, Asselah T, Boyer N. Fibrosis and disease progression in hepatitis C. *Hepatology* 2002; 36: S47-S56.

**9 Lecube A**, Hernandez C, Genesca J, Esteban JI, Jardi R, Simo R. High prevalence of glucose abnormalities in patients with hepatitis C virus infection: a multivariate analysis considering the liver injury. *Diabetes Care* 2004; 27: 1171-1175.

- 10 Hui JM**, Sud A, Farrell GC, Bandara P, Byth K, Kench JG, Mc-Caughan GW, George J. Insulin resistance is associated with chronic hepatitis C virus infection and fibrosis progression[corrected]. *Gastroenterology* 2003; 125: 1695-1704.
- 11 Shintani Y**, Fujie H, Miyoshi H, Tsutsumi T, Tsukamoto K, Kimura S, Moriya K, Koike K. Hepatitis C virus infection and diabetes: direct involvement of the virus in the development of insulin resistance. *Gastroenterology* 2004; 126: 840-848.
- 12 Segrest JP**, Jones MK, De Loof H, Dashti N. Structure of apolipoprotein B-100 in low density lipoproteins. *J Lipid Res.* 2001 Sep;42(9):1346-67.
- 13 Ginsberg HN**. Lipoprotein physiology. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 1998 Sep;27(3):503-19.
- 14 Patsch W**, Gotto AM Jr. Apolipoproteins: pathophysiology and clinical implications. *Methods Enzymol.* 1996;263:3-32.
- 15 Shelness GS**, Sellers JA. Very-low-density lipoprotein assembly and secretion. *Curr Opin Lipidol.* 2001 Apr;12(2):151-7.
- 16 Morton RE**. Cholesteryl ester transfer protein and its plasma regulator: lipid transfer inhibitor protein. *Curr Opin Lipidol.* 1999 Aug;10(4):321-7.
- 17 Sniderman AD**. Postprandial hypertriglyceridemia(s): time to enlarge our pathophysiologic perspective. *Eur J Clin Invest.* 2000 Nov;30(11):935-7.
- 18 Bocher V**, Chinetti G, Fruchart JC, Staels B. . [Role of the peroxisome proliferator-activated receptors (PPARS) in the regulation of lipids and inflammation control]. *J Soc Biol.* 2002;196(1):47-52. Review. French.
- 19 Linton MF**, Fazio S. Class A scavenger receptors, macrophages, and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol.* 2001 Oct;12(5):489-95. Review.
- 20 Hobbs HH**, White AL. Lipoprotein(a): intrigues and insights. *Curr Opin Lipidol.* 1999 Jun;10(3):225-36.

- 21 Von Eckardstein A**, Nofer JR, Assmann G. High density lipoproteins and arteriosclerosis. Role of cholesterol efflux and reverse cholesterol transport. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001 Jan;21(1):13-27. Review.
- 22 Santamarina-Fojo S**, Remaley AT, Neufeld EB, Brewer HB Jr. Regulation and intracellular trafficking of the ABCA1 transporter. *J Lipid Res.* 2001 Sep;42(9):1339-45. Review.
- 23 Schmitz G**, Kaminski WE. ABC transporters and cholesterol metabolism. *Front Biosci.* 2001 Mar 1;6:D505-14. Review.
- 24 Acton S**, Rigotti A, Landschulz KT, Xu S, Hobbs HH, Krieger M. Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science.* 1996 Jan 26;271(5248):518-20.
- 25 Yu KC**, Cooper AD. Postprandial lipoproteins and atherosclerosis. *Front Biosci.* 2001 Mar 1;6:D332-54. Review.
- 26 Heeren J**, Grewal T, Jäckle S, Beisiegel U. Recycling of apolipoprotein E and lipoprotein lipase through endosomal compartments in vivo. *J Biol Chem.* 2001 Nov 9;276(45):42333-8. Epub 2001 Sep 6.
- 27 Bellentani S**, Marino M. Epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Ann Hepatol.* 2009;8 Suppl 1:S4-8.
- 28 Paradis V**, Bedossa P. Definition and natural history of metabolic steatosis: histology and cellular aspects. *Diabetes Metab.* 2008 Dec;34(6 Pt 2):638-42.
- 29 Malaguarnera M**, Di Rosa M, Nicoletti F, Malaguarnera L. Molecular mechanisms involved in NAFLD progression. *J Mol Med.* 2009 Jul;87(7):679-95.
- 30 Schwenzler NF**, Springer F, Schraml C, Stefan N, Machann J, Schick F. Non-invasive assessment and quantification of liver steatosis by ultrasound, computed tomography and magnetic resonance. *J Hepatol.* 2009 Sep;51(3):433-45.
- 31 Cusi K**. Role of insulin resistance and lipotoxicity in non-alcoholic steatohepatitis. *Clin Liver Dis.* 2009 Nov;13(4):545-63.

- 32 Grønbaek H**, Thomsen KL, Rungby J, Schmitz O, Vilstrup H. Role of nonalcoholic fatty liver disease in the development of insulin resistance and diabetes. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2008 Oct;2(5):705-11.
- 33 Day CP**, James OF (1998). "Steatohepatitis: a tale of two "hits"?" *Gastroenterology* 114 4): 842-5.
- 34 Tessari P**, Coracina A, Cosma A, Tiengo A. Hepatic lipid metabolism and non-alcoholic fatty liver disease. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2009 May;19(4):291-302.
- 35 Polyzos SA**, Kountouras J, Zavos C. Nonalcoholic fatty liver disease: the pathogenetic roles of insulin resistance and adipocytokines. *Curr Mol Med*. 2009 Apr;9(3):299-314.
- 36 Berger J**, Moller DE. The mechanisms of action of PPARs. *Annu Rev Med* 2002; 53: 409-35.
- 37 Norata GD**, Pellegatta F, Catapano AL. Peroxisome proliferator activated receptors *Ital Heart J Suppl* 2003; 4 (1): 8-18.
- 38 Cohen JC**, Horton JD, Hobbs HH. Human fatty liver disease: old questions and new insights. *Science*. 2011 Jun 24;332(6037):1519-23. Review.
- 39 Dobrowsky RT**, Kamibayashi C, Mumby MC, Hannun YA. Ceramide activates heterotrimeric protein phosphatase 2A. *J Biol. Chem* 1993;268:15523-30.
- 40 Merrill Jr AH**. De novo sphingolipid biosynthesis: a necessary, but dangerous , pathway. *J Biol Chem* 2002;277:25843-6.
- 41 Schmitz-Peiffer C**, Craig DL, Bidn TJ. Ceramide generation is sufficient to account for the inhibition of the insulin-stimulated PKB pathway in C2C12 skeletal muscle cells pretreated with palmitate. *J Biol Chem* 1999;274:24202-10.
- 42 Randle PJ**. Control of insulin secretion in health and disease. *Isr Med J*. 1963 Nov-Dec;22:408-19.
- 43 Gudz T**, Tserng K and Hoppel C. Direct inhibition of mitochondrial respiratory chain complex III by cell-permeable ceramide. *J. Biol. Chem*.1997;272: 24154±24158

- 44 Kotronen A** et al. Hepatic Stearoyl-CoA Desaturase (SCD)-1 Activity and Diacylglycerol but Not Ceramide Concentrations are Increased in the Non alcoholic Human Fatty Liver. *Diabetes* 58:203–208, 2009.
- 45 Zhihua J**, Jennifer J. Michal, David J. Tobey, Tyler F. Daniels, Daniel C. Rule, Michael D. MacNeil. Significant associations of stearoyl-CoA desaturase (SCD1) gene with fat deposition and composition in skeletal muscle. *Int J Biol Sci* 2008; 4(6):345-351. doi:10.7150/ijbs.4.345.
- 46 Gutiérrez-Juárez R**, Pocai A, Mulas C, Ono H, Bhanot S, Monia BP, Rossetti L. Critical role of stearoyl-CoA desaturase-1 (SCD1) in the onset of diet-induced hepatic insulin resistance. *J Clin Invest.* 2006 Jun;116(6):1686-95.
- 47 Choo QL**, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science.* 1989 Apr 21;244(4902):359-62.
- 48 Kuo G**, Choo QL, Alter HJ, Gitnick GL, Redeker AG, Purcell RH, Miyamura T, Dienstag JL, Alter MJ, Stevens CE, et al. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science.* 1989 Apr 21;244(4902):362-4.
- 49 Seeff LB**, Lindsay KL, Bacon BR, Kresina TF, Hoofnagle JH. Complementary and alternative medicine in chronic liver disease. *Hepatology.* 2001 Sep;34(3):595-603.
- 50 Ghany MG**, Kleiner DE, Alter H, Doo E, Khokar F, Promrat K, Herion D, Park Y, Liang TJ, Hoofnagle JH. Progression of fibrosis in chronic hepatitis C. *Gastroenterology.* 2003 Jan;124(1):97-104.
- 51 Kolykhalov AA**, Mihalik K, Feinstone SM, Rice CM. Hepatitis C virus-encoded enzymatic activities and conserved RNA elements in the 3' nontranslated region are essential for virus replication in vivo. *J Virol.* 2000 Feb;74(4):2046-51.
- 52 Simmonds P**, Smith DB, McOmish F, Yap PL, Kolberg J, Urdea MS, Holmes EC. Identification of genotypes of hepatitis C virus by sequence comparisons in the core, E1 and NS-5 regions. *J Gen Virol.* 1994 May;75 ( Pt 5):1053-61.



- 53 Bartenschlager R**, Penin F, Lohmann V, André P. Assembly of infectious hepatitis C virus particles. *Trends Microbiol* 2011;19:95-103.
- 54 Clement S**, Negro F. Hepatitis C virus: the viral way to fatty liver. *J Hepatol* 2007;46:985-987.
- 55 Cammà C**, Petta S. Insulin resistance in HCV mono-infected and in HIV/HCV co-infected patients: Looking to the future. *J Hepatol* 2009;50:648-51.
- 56 Lonardo A**, Adinolfi LE, Petta S, Craxì A, Loria P. Hepatitis C and diabetes: the inevitable coincidence? *Expert Rev Anti Infect Ther* 2009;7:293-308.
- 57 Petta S**, Amato M, Cabibi D, Cammà C, Di Marco V, Giordano C, et al. Visceral adiposity index is associated with histological findings and high viral load in patients with chronic hepatitis C due to genotype 1. *Hepatology* 2010;52:1543-52.
- 58 Pekow JR**, Bhan AK, Zheng H, Chung RT. Hepatic steatosis is associated with increased frequency of hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis C-related cirrhosis. *Cancer* 2007;109:2490-6.
- 59 Arendt BM**, Mohammed SS, Aghdassi E, Prayitno NR, Ma DW, Nguyen A, Guindi M, Sherman M, Heathcote EJ, Allard JP. Hepatic fatty acid composition differs between chronic hepatitis C patients with and without steatosis. *J Nutr.* 2009;139(4):691-5.
- 60 Puri P**, Baillie RA, Wiest MM, Mirshahi F, Choudhury J, Cheung O, Sargeant C, Contos MJ, Sanyal AJ. A lipidomic analysis of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* 2007 Oct;46(4):1081-90.
- 61 Diamond DL**, Syder AJ, Jacobs JM, Sorensen CM, Walters KA, Prohl SC, McDermott JE, Gritsenko MA, Zhang Q, Zhao R, Metz TO, Camp DG 2nd, Waters KM, Smith RD, Rice CM, Katze MG. Temporal proteome and lipidome profiles reveal hepatitis C virus-associated reprogramming of hepatocellular metabolism and bioenergetics. *PLoS Pathog.* 2010;6(1):e1000719.

- 62 Aizaki, H**, K. Morikawa, M. Fukasawa, H. Hara, Y. Inoue, H. Tani, K. Saito, M. Nishijima, K. Hanada, Y. Matsuura, M. M. Lai, T. Miyamura, T. Wakita, and T. Suzuki. 2008. Critical role of virion-associated cholesterol and sphingolipid in hepatitis C virus infection. *J. Virol.* 82:5715–5724.
- 63 Weng L**, Hirata Y, Arai M, Kohara M, Wakita T, Watashi K, Shimotohno K, He Y, Zhong J, Toyoda T. Sphingomyelin activates hepatitis C virus RNA polymerase in a genotype-specific manner. *J Virol.* 2010;84(22):11761-70.
- 64 Graham Solomons**. *Chimica organica*, 2<sup>a</sup> ed., Bologna, Zanichelli, 2001, pp. 526-543.
- 65 Silverstein RM**; Francis X. Webster, David J. Kiemle, *Identificazione spettrometrica di composti organici*, 2a ed., Milano, Casa Editrice Ambrosiana, Giugno 2006.
- 66 Kenneth A. Rubinson**; Judith F. Rubinson, *Chimica analitica strumentale*, 1a ed., Bologna, Zanichelli, Luglio 2002.
- 67 Skoog DA**; **Leary JJ**, *Chimica analitica strumentale*, Napoli, Edises, 1995.
- 68 Vaglio A**; *Spettrometria e gascromatografia-Spettrometria di massa. Principi e applicazioni*, Padova, Piccin Ed. 1981.
- 69 Gioia, Stradi, Rossi**. *Guida al corso di metodi fisici in chimica organica. Vol .II: massa.*
- 70 Schoenheimer** e Rittenberg, *J.Biol.Chem.* 114(1936) 381
- 71 Kou-Yi Tserng** and Ronda L.Griffin; Ceramide metabolite, not intact ceramide molecule, may be responsible for cellular toxicity; *Biochem. J.*(2004) 80, 715-722
- 72 Matthews DR**, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985;28:412-419.

- 73 Scheuer PJ.** Classification of chronic viral hepatitis: a need for reassessment. *J Hepatol* 1991;13:372-374.
- 74 Kleiner DE,** Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2005;41:313-321.
- 75 Lin X,** Chen Z, Yue P, Averna MR, Ostlund RE Jr, Watson MA, Schonfeld G. A targeted apoB38.9 mutation in mice is associated with reduced hepatic cholesterol synthesis and enhanced lipid peroxidation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2006; 290(6):G1170-6.
- 76 Bligh, E.G,** Dyer, W.J. A rapid method for total lipid extraction and purification. 1959 *Can. J. Biochem. Physiol.* 37:911-917.
- 77 Christie WW.** Gas Chromatography and Lipids, chapter 7. 1989, Editor Oily Press, Bridgewater (on line document: <http://www.lipidlibrary.co.uk>).
- 78 Negro F.** Mechanisms and significance of liver steatosis in hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol.* 2006;12(42):6756-65.
- 79 Lonardo A,** Adinolfi LE, Loria P, Carulli N, Ruggiero G, Day CP. Steatosis and hepatitis C virus: mechanisms and significance for hepatic and extrahepatic disease. *Gastroenterology.* 2004;126(2):586-97.
- 80 Flowers MT,** Ntambi JM. Role of stearoyl-coenzyme A desaturase in regulating lipid metabolism. *Curr Opin Lipidol.* 2008 Jun;19(3):248-56.
- 81 Lam TK,** Gutierrez-Juarez R, Poci A, Bhanot S, Tso P, Schwartz GJ, Rossetti L. Brain glucose metabolism controls the hepatic secretion of triglyceride-rich lipoproteins. *Nat Med.* 2007 Feb;13(2):171-80.
- 82 Videla LA,** Rodrigo R, Araya J, Poniachik J. Oxidative stress and depletion of hepatic long-chain polyunsaturated fatty acids may contribute to nonalcoholic fatty liver disease. *Free Radic Biol Med.* 2004;37(9):1499-507.

**83 Machado RM**, Stefano JT, Oliveira CP, Mello ES, Ferreira FD, Nunes VS, de Lima VM, Quintão EC, Catanozi S, Nakandakare ER, Lottenberg AM. Intake of trans fatty acids causes nonalcoholic steatohepatitis and reduces adipose tissue fat content. *J Nutr.* 2010 Jun;140(6):1127-32.

**84 Sakamoto H**, Okamoto K, Aoki M, Kato H, Katsume A, Ohta A, Tsukuda T, Shimma N, Aoki Y, Arisawa M, Kohara M, Sudoh M. Host sphingolipid biosynthesis as a target for hepatitis C virus therapy. *Nat Chem Biol.* 2005;1(6):333-7.

**85 Kolak M**, Westerbacka J, Velagapudi VR, Wågsäter D, Yetukuri L, Makkonen J, Rissanen A, Häkkinen AM, Lindell M, Bergholm R, Hamsten A, Eriksson P, Fisher RM, Oresic M, Yki-Järvinen H. Adipose tissue inflammation and increased ceramide content characterize subjects with high liver fat content independent of obesity. *Diabetes.* 2007;56(8):1960-8.

**86 Dabrowska MM**, Panasiuk A, Flisiak R. Signal transduction pathways in liver and the influence of hepatitis C virus infection on their activities. *World J Gastroenterol.* 2009 May 14;15(18):2184-9.

**87 Miyoshi H**, Moriya K, Tsutsumi T, Shinzawa S, Fujie H, Shintani Y, Fujinaga H, Goto K, Todoroki T, Suzuki T, Miyamura T, Matsuura Y, Yotsuyanagi H, Koike K. Pathogenesis of lipid metabolism disorder in hepatitis C: polyunsaturated fatty acids counteract lipid alterations induced by the core protein. *J Hepatol.* 2011;54(3):432-8.

