

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI
“FEDERICO II”

Tesi di Dottorato di Ricerca in
Biologia Applicata
XIX ciclo

**“Effetto dell'avanzare dell'età sullo sviluppo dell'obesità e
sulla funzionalità mitocondriale nel ratto”**

Coordinatore
Ch.ma Prof.ssa
AMALIA VIRZO DE SANTO

Docente Tutore
Ch.ma Prof.ssa
LILLA' LIONETTI

Candidata
Dott.ssa
MARIALUISA FERRARO

INDICE

INTRODUZIONE	4
Capitolo 1: Obesità	6
1.1 Obesità e invecchiamento	6
Capitolo 2: Obesità e resistenza alla leptina	11
2.1 Scoperta della leptina	11
2.2 Caratteristiche generali della leptina	12
2.3 Regolazione del bilancio energetico	14
2.4 Resistenza alla leptina	17
Capitolo 3: Resistenza all'insulina e obesità	19
3.1 Caratteristiche generali dell'insulina	19
3.2 Obesità e resistenza all'insulina	20
3.3 Metodi di determinazione della sensibilità all'insulina	25
Capitolo 4: Efficienza mitocondriale e invecchiamento	28
4.1 I mitocondri	28
4.2 Disaccoppiamento della fosforilazione mitocondriale	31
4.3 Mitocondri e invecchiamento	40
4.4 Popolazioni mitocondriali del muscolo scheletrico: i mitocondri subsarcolemmatici e intermiofibrillari	41
SCOPO DELLA TESI	44
PARTE SPERIMENTALE	49
Disegno sperimentale	49
Determinazione del contenuto energetico e della composizione corporea	49
Misura dell'energia metabolizzabile assunta	53
Preparazione del siero	53
Dosaggio della leptina, degli acidi grassi, dell'ormone T ₃ , dell'insulina, del glucosio	54
Preparazione dei mitocondri di fegato	54
Preparazione dei mitocondri subsarcolemmatici ed intermiofibrillari del muscolo scheletrico	57
Dosaggio proteico	60
Misura dell'attività respiratoria nei mitocondri isolati	60

Misura del potenziale di membrana sui mitocondri isolati	62
Misura della conduttanza protonica basale	63
Misura della conduttanza protonica indotta dagli acidi grassi	65
Misura del contenuto di UCP3 nei mitocondri isolati	66
Determinazione dell'attività specifica della citocromo ossidasi	67
Misura del contenuto di ANT	67
Analisi statistica	68
RISULTATI	69
DISCUSSIONE	97
BIBLIOGRAFIA CONSULTATA	112
BIBLIOGRAFIA CITATA	115

INTRODUZIONE

Allo stato attuale, sia per il benessere sociale sia per l'abbondanza di cibo, è frequente riscontrare casi di sovrappeso ed obesità che rappresentano non solo un grave problema estetico, ma soprattutto un problema fisiopatologico, in quanto associati a gravi malattie, oggi a larga diffusione, come ipertensione, diabete, ipercolesterolemia, aterosclerosi, infarto ed ictus, che sono responsabili di un alto rischio di mortalità principalmente nei paesi occidentali soprattutto nell'età adulta.

Per definire cosa si intenda per sovrappeso ed obesità, bisogna chiarire il significato di peso ideale, riferito a quel peso corporeo associato ad uno stato nutrizionale ottimale e ad un ottimo stato di salute, che aumenta la longevità di un individuo. In effetti l'obesità è una complessa sindrome metabolica che provoca alterazioni del bilancio energetico e accumulo eccessivo di tessuto adiposo. Essa è influenzata da molti fattori, tra cui la predisposizione ereditaria, fattori ambientali e comportali, ma anche dall'invecchiamento. E' infatti assodato che non sempre l'obesità è semplicemente il risultato di un eccessivo introito di cibi particolarmente gradevoli al palato (generalmente ricchi di grassi) o della mancanza di attività fisica, ma è favorita anche da fattori come stress, farmaci o alterazioni metaboliche ormonali che alterano il normale funzionamento dei meccanismi fisiologici capaci di regolare l'apporto di energia in relazione ai consumi, come, ad esempio, con l'avanzare dell'età.

Pertanto appare sempre più importante da un lato mettere appunto dei sistemi di sorveglianza del sovrappeso/obesità, sensibili e adattati alle realtà della popolazione in base alle fasce di età e dall'altro elaborare dei sistemi di analisi atti a prevenire queste due manifestazioni, attraverso lo studio dei meccanismi che sono alla base della regolazione dell'introito calorico e della spesa energetica. Alla luce di tutte queste considerazioni, ho ritenuto estremamente interessante analizzare le eventuali alterazioni nella composizione corporea di ratti di diverse età, scegliendo le fasi di sviluppo che precedono o preparano la fase d'invecchiamento vera e propria, chiedendomi quali fossero le cause delle alterazioni della regolazione del bilancio energetico sia a livello ormonale che metabolico. Ho, inoltre, analizzato l'efficienza energetica mitocondriale di due importanti tessuti coinvolti nel metabolismo corporeo, quali il tessuto epatico e quello muscolare, valutandone la funzionalità, cioè l'attività e il grado di efficienza dei mitocondri, ritenendo questo studio interessante per comprendere se già in fase adulta fossero evidenti quei fenomeni che preludono al declino cellulare che si verifica con l'avanzare dell'età. Lo studio dell'attività mitocondriale in ratti in diverse fasi della vita permette, quindi, di seguire lo sviluppo dei processi fisiologici associato all'età, permettendo così di individuare le fasi della vita in cui eventuali danni iniziano a manifestarsi.

1. Obesità

1.1 Obesità e invecchiamento.

L'obesità rappresenta un prevalente problema nutrizionale a livello mondiale, che a lungo termine predispone allo sviluppo di diabete mellito, ipertensione, carcinomi, osteoartriti, calcoli biliari e disturbi cardiovascolari [1]. La coordinazione tra l'introito calorico e la spesa energetica è coinvolta nella regolazione del peso corporeo: l'obesità, che è definita come un eccesso di grasso corporeo, può essere causata da alterazioni complesse e a lungo termine del bilancio energetico. In generale, quando l'assunzione di cibo supera la spesa energetica, l'energia in eccesso viene depositata sotto forma di grasso.

Recenti ricerche dimostrano che la taglia corporea è correlata negativamente alla longevità e all'aspettativa di vita ed è, invece, positivamente correlata alla mortalità. Inoltre, è stato ampiamente dimostrato che l'eccesso di massa grassa può promuovere l'insorgenza di disturbi cronici che portano a condizioni di obesità e alla morte [2].

Data l'importanza di un meccanismo così delicato, per mantenere in equilibrio l'energia in entrata con quella in uscita, il corpo è capace di cambiare il proprio metabolismo corporeo, ma solo in determinate situazioni. Ad esempio è stato dimostrato che, in ratti giovani, quando l'introito energetico eccede la spesa energetica, la velocità metabolica corporea può aumentare e una parte dell'energia in eccesso viene rilasciata sotto forma di produzione di calore [3;4].

Questo meccanismo di adattamento della spesa energetica all'energia introdotta in eccesso non è però attivato in ratti più anziani [5].

La perdita dei meccanismi che ristabiliscono un equilibrio nel bilancio energetico potrebbe essere spiegato dal fatto che l'invecchiamento deriva da un deficit progressivo nella funzionalità delle cellule e degli organi, che spesso porta a disturbi che conducono l'organismo alla morte, come cancro, disturbi cardiovascolari e disordini neurodegenerativi [6].

È noto che l'invecchiamento è associato ad un graduale aumento del contenuto corporeo dei lipidi e ad una maggiore propensione all'obesità, sia nei roditori che nell'uomo [7;8;9]. Nei roditori appare difficile giustificare tali modificazioni attribuendole esclusivamente a cambiamenti dell'appetito e dell'assunzione di energia; piuttosto è probabile che le succitate modificazioni siano dovute a variazioni nella capacità di produzione dell'energia. Possiamo dire che nei ratti più anziani alcuni meccanismi regolatori che permettono di mantenere stabile il peso corporeo possono non agire più. L'uomo e i roditori condividono delle comuni caratteristiche nei cambiamenti della composizione del corpo durante l'invecchiamento. Negli umani, l'età di per sé è un importante fattore di rischio per l'accumulo di grasso [10]. La recente variazione delle curve demografiche riguardo alla popolazione anziana è in corrispondenza con l'aumentare dell'introito di alimenti ricchi di grassi, tanto da far considerare l'obesità come un epidemia. Infatti è stato ormai accertato che, senza l'utilizzo di appropriati farmaci contro l'obesità, l'aumento di massa grassa e tutte le patologie ad esso

correlate possono ridurre la durata della vita [11]. Invece, nei roditori è stato visto che la restrizione calorica può non solo allungare del 40% la durata della vita, ma si accompagna anche ad un proporzionale aumento dello stato di buona salute [12]. Studi effettuati sull'uomo che utilizzano misure antropometriche suggeriscono che tra la pubertà e la prima maturità c'è un aumento della massa grassa e un lento incremento della massa magra del corpo [8]; inoltre vi è una tendenza ad un aumento graduale del peso corporeo oltre i sessanta anni di età. Generalmente, la massa grassa corporea tende ad aumentare verso i 55-65 anni negli uomini e da allora in poi può aumentare, può decrescere o può restare immutata, mentre quella magra decresce [8]. Per quanto riguarda i roditori, i ratti Sprague-Dawley mostrano un andamento delle variazioni della composizione corporea con l'età simile a quello descritto per l'uomo [8;9]. Inoltre i ratti maschi del ceppo Wistar alimentati con una dieta di laboratorio sviluppano con l'invecchiamento un tipo di obesità spontanea che, diversamente da altri modelli animali di obesità, è di dimensioni moderate in quanto il grasso corporeo raggiunge circa il 35% del peso corporeo totale. È stato ipotizzato che tale obesità spontanea possa essere il risultato della combinazione dell'età, del libero accesso al cibo e della limitazione dell'attività locomotoria spontanea, dovuta alla restrizione della gabbia [7]. Similmente a quanto accade nell'obesità umana, il ratto Wistar aumenta la sua massa adiposa lentamente e progressivamente con l'età, attraverso processi che aumentano sia la dimensione delle cellule adipose

che il numero. Questo aumento della massa grassa è dovuto al continuo deposito di lipidi causato da un introito calorico che eccede la spesa.

L'invecchiamento, inoltre, sia negli uomini che nei roditori è associato ad un aumento dei livelli di insulina sia a digiuno che dopo il pasto: questo aumento suggerisce uno stato di resistenza all'insulina. L'avanzare dell'età è inoltre associato anche ad una diminuzione della capacità lipolitica e ad un aumento della sintesi e dell'uptake degli acidi grassi negli adipociti, mentre l'ossidazione degli acidi grassi nel muscolo scheletrico sembra essere ridotta [11]. Altri fattori come una diminuzione nella capacità di compiere esercizi e cambiamenti nella distribuzione del grasso, possono giocare un ruolo importante nel processo dell'aumento della massa grassa durante l'invecchiamento [7]. Molti ricercatori hanno proposto l'uso di modelli animali durante l'invecchiamento per esaminare il relativo impatto dei fattori metabolici specifici. Barzilay e Rossetti hanno scelto i ratti Sprague-Dawley (SD) e Fisher 344 (F344) [8]. In questi animali l'aumento della massa grassa durante l'invecchiamento era correlato significativamente con l'aumento dei livelli plasmatici degli acidi grassi liberi, dell'insulina e del glicerolo. Questo aumento era più marcato tra i quattro e i quattordici mesi di età in ambedue i modelli di ratto. D'altra parte la risposta all'insulina nei ratti diminuiva tra i due e i quattro mesi di età [8]. Questo difetto precoce dell'utilizzazione del glucosio è certamente dovuto alla diminuzione della glicolisi che non è indebolita ulteriormente con l'età. La cosa interessante è che questo declino è associato ad un rapido incremento della massa grassa corporea

con un minimo aumento di quella magra come si vede nei giovani adulti. Questo risultato mette in evidenza come la resistenza all'insulina collegato all'obesità nel corso dell'invecchiamento è preceduto da un precoce danneggiamento del metabolismo cellulare del glucosio e da una diminuzione della risposta all'insulina che avviene nei ratti giovani adulti tra i due e i quattro mesi di età [8]. Questo fa capire l'importanza dello studio del metabolismo negli organismi in fase di accrescimento o durante la vita adulta per meglio comprendere i difetti metabolici che si svilupperanno durante il processo di invecchiamento.

2. Obesità e resistenza alla leptina

2.1 Scoperta della leptina.

La scoperta, nel 1994, da parte di Friedman del gene *ob* e successivamente del suo prodotto genico, la leptina, ha permesso di gettare luce sul meccanismo omeostatico di regolazione del peso corporeo, già postulato da Kennedy negli anni 50' con la teoria adipostatica [13]. Questa teoria suppone l'esistenza di un fattore lipostatico umorale prodotto dagli adipociti che raggiunto il cervello, attiva un meccanismo a feedback inibendo l'assunzione di cibo e aumentando il consumo di energia, quando il peso del corpo va oltre un certo valore soglia (punto di controllo). La presenza di questo fattore lipostatico fu identificata da Coleman già nel 1973, attraverso esperimenti di parabiosi sui ratti [14]. Da questi esperimenti si vide che non tutti i topi obesi presentavano la stessa mutazione recessiva (*ob/ob*), ma alcuni presentavano un'altra mutazione recessiva (*db/db*) avente lo stesso fenotipo dei topi *ob/ob*.

Quando si mettevano in circolazione crociata un topo *ob* ed uno normale, si osservava che il topo obeso iniziava a dimagrire, dimostrando l'esistenza di un fattore prodotto dal topo normale (oggi sappiamo essere la leptina), che attraverso la circolazione congiunta, passava al topo obeso.

In un altro esperimento si mise in parabiosi un topo *db* ed uno normale, osservando questa volta un dimagrimento del topo normale. I topi *db* presentano una mutazione del gene per il recettore della leptina, per cui producono grosse

quantità di leptina che, però, non può agire sull'organismo che lo ha prodotto ma causa un dimagrimento nel topo normale, fino a morte.

Infine unendo due topi obesi, uno *ob* e l'altro *db*, si osservò che il topo *ob* dimagriva mentre l'altro rimaneva di ugual peso. In questo caso la leptina prodotta dal topo *db* passando al topo *ob*, che invece non la produceva, determinava un suo dimagrimento [14].

Oggi sappiamo che il gene *ob* codifica per la leptina, mentre il gene *db* codifica per il suo recettore.

2.2 Caratteristiche generali della leptina.

Il termine "leptina" deriva dal greco "leptos", che vuol dire magro. È una citochina di 16 KD, secreta dal tessuto adiposo (e in misura minore dal midollo osseo e dalla placenta) che circola nel torrente circolatorio in quantità proporzionali all'adiposità corporea ed è un importante segnale nella regolazione del bilancio energetico [15]

La leptina svolge numerose funzioni agendo sia a livello centrale che a livello periferico, in quanto controlla le riserve di grasso corporeo attraverso una regolazione coordinata del comportamento alimentare, del metabolismo, delle risposte neuroendocrine, del sistema nervoso autonomo e del bilancio energetico dei roditori e degli uomini [15]. Essa sembra quindi essere il segnale ormonale, ricercato per anni, che dal tessuto adiposo arriva al cervello, giocando un ruolo importante nel controllo dell'appetito. È stato infatti visto che mutazioni del gene

che codifica per questo ormone o per il suo recettore causa insorgenza di obesità sia nei roditori che nell'uomo [16].

La leptina svolge le sue funzioni legandosi al proprio recettore Ob-R, che è il prodotto del gene *diabetes (db)*, isolato inizialmente nel plesso coroideo del topo [17], correlato alla classe I della famiglia di citochine dei recettori e lega la leptina con affinità nanomolare. La distribuzione di Ob-R in numerosi organi spiega le molteplici azioni della leptina. La clonazione posizionale del gene *db* (o gene Ob-R) ha dimostrato che questo gene codifica per cinque diverse isoforme del recettore, ottenute per splicing alternativo, che sono: Ob-Ra, Ob-Rb, Ob-Rc, Ob-Rd ed Ob-Re [18].

Le forme Ob-Ra, Ob-Rc e Ob-Rd, definite forme “corte”, non presentano la regione citoplasmatica e quindi molto probabilmente non possono trasdurre il segnale della leptina. La isoforma Ob-Re è solubile in quanto manca del dominio transmembrana e del dominio citoplasmatica [18;19].

La isoforma lunga Ob-Rb è normalmente espressa a livello dei neuroni ipotalamici e in altri tipi di cellule, quali le cellule dell'endotelio vascolare. L'uso delle tecniche di ibridazione *in situ* hanno permesso di identificare i principali siti di espressione di Ob-Rb nel sistema nervoso centrale che sono: i nuclei dorsomediali, paraventricolari, ventromediali e laterali [20]. Questi nuclei sono importanti nella regolazione del peso corporeo, in quanto esprimono uno o più neuropeptidi e neurotrasmettitori che regolano l'assunzione di cibo e/o il peso corporeo [19;20]. Quindi tenendo conto della sua struttura funzionale e della sua localizzazione,

L'Ob-Rb sembra essere essenziale per l'azione della leptina sull'assunzione di cibo e la regolazione del peso corporeo attraverso l'alterazione dell'espressione di molti neuropeptidi ipotalamici.

2.3 Leptina e regolazione del bilancio energetico.

Recenti ricerche hanno rilevato che la proteina OB, agendo su diverse strutture cerebrali e con diversi meccanismi, svolge un ruolo importante sulla regolazione del bilancio energetico [16].

Tenendo presente l'ampia localizzazione dei suoi recettori, si può ipotizzare che la leptina agisca sia a livello del sistema nervoso centrale che a livello del metabolismo dei tessuti periferici. La leptina può alterare i depositi energetici adiposi corporei influenzando entrambe le componenti dell'equazione del bilancio energetico, agendo sia sull'imput cioè l'alimentazione, sia sull'output, ossia la spesa energetica. La leptina, infatti, in funzione ai depositi di grasso, riduce l'assunzione di cibo ed aumenta la spesa energetica.

L'azione della leptina sembra esprimersi a livello dell'ipotalamo dove si lega al recettore delle cellule del nucleo arcuato; alcune di queste cellule producono il NEUROPEPTIDE Y (NPY) che è il peptide responsabile dell'assunzione di cibo. Dopo un periodo di digiuno a livello ipotalamico ci sono elevati valori di NPY, evento che stimola l'assunzione di cibo, la secrezione insulinica e riduce la spesa energetica [21].

A lungo termine elevati livelli di NPY porterebbero ad un aumento del deposito di grassi che però, comporterebbe anche una maggiore produzione di leptina, la quale interagisce con i recettori delle cellule arcuate e fa in modo che non sia più secreto NPY [21].

La leptina oltre a dare un segnale negativo alla produzione di NPY, produce anche un segnale positivo alla produzione dell'ormone rilasciante corticotropina, (CRH).

Il CRH svolge una funzione opposta rispetto a quella del NPY, poichè provoca un aumento della spesa energetica e quindi una maggiore mobilitazione dei grassi presenti nelle cellule del tessuto adiposo.

La leptina, inibendo la produzione di NPY e stimolando la produzione di CRH, comporta una diminuzione dell'introito calorico e un aumento della spesa energetica. Di conseguenza, nel momento in cui diminuisce il tessuto adiposo viene prodotta meno leptina e il sistema rimane in equilibrio.

Analizzando il sistema di controllo nei dettagli, il primo nucleo che risente del segnale della leptina è quello arcuato. A seconda del segnale possono essere attivati i neuroni che producono numerose sostanze ad azione oressigena ed anoressigena.

Le prove anatomiche e sperimentali implicano chiaramente che i segnali oressigeni non agiscono uno per volta, ma costituiscono una rete interconnessa che integra la regolazione ipotalamica dell'assunzione di cibo.

Da ciò scaturisce che durante il digiuno si riduce la concentrazione di leptina, viene sintetizzato NPY e AGRP, aumenta l'appetito e si riduce la spesa energetica. Se il digiuno si prolunga e si esauriscono le riserve di glicogeno nel fegato si passa dal metabolismo dei carboidrati a quello dei grassi. Ciò si attua con una caduta dell'insulina ed un innalzamento degli ormoni controregolatori come il glucagone, l'adrenalina ed i glucocorticoidi. In questa maniera viene stimolata la gluconeogenesi (sintesi di glucosio stimolata dal glucagone) per rifornire il cervello di glucosio, viene attivata la lipolisi per ricavare energia per gli altri tessuti. La riduzione della spesa energetica avviene sopprimendo in parte la termogenesi [14].

Oltre a regolare a livello ipotalamico l'assunzione del cibo, la leptina agirebbe su diversi altri tipi cellulari. Questa ipotesi deriva dall'identificazione del recettore Ob-Rb su tessuti e tipi cellulari diversi dall'ipotalamo [17].

Quindi a livello periferico la leptina indebolisce il segnale dell'insulina a livello del muscolo e degli adipociti; indebolisce la captazione del glucosio mediata dall'insulina; inibisce la lipogenesi, stimola la lipolisi. Inoltre si ritiene che la leptina agisca direttamente sull'epitelio del digiuno, attraverso il recettore Ob-Rb [22]. La carenza di leptina o la resistenza alla sua attività a questo livello potrebbero contribuire all'insorgenza e al mantenimento dell'obesità, intervenendo direttamente sull'assorbimento lipidico.

2.4 Resistenza alla leptina.

Negli ultimi anni a seguito della scoperta della leptina, si è dimostrato che la quantità di massa lipidica corporea è determinata non solo da fattori comportamentali, ma da una complessa interazione tra fattori ambientali e genetici. Si è dimostrata l'idea che esista un "set point" del peso corporeo, in ciascun individuo, che impedisce il cambiamento di peso. Nel tessuto adiposo esistono quindi dei "sensori" in grado di indicare l'entità dei depositi di grasso e trasmettere poi questa informazione a recettori, o "adipostato", presenti a livello ipotalamico.

Negli ultimi anni, quindi, la ricerca sull'obesità si è concentrata sullo studio della leptina, avanzando l'ipotesi, fortemente sostenuta da più autori, di utilizzare questa molecola come farmaco anti-obesità. Questa ipotesi è stata avanzata in quanto si pensava che l'obesità umana fosse causata da una deficienza di leptina.

Dai numerosi studi condotti, è stato osservato però che le concentrazioni di proteina OB nel siero di individui obesi erano certamente maggiori rispetto alle concentrazioni della stessa proteina in individui magri [23].

L'insensibilità alla proteina OB negli individui obesi potrebbe dipendere da vari fattori quali:

1. Difetto post-recettoriale nella trasduzione del segnale leptinico attraverso il pathway della janus chinasi (JAK-STAT).
2. Trasporto deficitario di leptina attraverso le cellule della barriera emato-encefalica (ipotesi avvalorata dall'osservazione che esseri umani obesi

presentano livelli di leptina nel liquido cerebrospinale più bassi rispetto a quelli plasmatici) [14].

3. Saturazione dei recettori leptinici a livello del cervello.
4. Diminuzione dell'attività biologica dell'ormone a seguito di una elevata proporzione di leptina legata al recettore Ob-Re nel sangue.

L'insorgenza della resistenza alla leptina induce un'alterazione dei meccanismi di controllo di regolazione del bilancio energetico, inducendo quindi una propensione all'obesità.

3. Resistenza all'insulina e obesità.

3.1 Caratteristiche generali dell'insulina.

L'insulina è un ormone proteico anabolico, secreto dalle cellule B del pancreas che agisce sul metabolismo glucidico, proteico e lipidico determinando un accumulo di glucidi, protidi e lipidi e limitandone le perdite.

Quando la concentrazione di glucosio nel sangue è alta, come dopo un pasto, il pancreas secerne insulina che comunica al fegato di prelevare il glucosio dal sangue e di immagazzinarlo. Siccome la capacità del fegato di immagazzinare glucosio è piuttosto limitata (circa 70 grammi), i carboidrati in eccesso vengono convertiti in grassi e depositati nei tessuti adiposi. L'insulina provoca, quindi, una riduzione della glicemia, della amminoacidemia, della quantità di grassi nel sangue determinando un accumulo di questi elementi nei tessuti. Nel fegato l'insulina stimola, altresì, la formazione di glicogeno, un polimero formato da tante molecole di glucosio legate chimicamente tra loro, che si accumula anche nel muscolo in modo da poter essere utilizzato nei periodi di digiuno, così gli organi e i tessuti avranno in qualunque momento della giornata un substrato energetico disponibile. Inoltre l'insulina favorisce la sintesi ed il deposito dei grassi nelle cellule adipose spingendo la cellula ad utilizzare i carboidrati come fonte energetica.

Diversamente dagli altri ormoni endocrini, la produzione di insulina non è pilotata dall'ipofisi pur essendo, comunque, soggetta ad un controllo indiretto da parte dell'ipotalamo; in questa parte del cervello l'equilibrio di due

neurotrasmettitori, la serotonina (che la stimola) e la dopamina (che la inibisce), influisce fortemente sulla secrezione dell'insulina.

Sebbene sia un ormone peptidico e, quindi, a base proteica, non utilizza alcuna proteina di trasporto per mantenere i livelli nel sistema circolatorio. Il suo periodo di emivita varia da 4 a 6 minuti ed in questo tempo deve raggiungere la cellula bersaglio, identificarne il recettore e attivare tutti i processi metabolici che da questo legame dipendono. Il recettore dell'insulina attivato è un enzima che catalizza la fosforilazione di residui di tirosina in proteine substrato. I domini contenenti l'attività tirosina chinasi del recettore si trovano nella porzione citosolica della proteina, mentre l'ormone si lega alla porzione extracellulare. Una volta che l'insulina si è legata all'ormone accende l'attività tirosina chinasi del recettore, il quale, una volta attivato, fosforila due residui di tirosina presenti a livello dell'IRS-1. Al termine di queste fosforilazioni, l'IRS-1 attiva la fosfoinositolo-3-chinasi, la quale fa esprimere il trasportatore del glucosio a livello delle cellule bersaglio [24].

3.2 Obesità e resistenza all'insulina.

Tra i meccanismi che conducono all'obesità gioca un ruolo chiave l'insulino-resistenza. Poiché l'insulina è una molecola ad alto peso molecolare, non può entrare direttamente nelle cellule, ma deve agire attraverso dei recettori presenti sulla loro membrana plasmatica. Quando c'è insulino-resistenza si possono avere difetti molecolari localizzati:

- *in sede recettoriale*, per cui è ridotto il legame dell'ormone al suo recettore e/o la trasmissione transmembrana del segnale ormonale. Questo fa sì che le cellule non riescono a recepire il messaggio portato dall'insulina;
- *in sede post-recettoriale*, per cui esiste un'anomalia a livello dei trasportatori di membrana e di tutti quelli che sono gli effettori del messaggio.

Tale patologia può coinvolgere più organi o tessuti (ad esempio, fegato, muscolo scheletrico e tessuto adiposo) oppure un unico tipo cellulare (ad esempio la cellula muscolare scheletrica). Inoltre, nel singolo individuo, il fenomeno può estendersi a numerosi processi biologici (ad esempio la regolazione del metabolismo glucidico, lipidico e proteico) o essere limitato a poche azioni ormonali (ad esempio la regolazione della sintesi di glicogeno). L'insulino-resistenza, infatti, potrebbe essere un prodotto della diminuita sintesi di glicogeno nel muscolo scheletrico, meccanismo normalmente stimolato dall'insulina, che può essere attribuita ad una diminuita attività del trasporto del glucosio, anch'esso stimolato dall'insulina [24].

Questa patologia è associata alla cosiddetta “sindrome X” o “sindrome metabolica”. Il fenotipo dei portatori di questa sindrome può essere molto variabile, ma un elemento comune a questi soggetti sembra essere il binomio iperinsulinemia/insulino-resistenza. I soggetti con rilevanti alterazioni metaboliche come una ridotta tolleranza glucidica o diabete; ipertensione

arteriosa; dislipidemia; iperuricemia sono quelli che presentano un rischio cardiovascolare maggiore rispetto ai soggetti con alterazioni minime, cioè che presentino solo iperinsulinemia e insulino-resistenza. Tenendo presente queste differenze si considera il primo caso come “sindrome plurimetabolica” e il secondo caso come “sindrome dell’insulino-resistenza”.

Le alterazioni responsabili di insulino-resistenza possono avere origine genetica o acquisita, come nel caso dell’iperglicemia cronica che sembra essere in grado di condizionare lo sviluppo di insulino-resistenza con un meccanismo noto come “glucotossicità”. Inoltre anche elevate concentrazioni circolanti di acidi grassi liberi sembrano essere in grado di determinare insulino-resistenza con vari meccanismi. Studi recenti hanno dimostrato che questo difetto sembra essere il risultato di una inibizione intracellulare indotta dai lipidi della fosforilazione su tiroxina del substrato del recettore dell’insulina (IRS-1), che si riflette su una ridotta attività del fosfatidilinositolo-3-chinasi (PI-3-K) associato a IRS-1 [24]. Questa chinasi gioca un ruolo fondamentale per l’attività di trasporto del glucosio nel muscolo scheletrico [25], in quanto dopo il legame tra insulina e recettore si ha la fosforilazione di IRS-1 che attiva il PI-3-K. Tutte queste reazioni fanno esprimere Glut-4 sulla membrana della cellula muscolare [26]. Quando i livelli plasmatici e intracellulari di acidi grassi aumentano viene abolita l’attivazione da parte dell’insulina di IRS-1 e, conseguentemente, del PI-3-K [26]. Esperimenti effettuati su ratti hanno evidenziato che i metaboliti lipidici attivano la proteina chinasi C (PKC), che attraverso delle serina-treonina chinasi, fosforica l’IRS-1 su

serina, impedendo la normale fosforilazione su tiroxina. Questo fa diminuire del 50% la stimolazione da parte dell'insulina dell'attività del PI-3-K [27]. Questo fenomeno è stato da alcuni definito "lipotossicità".

L'insulino-resistenza è un elemento patogenetico associato a molte condizioni cliniche, tra cui ricordiamo :

1) il *diabete tipo II* [28], che si rileva in circa il 75-80% dei casi. In questo caso l'insulina determina una minore utilizzazione di glucosio nell'organismo e questo fenomeno è in gran parte da attribuire ad una compromissione dell'utilizzazione di glucosio nel muscolo scheletrico. Inoltre nel diabete tipo II l'insulina esercita una minore azione di soppressione nella produzione epatica di glucosio. I meccanismi molecolari alla base del fenomeno dell'insulino resistenza nel diabete tipo II possono essere collegati a vari fattori: una riduzione del numero di recettori insulinici sulla cellula; una minore attività dell'enzima proteinchinasico recettoriale che trasmette il segnale ormonale dentro la cellula; un ridotto trasporto transmembrana del glucosio; una minore attività di uno o più enzimi chiave dell'utilizzazione intracellulare del glucosio. In larga parte soprattutto nei soggetti non obesi, i difetti degli effettori di membrana e intracellulari dipendono soprattutto da alterazioni di tipo post-recettoriale. Queste ultime sono in parte geneticamente determinate, ma alla loro genesi concorrono probabilmente l'iperinsulinemia, l'iperglicemia e l'aumento degli acidi grassi, peculiari del diabete tipo II. L'iperinsulinemia sembra essere in grado di indurre insulino-resistenza sia a livello recettoriale che post-recettoriale, l'iperglicemia sembra

essere in grado di determinare insulino-resistenza a livello post-recettoriale, l'aumento degli acidi grassi determina una ridotta utilizzazione glucidica a livello muscolare. Secondo alcuni autori nel diabete tipo II l'insulino resistenza è il difetto primitivo responsabile dell'insorgenza del diabete. Secondo altri essa fa invece seguito alle alterazioni β cellulari. In realtà l'ipotesi più verosimile è che in alcuni soggetti il difetto iniziale sia l'uno e in altri soggetti il difetto iniziale sia l'altro, e che in entrambi i casi il risultato finale sia un'associazione di insulino resistenza e difetto β cellulare con fenotipo di diabete tipo II [28];

2) *l'obesità*, in quanto la maggioranza dei soggetti obesi è insulino resistente. È interessante notare che l'insulino resistenza dell'obesità ha caratteristiche qualitative e quantitative molto simili a quelle dell'insulino resistenza del diabete tipo II. Appare quindi logico ipotizzare che proprio l'insulino resistenza costituisca l'elemento fisiopatologico che mette in relazione il diabete con l'obesità. Tale diversità nella sensibilità insulinica probabilmente è dovuta al fatto che l'insulino resistenza sembra avere una spiccata componente genetica. A sostegno di tale ipotesi è anche la recente osservazione che i soggetti con più severa insulino resistenza (sia fra gli obesi che fra i non obesi) sviluppano più facilmente il diabete [29];

3) *i fattori di rischio vascolare* [30] come l'ipertensione, la dislipidemia, l'iperuricemia e la trombofilia, lieve aumento di colesterolo LDL ed abbassamento di quello HDL. È da ipotizzare che gran parte di queste patologie associate all'insulino resistenza, sia da attribuire all'iperinsulinemia che

scaturisce per compensare i ridotti effetti biologici dell'insulina. Al momento attuale, comunque, non è chiaro se la relazione causa-effetto, ammesso che essa esista realmente, sia quella riscontrata tra insulino resistenza e fattori di rischio vascolare o quella rilevata tra tali fattori e l'iperinsulinemia [30].

3.3 Metodi di determinazione della sensibilità all'insulina.

La sensibilità insulinica può essere valutata in vitro e in vivo. Nel primo caso è necessario eseguire biopsie oppure ottenere frammenti di tessuto in corso di intervento chirurgico, utilizzando poi il materiale a fresco o dopo coltura cellulare. Si tratta, ovviamente di un approccio invasivo ed utilizzabile solo a scopo di ricerca.

Meno problematica è l'esecuzione di misurazioni in vivo. Una misura di sensibilità insulinica (e quindi di insulino resistenza) del metabolismo glucidico in vivo può essere ottenuta con svariati metodi. Tra questi il più accurato (il *clamp* iperinsulinemico) è adatto solo per studi clinici coinvolgenti un numero limitato di individui. Con questo metodo si infonde insulina per alcune ore (in genere 2-3 ore), innalzando e mantenendo costanti le concentrazioni ematiche dell'ormone ad un livello prefissato (in genere 60-70 $\mu\text{U/ml}$), e si mantiene la glicemia ad un livello prestabilito (in genere 90 mg/dl) con un' infusione di glucosio la cui velocità è cambiata ogni 5-10 minuti a seconda delle variazioni che tende a subire la glicemia.

In pratica il test misura la quantità di glucosio infusa (e quindi metabolizzata) nell'unità di tempo per effetto dell'esposizione all'insulina. Questo metodo è costoso ed impegnativo sia per l'operatore che per il paziente.

Metodi alternativi come l'infusione combinata di glucosio, insulina e somatostatina, durante la quale si valuta a quale valore si stabilizza la glicemia durante tale infusione, o il carico endovena di glucosio, con cui si valuta la cinetica di scomparsa del glucosio dal sangue con modelli matematici, sono solo lievemente meno complessi e danno risultati decisamente meno affidabili. Un metodo più preciso può essere quello dell'analisi parallela dei livelli di glucosio e insulina nel siero, sia di soggetti umani che animali, in seguito ad un carico di glucosio endovenoso o orale monitorato con prelievi effettuati ogni 30 minuti, di solito per circa 120 minuti. Questa misura permette di valutare quale sia la sensibilità delle cellule all'insulina e contemporaneamente di determinare se l'insulina secreta è ancora sufficiente a riportare a valori normali la glicemia. Un test di rapida e semplice esecuzione, di immediata interpretazione e di basso costo è il test breve di tolleranza insulinica, il cui utilizzo, tuttavia, non permette di dare misure accurate della quantità di glucosio metabolizzato. Con questo test viene misurata la costante di scomparsa del glucosio dal plasma nei 15 minuti successivi all'iniezione endovenosa di insulina.

Tutti questi tests, con la parziale eccezione dell'ultimo descritto, sono difficili da utilizzare in ampie serie di soggetti. Per tale motivo, salvo rare eccezioni, in ambito clinico ed epidemiologico è sempre stata utilizzata la determinazione

dell'insulinemia, con l'assunzione che l'iperinsulinemia documenti uno stato di insulino resistenza.

La relazione tra glucosio ed insulina nello stato basale, riflette l'equilibrio tra la produzione di glucosio epatico e la secrezione di insulina.

4. Efficienza mitocondriale ed invecchiamento

4.1 I mitocondri

I mitocondri, presenti in qualsiasi cellula eucariotica, sono organelli che convertono l'energia in forme utili a promuovere le reazioni cellulari e perciò sono considerati la centrale energetica della cellula. In accordo alla loro importanza nel metabolismo, questi organelli occupano in genere una frazione importante del volume cellulare totale. I mitocondri hanno una forma approssimativamente cilindrica e allungata, con un diametro pari a 0,5-1 μm e sono costituiti da diversi compartimenti, ciascuno con specifiche funzioni metaboliche, demarcati da una membrana mitocondriale interna e una esterna. La membrana esterna circonda gli organelli, mentre quella interna racchiude lo spazio interno, detto matrice. Lo spazio intermembrana è localizzato tra queste due membrane e contiene un distinto gruppo di proteine, che includono il trasportatore mobile degli elettroni, ossia il citocromo c [31]. La membrana esterna è impermeabile alle molecole più grandi di 1500 Da, mentre quella interna è altamente specializzata, in quanto contiene un'alta proporzione del fosfolipide «doppio» cardiolipina, che contiene quattro acidi grassi e contribuisce a rendere la membrana particolarmente impermeabile agli ioni. Essa contiene anche una varietà di proteine di trasporto che la rendono selettivamente permeabile a quelle piccole molecole che sono metabolizzate o richieste dai molti enzimi mitocondriali concentrati nello spazio della matrice.

La membrana mitocondriale interna, inoltre, è costituita da porzioni che rientrano nello spazio della matrice e che costituiscono le creste mitocondriali. Su queste creste vi è la catena di trasporto degli elettroni, l'apparato di fosforilazione e i trasportatori di membrana.

I donatori di elettroni, NADH e FADH_2 , forniscono equivalenti ridotti alla catena di trasporto. La piruvato deidrogenasi genera NADH. Gli enzimi del ciclo degli acidi tricarbossilici localizzati nella matrice producono FADH_2 e NADH. La beta ossidazione degli acidi grassi si ha nella matrice in seguito all'attivazione e al trasporto degli acidi grassi nella matrice e produce anch'essa entrambi i donatori di elettroni. Il FADH_2 generato dall'ossidazione degli acidi grassi riduce il coenzima Q mediante la propria flavoproteina che trasporta elettroni [32]. Il NADH è trasportato nel complesso I da una subunità dello stesso complesso che interagisce con la via di ossidazione degli acidi grassi [33].

La catena di trasporto degli elettroni è costituita da quattro complessi enzimatici. Il NADH è ossidato dal complesso I, che riduce il carrier mobile, ossia il coenzima Q. Il complesso II ossida il FADH_2 , cedendo anch'esso gli elettroni al coenzima Q. Il complesso III ossida il coenzima Q ridotto e a sua volta riduce il citocromo c che, infine, dona gli elettroni alla citocromo ossidasi (complesso IV) per la riduzione di ossigeno ad acqua. Questi complessi sono organizzati in un più ampio "supercomplesso", formando un "respirasoma" o corpo respiratorio [34], in modo da ottimizzare il trasporto degli equivalenti ridotti. Contemporaneamente al trasporto di elettroni dal NADH e dal FADH_2 all'ossigeno, vi è un trasporto

attivo di ioni idrogeno dalla matrice allo spazio intermembrana come descritto dalla teoria chemiosmotica di Mitchell [35]. L'apparato di fosforilazione, anch'esso immerso nella membrana mitocondriale interna, utilizza questo gradiente protonico così formatosi per fosforilare ADP attraverso il complesso V. Questo complesso, sfruttando il gradiente elettrochimico che si forma nello spazio intermembrana, ricava l'energia per guidare il motore molecolare di cui è composto ottenendo così la produzione di ATP [36]. Il flusso attraverso la catena di trasporto degli elettroni e il consumo di ossigeno è dipendente dalla richiesta di energia anche attraverso questo processo. Infatti una diminuita disponibilità di ADP (ossia una bassa richiesta di energia) rallenta la velocità di fosforilazione (stato 4 della respirazione), portando ad un incremento del gradiente protonico ai lati della membrana interna e rallentando così la velocità di trasporto degli elettroni. Un aumento del contenuto di ADP (incrementato dall'idrolisi di ATP dovuto ad una maggiore richiesta di energia), fa aumentare la velocità di fosforilazione da parte del complesso V, attenuando il gradiente protonico e stimolando il trasporto di elettroni e il consumo di ossigeno (stato 3 della respirazione).

Il controllo della respirazione mitocondriale e della fosforilazione ossidativa è fondamentale per il mantenimento dell'omeostasi cellulare, per cui è esercitato a due livelli, attraverso la regolazione della velocità del consumo di ossigeno e della produzione di ATP e attraverso la regolazione dell'efficienza della fosforilazione ossidativa [37]. Il principale determinante dell'efficienza della

fosforilazione ossidativa è il grado di accoppiamento tra consumo di ossigeno e sintesi di ATP che è sempre minore di 1 e varia a seconda delle necessità metaboliche della cellula [38]. Tra i fattori che influenzano il grado di accoppiamento termodinamico, la permeabilità della membrana mitocondriale interna a ioni H^+ svolge un ruolo molto importante. E' noto, infatti, che la membrana mitocondriale interna mostra una conduttanza protonica basale il cui contributo alla velocità metabolica basale è pari circa al 20-25 % [39]. Inoltre, anche gli acidi grassi possono agire da disaccoppianti naturali della fosforilazione ossidativa, generando una conduttanza protonica che è funzione della quantità di acidi grassi liberi nella cellula [40;41;42].

4.2 Disaccoppiamento della fosforilazione ossidativa mitocondriale.

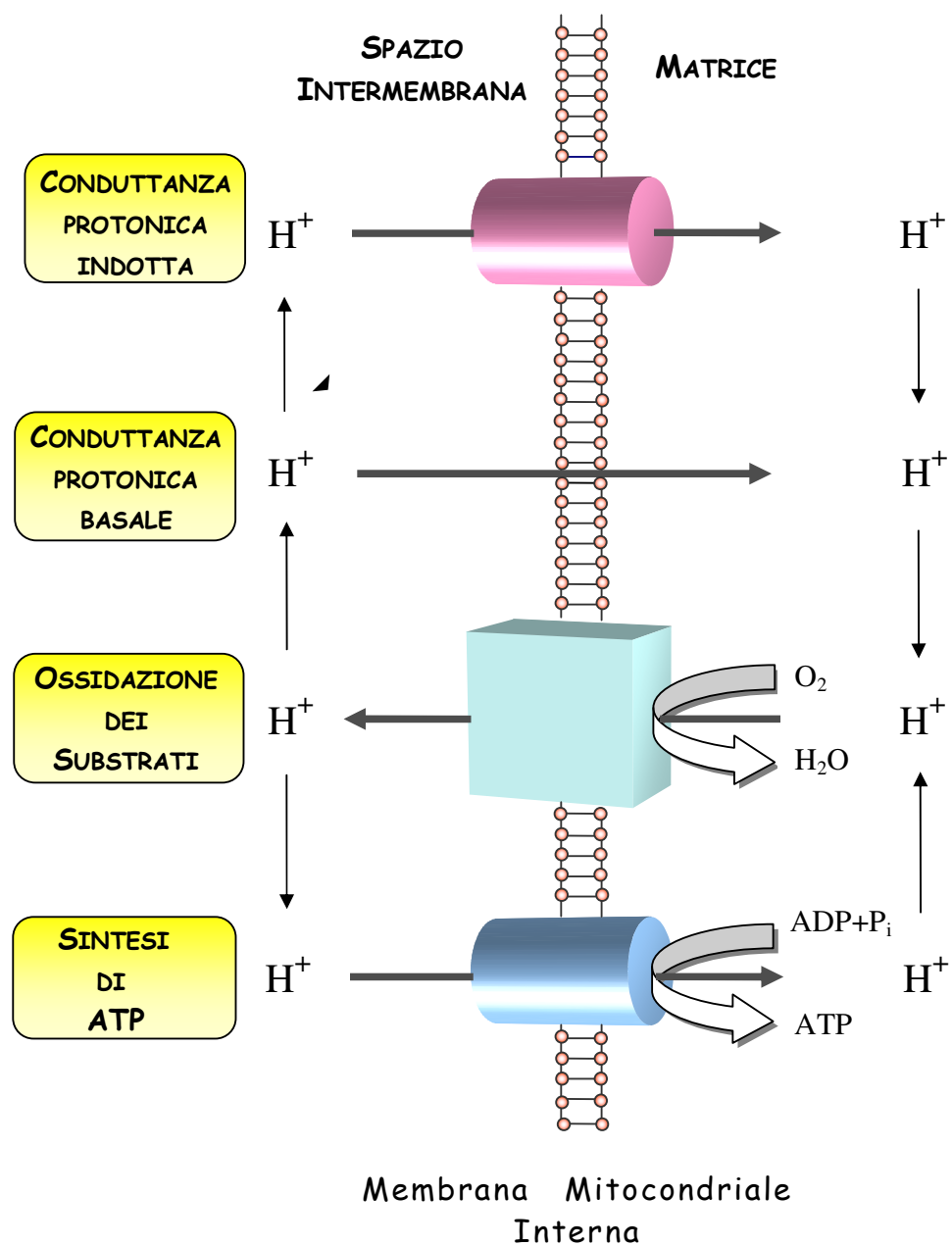
La sintesi di ATP e il trasporto degli elettroni lungo la catena respiratoria appaiono, dunque, due processi strettamente accoppiati. Tuttavia, l'accoppiamento tra l'ossidazione dei substrati e la sintesi dell'ATP non è pari al 100%. Infatti, una parte dell'energia è persa sotto forma di calore mediante delle reazioni che consentono di dissipare il gradiente protonico senza portare alla consueta sintesi di ATP. Si verifica, quindi, un vero e proprio disaccoppiamento della fosforilazione ossidativa (figura 4.1).

Ci sono due tipi di disaccoppiamento definiti: *disaccoppiamento basale* e *disaccoppiamento inducibile*.

Il disaccoppiamento basale non è finemente regolato ed è presente in tutti i mitocondri, mentre quello inducibile è catalizzato da proteine e si trova solo in alcuni tipi cellulari.

La fosforilazione ossidativa non solo è disaccoppiata in seguito all'azione di disaccoppianti naturali o artificiali, ma è anche influenzata dall'azione di particolari agenti definiti *inibitori*. Gli inibitori si differenziano dagli agenti *disaccoppianti* perché impediscono sia la stimolazione del consumo di ossigeno da parte dell'ADP, sia la fosforilazione di ADP ad ATP. Tuttavia, questi agenti non inibiscono direttamente nessun trasportatore di elettroni della catena respiratoria, ma impediscono invece al meccanismo che forma ATP di utilizzare l'intermedio ad alto livello energetico prodotto dal trasporto degli elettroni. Come conseguenza, il trasporto degli elettroni non può continuare; l'antibiotico oligomicina è il prototipo di questa classe.

FIGURA 4.1- Circuiti protonici chemiosmotici attraverso la membrana interna di mitocondri isolati



Conduttanza protonica basale

Il disaccoppiamento basale è dovuto ad una via di perdita protonica passiva, determinato dalle caratteristiche intrinseche della membrana mitocondriale interna, definito anche *conduttanza protonica basale* (CPB) [43].

La conduttanza protonica basale non è un artefatto dell'isolamento dei mitocondri poiché è stato dimostrato che essa è presente anche nei mitocondri di cellule ed organi intatti, come il fegato, i timociti, i linfociti, il muscolo scheletrico ed il cuore [44].

Il contributo della conduttanza protonica basale al consumo di ossigeno può essere molto elevato, con percentuali che oscillano dal 20% al 50% in tessuti quali il fegato ed il muscolo. In particolare, tale contributo è del 20% negli epatociti attivi e del 25% negli epatociti a riposo [44;45]. Nel muscolo di ratto le percentuali sono più elevate: il 35% nel muscolo in contrazione e il 50% nel muscolo a riposo. Nel cuore intatto è di circa il 12% [45]. E' stato calcolato, inoltre, che la conduttanza protonica basale utilizza il 20-25% dell'ossigeno totale, necessario per il mantenimento della velocità metabolica basale del ratto [44]. La conduttanza protonica basale mitocondriale è presente non solo negli animali omeotermi, ma anche negli eterotermi e nelle piante indicando che tale proprietà è conservata non solo nei differenti tessuti di uno stesso animale o pianta, ma anche tra specie differenti [46].

Conduttanza protonica indotta dagli acidi grassi

Tra i vari disaccoppianti naturali della fosforilazione ossidativa ritroviamo gli acidi grassi. Nelle cellule intatte e nei tessuti, essi rappresentano un eccellente substrato respiratorio poiché forniscono elettroni alla catena respiratoria. Questa funzione maschera il loro potenziale effetto disaccoppiante che diventa evidente solo in speciali condizioni fisiologiche (digiuno, diete ad alto contenuto di grassi, esercizio eccessivo) o patologiche (diabete), caratterizzate da un inusuale accumulo di acidi grassi [42].

Il coinvolgimento degli acidi grassi nell'indurre una variazione dell'accoppiamento della fosforilazione ossidativa mitocondriale è noto sin dall'inizio del 1950. Già allora, infatti, alcuni ricercatori avevano notato che tali effetti venivano attenuati dalla presenza di albumina di siero bovino (BSA), una molecola che mostra un'alta capacità di legame per gli acidi grassi [47;48]. Successivamente è stato dimostrato che gli acidi grassi non esterificati a lunga catena (NEFA) erano i reali agenti disaccoppianti "naturali", ed in particolare la loro potenzialità dipendeva dalla lunghezza della catena e dal loro grado di insaturazione [49;50].

La differenza fondamentale tra l'effetto disaccoppiante degli acidi grassi e quella dei classici disaccoppianti sintetici, come l'FCCP e il dinitrofenolo che agiscono da protonofori, è il piccolo effetto degli acidi grassi sul potenziale di membrana. Una possibile spiegazione per quest'ultimo effetto, come pure per la riduzione del pH mitocondriale, è stato suggerito da Wrigglesworth e collaboratori [51]. Questi

ricercatori evidenziarono che l'oleato può catalizzare il trasporto di K^+ e di H^+ attraverso il doppio strato lipidico mediante un meccanismo che prevede che l'acido grasso possa traslocare un protone all'interno della matrice mitocondriale, rispettivamente come acido associato (AH) o come coppia ionica ($A^- X^+$). La direzione del trasporto sarà determinata dalla polarità del gradiente cationico e la sua velocità dipenderà dalla natura dell'acido grasso e dal particolare catione della coppia ionica. La presenza di un potenziale di membrana accelererà la traslocazione della specie anionica. Secondo questo meccanismo, quindi, l'effetto disaccoppiante sarebbe la conseguenza di un afflusso di H^+ nella matrice mitocondriale con conseguente riduzione del potenziale di membrana; in questo modo una parte dell'energia derivata dall'incrementato flusso di elettroni attraverso la catena respiratoria, dovuto agli acidi grassi, sembra essere in parte dissipata con un meccanismo simile al disaccoppiamento.

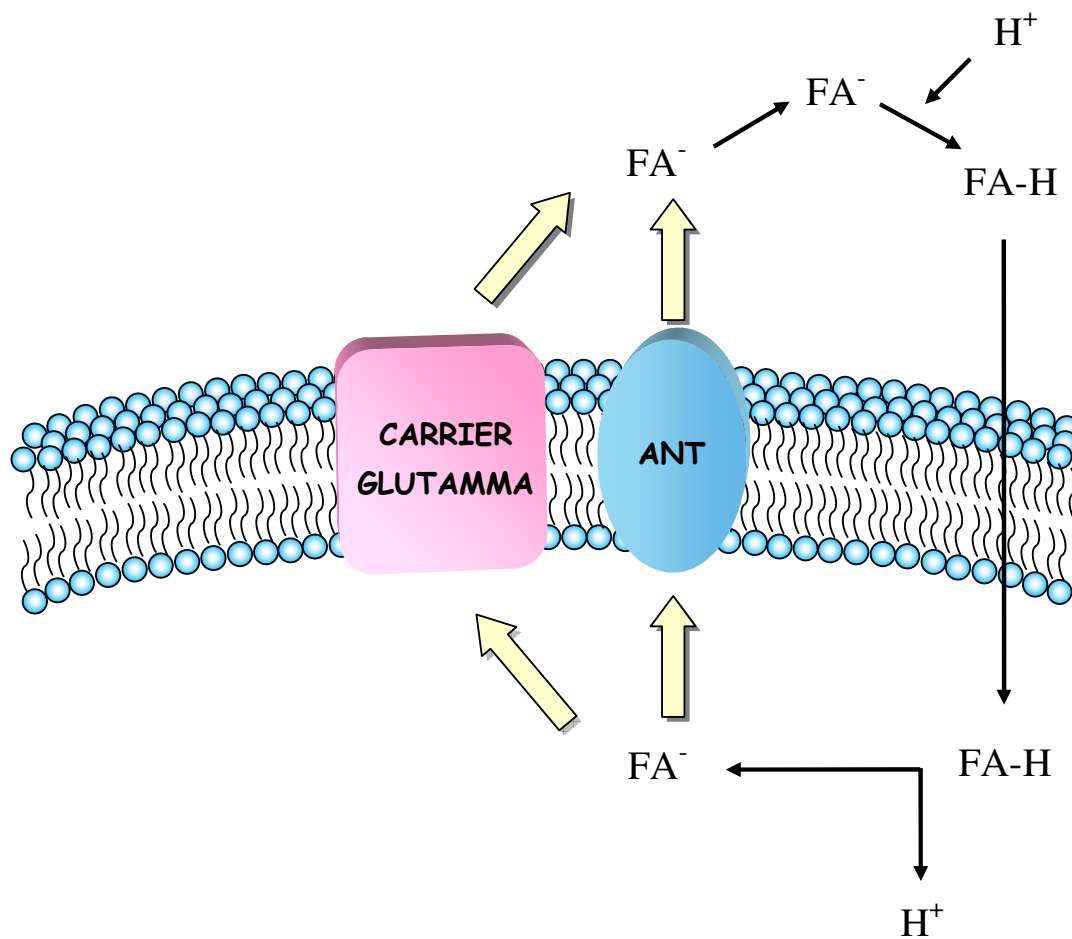
Studi successivi suggerirono che gli acidi grassi sono in grado di incrementare la conduttanza protonica nei mitocondri, interagendo con alcuni componenti della membrana mitocondriale interna. Il gruppo di Skulachev, infatti, osservò che l'ADP ed alcuni inibitori dell'adenina nucleotide traslocasi (ANT) erano in grado di abolire parte dell'effetto disaccoppiante del palmitato [52]. Tali evidenze portarono gli autori ad ipotizzare che l'ANT potesse essere coinvolta nel disaccoppiamento mediato dagli acidi grassi. In particolare Schönfeld, utilizzando uno specifico inibitore dell'attività del carrier ANT, quale la carbossiatrattiloside (CAT), evidenziò una correlazione tra il grado di attivazione del carrier stesso ed

il disaccoppiamento indotto dagli acidi grassi [53]. Tale correlazione è stata confermata paragonando la capacità degli acidi grassi di disaccoppiare i mitocondri che presentavano un differente contenuto di ANT, come quello misurato in animali in differenti stati tiroidei [54]. In particolare, in tale studio è stato evidenziato che il maggior contenuto del trasportatore ed una sua maggiore attività, osservati nei mitocondri isolati da ratti ipertiroidei, coincidono con una più alta stimolazione della respirazione, nello stato di riposo, da parte degli acidi grassi e con una più alta sensibilità alla CAT. D'altra parte, i mitocondri isolati da un mutante di lievito che risultava "mancante di ANT", risultarono essere insensibili al disaccoppiamento dovuto agli acidi grassi [55]. In genere gli inibitori dell'ANT, quali ad esempio la CAT, non aboliscono completamente l'effetto disaccoppiante degli acidi grassi a lunga catena, e ciò indica che il meccanismo che coinvolge l'ANT non è il solo responsabile della dissipazione del gradiente protonico elettrochimico mitocondriale. Infatti, inibitori e/o substrati di altri due trasportatori mitocondriali quali glutammato/aspartato e dicarbossilato sono in grado di inibire parte del disaccoppiamento indotto dagli acidi grassi [56].

Sulla base di tali risultati è stato proposto un nuovo modello che spieghi l'effetto disaccoppiante degli acidi grassi (*figura 4.2*). In tale modello è previsto che i carrier mitocondriali siano capaci di legare e trasportare gli acidi grassi carichi negativamente (FA^-) fuori dal mitocondrio. Sul lato citosolico gli acidi grassi subiscono una protonazione, a causa della differenza di pH, e penetrano nella matrice mitocondriale tramite un movimento flip-flop. Nella matrice

mitocondriale gli acidi grassi vengono nuovamente deprotonati, causando così il trasferimento netto di un protone dal citosol alla matrice mitocondriale.

FIGURA 4.2- Effetto disaccoppiante degli acidi grassi



4.3 Mitocondri e invecchiamento.

L'invecchiamento può danneggiare la fosforilazione ossidativa attraverso diversi meccanismi. La diminuzione dell'attività enzimatica di uno dei complessi della catena di trasporto degli elettroni può rallentare la velocità di fosforilazione ossidativa [31]. Comunque, la massima attività enzimatica espressa dai complessi della catena di trasporto degli elettroni sembra essere in eccesso rispetto alla fosforilazione, in modo tale che probabilmente è necessaria una diminuzione della sua attività del 30-50% per ottenere una reale diminuzione della velocità massima di fosforilazione [31]. Il sito principale di controllo della respirazione è localizzato a livello del I complesso della catena respiratoria e dell'adenina nucleotide traslocasi (ANT) e del complesso V nell'apparato di fosforilazione [57]. Alterazioni nella composizione fosfolipidica della membrana mitocondriale interna potrebbe danneggiare l'attività dei complessi della catena di trasporto degli elettroni [58]. L'invecchiamento può alterare anche il complesso V, riducendo la velocità o l'efficienza della fosforilazione [59]. L'uso di substrati e inibitori specifici di ciascun complesso come le misure di attività enzimatiche di specifici complessi della catena sono ormai utilizzati per localizzare sistematicamente i siti di danni indotti dall'età sul sistema di fosforilazione.

Quindi con l'invecchiamento diminuisce la velocità di fosforilazione ossidativa mitocondriale in molte specie, dal *C. Elegans* agli umani. In modelli animali utilizzati per studiare l'invecchiamento, l'ossidazione mitocondriale di specifici substrati è danneggiata in modo organo specifico. La stima della respirazione

mitocondriale complessiva, attraverso studi della velocità massima e dell'accoppiamento della fosforilazione ossidativa, evidenzia che i difetti correlati all'avanzare dell'età nel metabolismo ossidativo non sono evidenti dalle misure dell'attività enzimatica isolata dei singoli complessi della catena di trasporto degli elettroni. Le alterazioni correlate all'età del metabolismo ossidativo mitocondriale è associato con un incremento della capacità da parte dei mitocondri di produrre specie reattive dell'ossigeno. Quindi, le alterazioni della fosforilazione ossidativa indotte dall'età danneggiano il processo di produzione dell'energia e contemporaneamente incrementano la produzione di prodotti delle specie reattive dell'ossigeno tossiche per la cellula [31].

4.4 Popolazioni mitocondriali del muscolo scheletrico: mitocondri subsarcolemmatici ed intermiofibrillari.

Studi condotti sul muscolo cardiaco e scheletrico hanno dimostrato che in questi tessuti sono presenti due popolazioni mitocondriali, una localizzata direttamente sotto il sarcolemma (mitocondri subsarcolemmatici, SS) ed un'altra tra le miofibrille (mitocondri intermiofibrillari, IMF) [50].

È possibile isolare separatamente le due frazioni. Per esempio, i mitocondri SS sono stati isolati dal cuore con processore tissutale Polytron, mentre i mitocondri IMF sono stati ottenuti con una digestione con nagarse del restante tessuto [51]. Questi risultati sono stati convalidati da osservazioni al microscopio elettronico che mostravano, in seguito al trattamento col Polytron, una rottura del

sarcolemma con liberazione dei sottostanti mitocondri, ma con ritenzione dei mitocondri intatti tra le miofibrille. La microscopia elettronica dei mitocondri isolati ha mostrato che entrambi i tipi di mitocondri mantengono la loro integrità strutturale durante la procedura di isolamento [51]. L'isolamento delle due popolazioni di mitocondri ha permesso una loro analisi separata. Tale studio ha dimostrato che queste popolazioni di mitocondri non solo presentano una localizzazione diversa nella cellula, ma anche differenze biochimiche e funzionali. Infatti, i risultati hanno indicato una maggiore attività della membrana mitocondriale interna e degli enzimi della matrice negli IMF rispetto agli SS. Le attività specifiche della succinico deidrogenasi e della citrato sintasi sono più alte nei mitocondri IMF rispetto a quelli SS, mentre quelle della carnitin-palmitoiltransferasi e dell' α -glicerolo fosfato deidrogenasi sono approssimativamente le stesse in entrambe le popolazioni [51].

La capacità ossidativa dei mitocondri IMF è più alta di quella dei mitocondri SS con tutti i substrati utilizzati sperimentalmente [51].

Studi sulle caratteristiche biochimiche dei mitocondri IMF e SS isolati dal muscolo scheletrico sono potenzialmente molto importanti ai fini della comprensione dei ruoli che queste due frazioni mitocondriali occupano all'interno della cellula. Il muscolo scheletrico rappresenta un buon modello per la sua capacità di alterare il suo contenuto in mitocondri in risposta all'attività contrattile. Alterazioni della richiesta energetica, come ad esempio quelle imposte dall'attività contrattile, giocano un ruolo importante nel determinare la

distribuzione cellulare e il contenuto in mitocondri. Numerosi esperimenti indicano che l'aumento o la diminuzione dell'attività muscolare portano a differenti adattamenti dei mitocondri SS e IMF [52]. Ulteriori lavori hanno dimostrato che in alcuni stati fisiologici e patologici, una delle due popolazioni di mitocondri muscolari può aumentare di numero [53;60]. Questo fenomeno suggerisce la presenza di un meccanismo compensatorio dei livelli degli organelli in risposta a specifiche stimolazioni della cellula [51].

In conclusione le specifiche differenze biochimiche tra mitocondri IMF e mitocondri SS del muscolo scheletrico sembrano coincidere con differenze nella capacità respiratoria, misurata utilizzando inibitori sito-specifici della catena di trasporto degli elettroni. Le differenze biochimiche possono essere in parte attribuite a un differente andamento della sintesi proteica mitocondriale. Occorrono ulteriori studi per identificare le specifiche proteine coinvolte, così come per mettere in relazione tali differenze con i possibili ruoli funzionali che queste due frazioni mitocondriali potrebbero giocare nel metabolismo energetico della cellula [52].

SCOPO DELLA TESI

È noto che durante l'accrescimento il fabbisogno energetico corporeo dei mammiferi muta in seguito alle diverse necessità fisiologiche connesse con le singole fasi dell'accrescimento.

Il modello ratto si presta bene per lo studio dei meccanismi che sono alla base dell'obesità spontanea che si sviluppa con l'età, in quanto sia gli uomini che i roditori tendono a guadagnare peso con l'invecchiamento a causa dell'aumento della massa adiposa corporea. Sebbene sia ormai noto che l'invecchiamento è caratterizzato da fenomeni degenerativi a livello corporeo ed è associato spesso ad obesità spontanea che potrebbe essere collegata a leptino-resistenza e insulino-resistenza, poco si conosce su quale è l'età in cui si iniziano a manifestare i primi segni collegati a questi fenomeni tipici dell'invecchiamento.

Per cui nella prima fase del mio lavoro di ricerca, avendo a disposizione ratti alimentati con una dieta standard di laboratorio, ho ritenuto interessante condurre uno studio per valutare le variazioni della composizione corporea in ratti di diversa età, al fine di valutare a quale età inizia a manifestarsi la tendenza ad accumulare massa grassa. Infatti conoscere la fase della vita in cui si inizia ad innescare la tendenza all'obesità in un modello animale, può essere utile per studiare i meccanismi fisiologici che portano all'obesità ed alle patologie ad esse associate in età avanzata. A tal fine, ho analizzato le eventuali alterazioni nella composizione corporea di ratti di diverse età, scegliendo le fasi di sviluppo che

precedono o preparano la fase d'invecchiamento vera e propria, in particolare nei miei esperimenti ho utilizzato ratti di 25, 40, 60, 90, 120, 150 e 180 giorni.

Una svolta importante nella ricerca dei meccanismi coinvolti nella regolazione del bilancio energetico e nella fisiopatologia dell'obesità nei mammiferi si è avuta con la scoperta della leptina circa 10 anni fa. Le ricerche condotte hanno messo in evidenza che la leptina è prodotta e secreta dal tessuto adiposo in maniera proporzionale alla quantità di grasso corporeo e agisce a livello cerebrale per ridurre l'assunzione di cibo, aumentando la spesa energetica e promuovendo la perdita di peso [20]. Quindi la leptina svolge un ruolo importante nella regolazione del peso corporeo ed in particolare dei depositi di grasso corporeo sia nell'uomo che nei modelli animali.

Di conseguenza, al fine di acquisire ulteriori conoscenze sul meccanismo con cui si sviluppa la tendenza ad accumulare grasso con l'avanzare dell'età nel ratto, in questa tesi ho anche valutato la relazione esistente tra adiposità corporea e livelli di leptina in ratti in fase di accrescimento, cioè dallo svezzamento al raggiungimento dell'età adulta, quando la tendenza a sviluppare l'obesità inizia a manifestarsi.

Infatti, lo studio accurato della correlazione tra la leptina e la massa adiposa corporea con l'avanzare dell'età può aiutare a comprendere il ruolo della leptina in vari stadi fisiologici e patofisiologici, e la sua eventuale azione terapeutica nell'obesità. Poiché la produzione di leptina è dovuta al tessuto adiposo, ho correlato questi due fattori per analizzare la relazione esistente tra lipidi corporei

e secrezione di leptina. Inoltre poiché la leptina induce una diminuzione dell'introito calorico e un aumento della spesa energetica, ho correlato i livelli di leptina con l' energia metabolizzabile per poter vedere quale influenza l'ormone abbia su questa variabile con l' avanzare dell' età.

Alla luce dei dati analizzati su ratti in differenti stadi di sviluppo, ho focalizzato la mia attenzione solo su due delle fasi di crescita analizzate nello studio della composizione corporea e dei livelli serici di metaboliti coinvolti nella regolazione del metabolismo energetico, ossia la fase adulta comparata con la fase postpuberale. Ho scelto la fase adulta perchè ho riscontrato che a 180 giorni è già manifesta la tendenza all'obesità e la leptino-resistenza.

Poiché l'invecchiamento è associato spesso all'insorgenza di insulino-resistenza a livello corporeo, ho innanzitutto analizzato la concentrazione ematica di glucosio e insulina nei ratti in fase postpuberale e adulta.

Allo scopo di ottenere ulteriori informazioni riguardo al complesso processo fisiologico che è alla base dell'invecchiamento e tenendo presente che i mitocondri sono coinvolti nel processo di invecchiamento [31], ho anche determinato la capacità respiratoria e l'efficienza energetica, parametri indicanti la funzionalità mitocondriale, in due tessuti che maggiormente contribuiscono al metabolismo corporeo, ossia il tessuto epatico e quello muscolare scheletrico. Infatti il fegato, pur costituendo solo il 4% del peso corporeo totale dell'organismo, contribuisce per più del 20% al metabolismo basale corporeo,

mentre il muscolo, che costituisce il 30% della massa corporea dell'organismo, contribuisce al 40% del metabolismo generale corporeo.

Per quanto concerne il muscolo scheletrico, le analisi sono state effettuate tenendo presente che le cellule di muscolo scheletrico sono caratterizzate dalla presenza di due distinte popolazioni mitocondriali [Krieger 61;62], una localizzata direttamente sotto il sarcolemma, mitocondri subsarcolemmatici (SS) ed un'altra tra le miofibrille, mitocondri intermiofibrillari (IMF) [63]. Studi condotti sul muscolo scheletrico hanno dimostrato che queste due popolazioni di mitocondri, non solo presentano una localizzazione diversa nella cellula, ma differiscono anche biochimicamente [63]. Le differenze tra i mitocondri IMF e SS hanno suggerito che queste due popolazioni giocano un differente ruolo metabolico nell'economia della cellula. Altri lavori hanno dimostrato che in alcuni stati fisiologici e patologici, una delle due popolazioni di mitocondri muscolari può aumentare di numero [63;64]. Questo fenomeno suggerisce la presenza di un meccanismo compensatorio dei livelli degli organelli in risposta a specifiche stimolazioni della cellula.

Sulla base di queste osservazioni ho ritenuto interessante misurare l'attività respiratoria su entrambe le subpopolazioni mitocondriali del muscolo scheletrico oltre che sui mitocondri isolati dal fegato.

Il controllo della respirazione mitocondriale e della fosforilazione ossidativa è fondamentale per il mantenimento dell'omeostasi cellulare. Questo controllo è esercitato a due livelli: regolazione dell'attività di consumo d'ossigeno e

produzione d'ATP e regolazione dell'efficienza della fosforilazione ossidativa [37].

Il maggiore determinante dell'efficienza della fosforilazione ossidativa è rappresentato dal grado d'accoppiamento fra consumo d'ossigeno e sintesi di ATP. Fra i fattori che influenzano l'efficienza mitocondriale un ruolo molto importante è svolto dalla permeabilità della membrana mitocondriale interna agli ioni H^+ . La membrana mitocondriale interna, infatti, presenta una conduttanza protonica basale identificabile sia a livello dei mitocondri isolati sia nelle cellule intatte [39], il cui contributo all'attività metabolica basale nei ratti è intorno al 20-25% [45].

Quindi alla luce dei risultati ottenuti riguardo alla variazione della composizione corporea e alle alterazioni ormonali riscontrate in età adulta, ho ritenuto interessante analizzare le capacità respiratorie e le due componenti dell'efficienza mitocondriale cioè la conduttanza protonica basale ed indotta dagli acidi grassi nei mitocondri di muscolo scheletrico e di fegato isolati da ratti in età postpuberale (60 giorni) e da ratti adulti (180 giorni).

Ho ritenuto infatti determinante studiare la funzionalità mitocondriale con l'avanzare dell'età, considerando questo studio importante per seguire lo sviluppo dei processi fisiologici associati all'età, permettendo così di individuare le fasi della vita in cui eventuali danni, che si concludono nell'età avanzata, iniziano a manifestarsi.

PARTE SPERIMENTALE

Disegno sperimentale

Negli esperimenti condotti in questa tesi ho utilizzato ratti maschi del ceppo Wistar appena svezzati (Charles River, Calco, Como, Italia) che sono stati stabulati singolarmente ad una temperatura di $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$ e sono stati sottoposti ad un ciclo circadiano artificiale luce-buio (12 ore di luce/ 12 ore di buio). Ad ogni ratto è stato consentito libero accesso a cibo e acqua.

In un primo disegno sperimentale, i ratti sono stati suddivisi in sette gruppi, ciascuno composto da otto ratti aventi approssimativamente lo stesso peso corporeo medio. Un primo gruppo è stato sacrificato a 25 giorni di età, gli altri sei gruppi sono stati sacrificati a 40, 60, 90, 120, 150 e 180 giorni per ottenere i dati relativi alla composizione corporea e alle concentrazioni sieriche di alcuni metabolici e ormoni.

Nel secondo disegno sperimentale, per dosare insulina e glucosio e effettuare le misure dell'energetica mitocondriale, sono stati utilizzati solo ratti di 60 e 180 giorni di età, da cui ho prelevato velocemente, al momento del sacrificio, il fegato o i muscoli degli arti inferiori (quadricepiti, gastrocnemio, tibiale anteriore e soleo) da cui ho isolato i mitocondri.

Determinazione del contenuto energetico e della composizione corporea

Dopo il sacrificio, le carcasse sono state pesate, autoclavate per 90 minuti, quindi sminuzzate ed infine omogeneizzate con un volume di acqua uguale al peso della

carcassa in un omogenizzatore Politron. Aliquote dell'omogenato sono state poi utilizzate per misurare il contenuto energetico corporeo dell'animale e per analizzare il contenuto dei lipidi, delle proteine e di acqua della carcassa.

Misura del contenuto energetico della carcassa

Campioni dell'omogenato essiccato sono stati ridotti in polvere ed utilizzati per fare delle pasticche di circa 200 mg. Tali pasticche sono servite per misurare il contenuto energetico della carcassa con una bomba calorimetrica (calorimetro adiabatico Parr della Parr Instruments Co., Moline, USA) calibrata con uno standard di acido benzoico essiccato. La bomba calorimetrica è un apparecchio usato per determinare il calore di combustione di sostanze solide o liquide. Consiste di un recipiente cilindrico in acciaio inossidabile (le cui pareti sono robuste ed inattaccabili chimicamente dalle sostanze che in esso bruciano), chiuso da un coperchio a vite, a cui è fissata una asticciola metallica con un uncino di platino che regge una capsula di platino in cui si introduce una quantità nota del campione da esaminare allo stato secco. Al coperchio della bomba sono anche fissati due uncini metallici a cui viene collegato un filo di nichel che viene messo in contatto con la sostanza contenuta nella capsula. Una volta chiusa la bomba, vi si comprime all'interno ossigeno a circa 25 atmosfere (sotto pressione) attraverso un rubinetto apposito e si immerge il tutto in un calorimetro ad acqua costituito da un vaso di Dewar. La combustione della sostanza in esame si provoca mediante una corrente elettrica che si fa passare attraverso due elettrodi connessi al

coperchio della bomba, e da qui attraverso gli uncini metallici fino ad arroventare il filo che è a contatto con il campione della sostanza nella capsula di platino.

In tale apparecchiatura, il calore fornito dall'ossidazione dei substrati fa innalzare la temperatura di un volume noto di acqua che circonda la bomba calorimetrica, e attraverso il valore (in °C) dell'innalzamento termico, il valore del calore specifico dell'acqua e la quantità precisa della sostanza sottoposta all'ossidazione, si risale alle chilocalorie prodotte per grammo di sostanza contenuta nella capsula.

Il valore del contenuto energetico della carcassa essiccata così ottenuto viene poi corretto per il contenuto di acqua della carcassa, per ottenere il valore effettivo per grammo di carcassa.

Misura del contenuto lipidico della carcassa

Il contenuto lipidico si determina gravimetricamente, in accordo con il metodo di Folch [65]. Nel primo passaggio della procedura si estraggono i lipidi dall'omogenato del tessuto, con una miscela di cloroformio-metanolo (2:1) diluendo 20 volte e filtrando poi l'omogenato così ottenuto. Nel passaggio successivo, al filtrato contenente le sostanze lipidiche e non lipidiche del tessuto, si aggiungono 0,2 volumi di una soluzione 0,29% di NaCl. Dopo centrifugazione a 2400 rpm per 20 minuti a 21°C si ottengono due fasi: una superiore acquosa ed una inferiore che costituisce l'estratto lipidico puro totale. La fase superiore viene, quindi, aspirata e l'interfaccia viene lavata con una miscela cloroformio-

metanolo-NaCl 0,58% (in rapporto 3:48:47). La procedura di lavaggio serve ad eliminare tutti i contaminanti non lipidici dall'estratto. La fase lipidica così ottenuta viene versata in appositi recipienti di vetro, dai quali il solvente viene fatto evaporare mediante l'ausilio di un evaporatore rotante (Heidolph, Germania). Il contenuto lipidico della carcassa, espresso in grammi, si ottiene sottraendo il peso del recipiente vuoto dal peso complessivo del recipiente contenente i lipidi.

Il contenuto energetico della carcassa sotto forma di lipidi (espresso in KJ) è stato calcolato dal contenuto lipidico utilizzando il coefficiente 39,2 KJ/g.

Misura del contenuto proteico e di acqua della carcassa

Il contenuto proteico della carcassa si determina sottraendo al contenuto energetico totale della carcassa il contenuto energetico dovuto ai lipidi; il valore ottenuto viene diviso per una costante indicante il contenuto energetico per grammo di proteina (23,5 KJ/g).

Per la misura del contenuto di acqua, dopo aver distribuito delle aliquote di omogenato in apposite vaschette ed averle pesate, queste sono state poste in stufe a secco e lasciate essiccare per 48 ore a 60°C. Per differenza tra il peso delle vaschette contenenti l'omogenato prima e dopo l'essiccazione, si determina il contenuto di acqua della carcassa.

Misura dell'energia metabolizzabile assunta

L'assunzione di cibo è stata controllata ogni giorno per poter calcolare l'introito energetico lordo.

Le feci ed il cibo perso nella gabbia sono stati recuperati ogni giorno, sono stati essiccati in stufa ed, una volta ridotti in polvere, sono stati trasformati in pasticche di 200 mg di peso per poterne determinare il contenuto energetico tramite il calorimetro adiabatico di Parr. Allo stesso modo è stato determinato il contenuto energetico lordo della dieta standard con cui sono stati nutriti gli animali.

La quantità di energia digeribile (DE) assunta è stata calcolata sottraendo l'energia contenuta nelle feci e nel cibo recuperato dall'introito energetico lordo che è stato misurato dal consumo quotidiano di cibo. L'energia metabolizzabile (ME) viene espressa come energia digeribile x 0,96 (fattore di correzione per l'energia persa con le urine) [66].

Preparazione del siero

I campioni di sangue che sono stati prelevati durante il sacrificio dalla vena cava inferiore dei ratti, sono stati successivamente posti in apposite provette e centrifugati alla velocità di 5000 rpm per 10 minuti, alla temperatura di 20°C. Applicando questa procedura è stato possibile separare il siero, rappresentato dal surnatante, dalla parte corpuscolata del sangue, cioè il pellet. I campioni di siero sono stati conservati ad una temperatura di -20°C fino al momento in cui sono stati utilizzati per la determinazione delle misure di interesse.

Dosaggio della leptina, degli acidi grassi, dell'ormone T₃, dell'insulina e del glucosio

Per dosare la leptina nei campioni plasmatici isolati è stato utilizzato un kit per il dosaggio immunoenzimatico a sandwich.

I livelli serici di acidi grassi non esterificati (NEFA) sono stati misurati con un metodo enzimatico colorimetrico usando un kit commerciale (Boehringer Mannheim Italia).

I livelli serici di T₃ sono stati determinati mediante un saggio radioimmunologico in fase solida, realizzato grazie alla disponibilità di un kit commerciale (COAT A COUNT, Diagnostic Products Corporation, USA).

L'insulina è stata dosata utilizzando il dosaggio immunoenzimatico Elisa a sandwich (metodo del doppio anticorpo) in un unico step. In particolare è stato utilizzato il kit commerciale Active insuline Elisa (Diagnostic system laboratories, Texas).

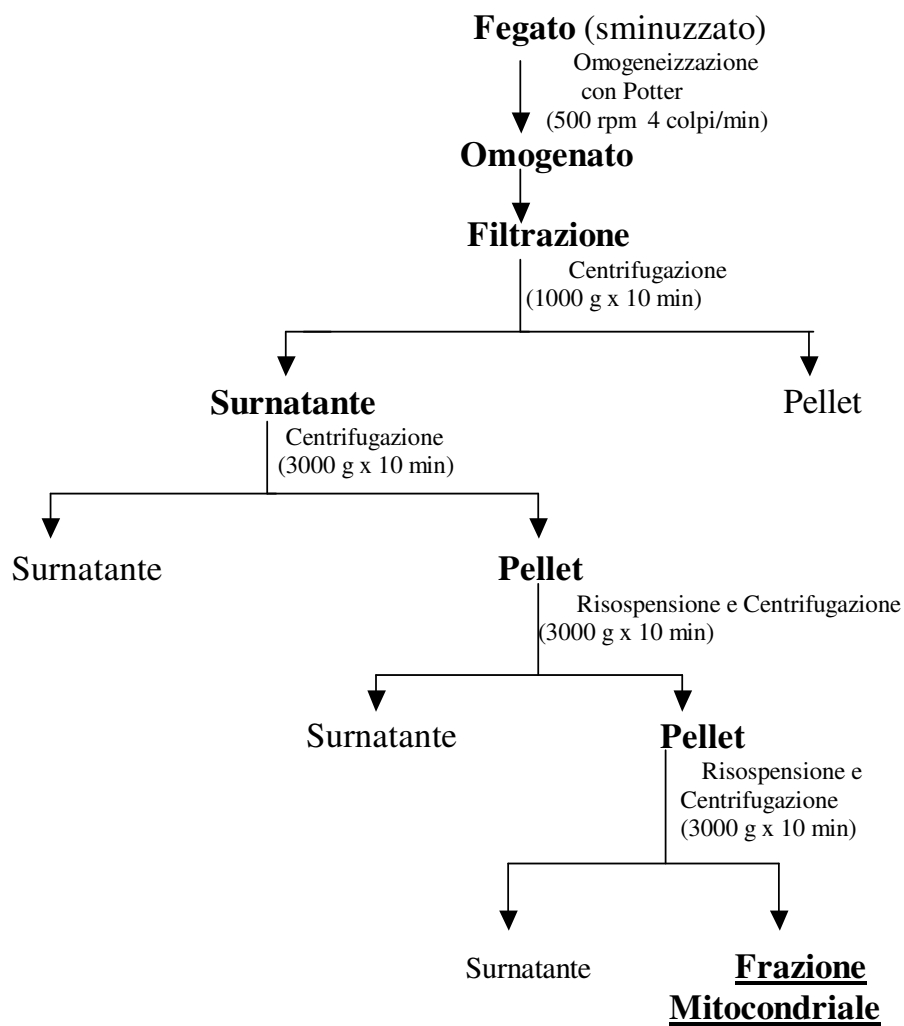
Il dosaggio del glucosio è stato effettuato utilizzando un KIT colorimetrico.

Preparazione dei mitocondri di fegato

Subito dopo il sacrificio è stato prelevato il fegato, è stato finemente sminuzzato ed omogeneizzato in una soluzione contenente mannitolo 220 mM, saccarosio 70 mM, Hepes 20 mM, EDTA 2 mM e 0.1% (peso/volume) di albumina di siero bovino libera da acidi grassi, a pH 7.4, (diluizione 1:10) in un omogeneizzatore Potter Elvehjem settato a 500 rpm (4 colpi/min). L'omogenato è stato poi filtrato

attraverso delle garze sterili e privato di cellule intatte e nuclei attraverso una centrifugazione a 1000 g per 10 minuti; i surnatanti ottenuti sono stati di nuovo centrifugati a 3000 g per 10 minuti. Il pellet mitocondriale così ottenuto è stato lavato due volte ed infine risospeso in un tampone contenente LiCl 80 mM, HEPES 50 mM, Tris P 5 mM, EGTA 1 mM, 0.1% (peso/volume) di albumina di siero bovino libera da acidi grassi a pH 7.0 (figura 3.1). Caratterizzazioni microscopiche ed enzimatiche hanno mostrato che la nostra procedura di isolamento (centrifugazione a 3000 g per 10 minuti) fornisce una frazione cellulare che è costituita essenzialmente da mitocondri.

FIGURA 3.1- Metodica di isolamento dei mitocondri di fegato



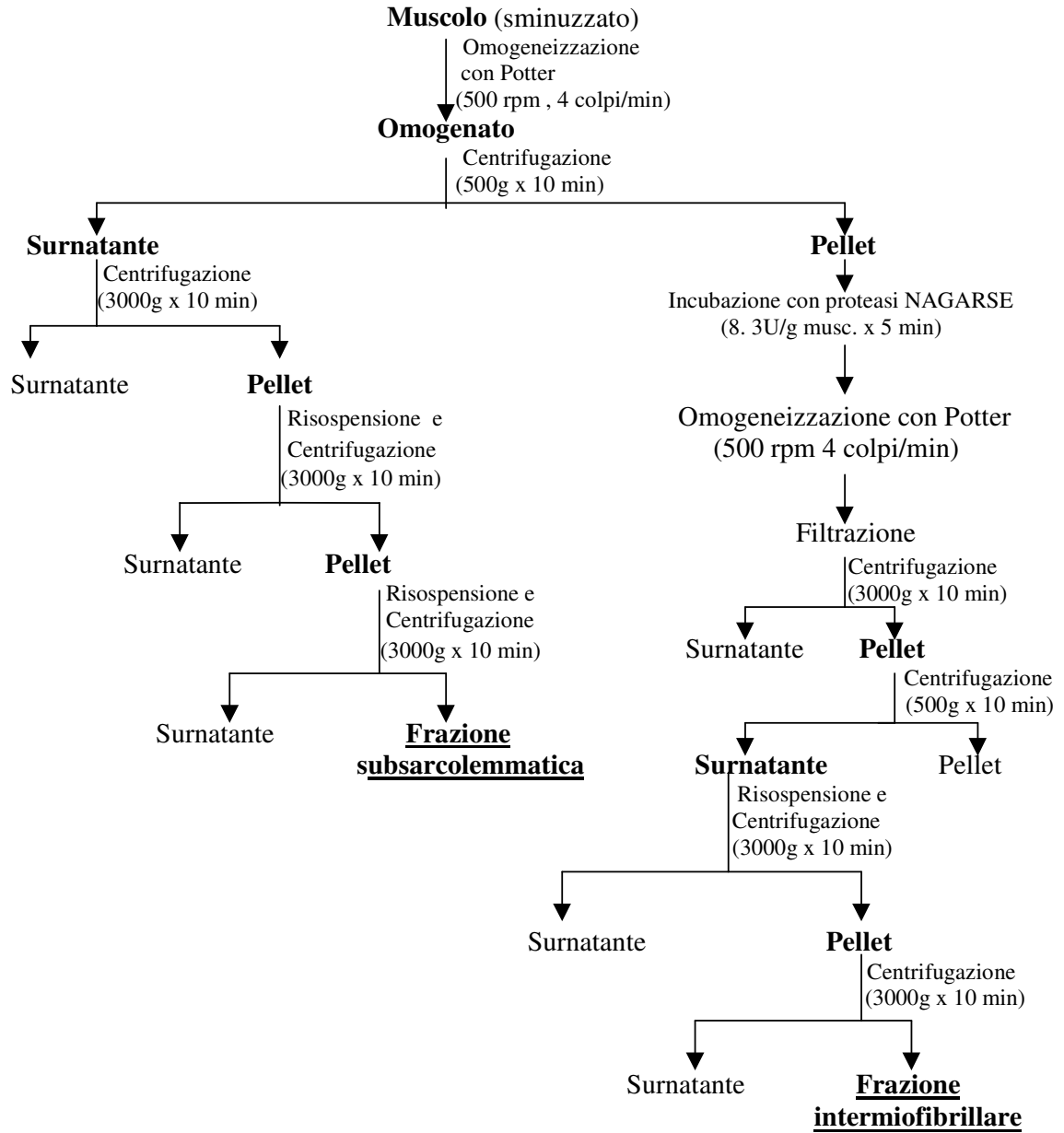
Preparazione dei mitocondri subsarcolemmatici e intermiofibrillari del muscolo scheletrico.

Il muscolo prelevato è stato pesato, dopo aver eliminato l'eccesso di grasso e connettivo e sminuzzato in una soluzione contenente KCl 100 mM, Tris 50 mM, MgCl₂ 5 mM, EDTA 1 mM, EGTA 5 mM, albumina di siero bovino libera da acidi grassi (BSA) allo 0.1% (p/v), pH 7.5. I frammenti tissutali così ottenuti sono stati omogenizzati con la stessa soluzione (1:8 p/v) in un omogenizzatore Potter Elvehjem (Heidolph, Kelheim, Germania) regolato a 500 rpm (4 colpi per un minuto). L'omogenato così ottenuto è stato sottoposto a centrifugazione a 500 g per 10 minuti a 4° C: i mitocondri intermiofibrillari insieme alle componenti più pesanti della cellula (nuclei, frammenti di membrana e cellule rimaste intatte) precipitano, mentre nel surnatante rimangono sospesi i mitocondri subsarcolemmatici. E', dunque, a questo punto che le preparazioni si separano:

- per i mitocondri subsarcolemmatici, dalla centrifugazione a 3000 g per 10 minuti a 4° C del surnatante si ottiene un pellet, che poi viene sottoposto ad un lavaggio per due volte ed infine risospeso in un mezzo contenente saccarosio 250 mM, Tris 50 mM, BSA 0.1%, e pH 7.5.
- per i mitocondri intermiofibrillari, il pellet derivato dalla prima centrifugazione viene trattato con proteasi nagarse (circa 9 U/g di tessuto) per 5 minuti, la sospensione viene poi omogenizzata, filtrata attraverso una garza sterile e centrifugata a 3000 g per 10 minuti. Il pellet viene

risospeso e centrifugato a 500 g per 10 minuti a 4°C, e il surnatante risultante viene ricentrifugato a 3000g per 10 minuti. Il pellet ottenuto viene lavato una sola volta e risospeso in un mezzo contenente saccarosio 250 mM, Tris 50 mM, BSA 0.1%, pH 7.5.

FIGURA 3.2- Metodica di isolamento dei mitocondri intermiofibrillari (IMF) e subsarcolemmatici (SS) del muscolo scheletrico



Dosaggio proteico

Il contenuto proteico della frazione mitocondriale è stato determinato con il metodo di Hartree (Lowry modificato) [67], usando l'albumina di siero bovino come proteina standard. Questo metodo combina la reazione del biureto con la reazione di Folin-Ciocalteu. Il colore che si sviluppa, proviene dalla riduzione degli acidi fosfotungstico e fosfomolibdico a blu di tungsteno e di molibdeno, operata dal complesso Cu-proteina e dal triptofano e dalla tiroxina delle proteine in ambiente alcalino. La modifica rispetto al metodo di Lowry consiste in un aumento della concentrazione di tartrato sodico-potassico e nella utilizzazione di temperature più elevate; ciò consente di ottenere una curva di taratura lineare per un più ampio intervallo di valori delle concentrazioni.

Misura dell'attività respiratoria nei mitocondri isolati

Il consumo d'ossigeno è stato misurato nei mitocondri sia del fegato che del muscolo polarograficamente con un elettrodo di Clark (Yellow Springs Instruments, Yellow Springs, Oh, USA). Tale elettrodo è costituito da un catodo di platino e da un anodo d'argento entrambi immersi in una soluzione di KCl e separati dalla soluzione in esame tramite una membrana. L'ossigeno diffonde attraverso la membrana dalla soluzione presente nella camera di misura al compartimento dell'elettrodo. Così, l'ossigeno al catodo si riduce e origina una corrente proporzionale all'attività dell'ossigeno presente in soluzione, nel momento in cui è applicato agli elettrodi un voltaggio di 0.5 – 0.8 Volts.

All'anodo, infatti, sono prodotti quattro elettroni a loro volta utilizzati per ridurre una molecola d'ossigeno al catodo. La tensione d'ossigeno al catodo quindi, tende ad azzerarsi promuovendo la diffusione dell'ossigeno verso il catodo. L'elettrodo di Clark perciò consente di misurare i rapidi cambiamenti, che si riscontrano nell'utilizzazione dell'ossigeno da parte dei sistemi cellulari e subcellulari.

Le misure sono state realizzate in camere termostate ad una temperatura di 30°C utilizzando per il fegato un mezzo di incubazione contenente KCl 80 mM, Hepes 50 mM, EGTA 1 mM, K₂HPO₄ 5 mM, PH 7.0, 0.1% (p/v) di BSA e per il muscolo un mezzo d'incubazione contenente KCl 30 mM, MgCl₂ 6 mM, saccarosio 75 mM, EDTA 1 mM, KH₂PO₄ 20 mM, pH 7.0, 0.1 % (p/v) di BSA libera da acidi grassi.

Le concentrazioni dei substrati usati sono state:

- Succinato 10 mM + Rotenone 3.75 µM
- Glutammato 10 mM + Malato 2.5 mM
- PalmitoilCoA 40µM + Carnitina 2 mM + Malato 2.5 mM

Le misure sono state fatte in assenza (Stato 4) o in presenza (Stato 3) di 0.6 mM d'ADP. In tal modo è stato possibile misurare l'RCR e pertanto verificare l'integrità dei mitocondri isolati. L'aggiunta d'oligomicina (4µg/ml) non ha avuto alcun effetto sullo Stato 4.

Misura del potenziale di membrana sui mitocondri isolati

Il potenziale di membrana mitocondriale è stato misurato utilizzando la lettura spettrofotometrica, ottenuta mediante uno spettrofotometro (JASCO) a doppia lunghezza d'onda, della safranina, un colorante che in virtù della sua carica elettrica si lega alla membrana mitocondriale in maniera proporzionale al potenziale [68]. Lo spettrofotometro adoperato è programmato in modo tale che la lunghezza d'onda di riferimento (533 nm) coincida con il punto isosbestico della safranina, quel punto, cioè, dello spettro di assorbimento in cui la molecola di colorante mostra la stessa assorbanza sia nello stato legato che in quello non legato alla membrana mitocondriale. La lunghezza d'onda di lettura è invece 511 nm. Per risalire al potenziale di membrana dai valori dell'assorbanza si effettuano misure dell'assorbanza della safranina in presenza di valinomicina 3 μM , un trasportatore specifico del potassio, e di quantità crescenti di KCl necessarie ad alterare la concentrazione esterna di potassio nel range 0.1 - 20 mM. A questo punto si costruisce una retta di taratura che mette in relazione le variazioni di assorbanza al logaritmo della concentrazione di potassio esterna, e che, quindi, consente di risalire alla concentrazione extra ed intramitocondriale di tale ione. Per estrapolazione da tale retta, infatti, si ricava la concentrazione interna di potassio, considerando che quando la variazione di assorbanza della safranina è nulla, anche il potenziale di membrana è pari a zero e quindi, in base all'equazione di Nernst, le concentrazioni di potassio esterna ed interna si equivalgono [68]. Ottenute le concentrazioni di potassio

esterna ed interna alla membrana mitocondriale, mediante l'equazione di Nernst ($\Delta\Psi = 61 \text{ mV} \times \log ([K^+]_{\text{in}} / [K^+]_{\text{out}})$) si può calcolare il potenziale di membrana dei mitocondri e realizzare un grafico per mettere in relazione i valori di potenziale di membrana con l'assorbanza della safranina. Per interpolazione da tale curva si potranno ottenere i valori del potenziale di membrana mitocondriale nelle varie condizioni sperimentali utilizzate.

Misura della conduttanza protonica basale

L'applicazione del metodo di Brand [43] ha consentito la valutazione della conduttanza protonica basale dei mitocondri isolati: tale metodica consiste in una titolazione della respirazione con il succinato a partire dallo Stato 4, in presenza di oligomicina, con quantità crescenti di malonato, un inibitore competitivo del secondo complesso della catena respiratoria, la succinico deidrogenasi, e permette di determinare le variazioni del potenziale di membrana associate alle variazioni del consumo di ossigeno ottenute in queste condizioni. Per poter determinare sperimentalmente la conduttanza protonica basale si adopera l'oligomicina, un antibiotico capace di abolire il flusso di protoni attraverso l'ATP sintetasi, prevenendo il passaggio dei protoni attraverso la subunità F_o . In questo modo si fa sì che il flusso protonico valutato dipenda solo dalla conduttanza protonica basale.

Per una determinazione accurata della conduttanza protonica basale, può essere valutata la risposta cinetica del potenziale di membrana mitocondriale a variazioni del consumo di ossigeno ottenute diminuendo progressivamente le reazioni di ossidazione del succinato del mitocondrio nello Stato 4 con un inibitore della catena di trasporto degli elettroni quale il malonato. Al diminuire della velocità di ossidazione del substrato diminuisce la velocità di pompaggio di protoni all'esterno e quindi anche il valore del potenziale di membrana. La variazione del consumo di ossigeno in funzione del potenziale di membrana, in un mitocondrio che respira in assenza di fosforilazione, ci permette di valutare la variazione cinetica della conduttanza protonica in funzione del potenziale di membrana. Infatti le curve di titolazione così ottenute sono una misura indiretta della conduttanza protonica perchè, in stato stazionario, la velocità del consumo di ossigeno (cioè il flusso protonico in uscita) nei mitocondri in assenza di fosforilazione equivale al flusso protonico in entrata dovuto alla conduttanza protonica. In effetti il potenziale di membrana (Δp) è costituito da due componenti:

- la differenza di potenziale elettrico ai capi della membrana mitocondriale ($\Delta \Psi$);
- la differenza di potenziale chimico protonico (ΔpH).

Sperimentalmente è possibile abolire il ΔpH facendo in modo che il Δp risulti uguale al $\Delta \Psi$ a questo scopo si utilizza la nigericina, uno scambiatore H^+/K^+ , in grado di annullare la differenza di pH a livello della membrana mitocondriale

interna, e di conseguenza abolire la differenza di potenziale chimico, trasformandola in differenza di potenziale. Le misure sono state effettuate a 30°C in una soluzione contenente per il fegato LiCl 80 mM, Hepes 50 mM, EGTA 1 mM, Tris-PO₄ 5 mM, PH 7.0, 0.1% (p/v) di BSA e per il muscolo LiCl 30 mM, MgCl₂ 6 mM, saccarosio 75 mM, EDTA 1 mM, Tris-PO₄ 20 mM, pH 7.0, 0.1 % (p/v) di BSA libera da acidi grassi. Per ogni misura a queste soluzioni è stato aggiunto succinato 10 mM, rotenone 3.75 µM, oligomicina 2µg/ml, safranina O (83.3 nmol/mg) e nigericina (80 ng/ml). La titolazione dello Stato 4 della respirazione è stata eseguita mediante sequenziali aggiunte di malonato a concentrazioni crescenti.

Misura della conduttanza protonica indotta dagli acidi grassi

Per avere informazioni più precise sul disaccoppiamento indotto dagli acidi grassi è stata anche effettuata la determinazione della cinetica della conduttanza protonica indotta dagli acidi grassi in analogia a quella effettuata per la conduttanza protonica basale. Tale determinazione è stata ottenuta titolando la respirazione ed il potenziale di membrana in presenza di oligomicina, succinato e palmitato con quantità crescenti di malonato fino a 0.6 mM per i mitocondri IMF e per i mitocondri epatici e 1.07 mM per i SS. [68]. Le concentrazioni di palmitato aggiunto sono di 85 µM per le misure effettuate sui mitocondri di fegato e 45 µM e 75 µM per i mitocondri SS e IMF, rispettivamente.

Misura del contenuto di UCP3 nei mitocondri isolati

Le proteine mitocondriali vengono denaturate in un buffer contenente Tris 60 mM, pH 6.8, saccarosio 10%, SDS 2%, β -mercaptoetanololo 4%, blu di bromofenolo 0.06% e caricate su di un gel di poliacrilammide-SDS al 12% con un marker proteico (Bio-Rad Laboratories, CA, USA). Dopo la corsa elettroforetica in un buffer contenente Tris 50 mM, pH 8.3, glicina 384 mM, SDS 0.1%, le proteine vengono trasferite dal gel su una membrana di polivinilidene difluoride (PVDF) (Immobilon-P, Millipore, Switzerland) a 0.8 mA/cm^2 per 90 minuti. La membrana viene poi prebloccata in un buffer contenente PBS (soluzione tamponata con fosfato, NaCl 13.7 mM, KCl 0.3 mM, NaHPO_4 1.0 mM, KH_2PO_4 0.2 mM; latte 5%; Tween 20 0.5%) per un'ora e poi incubata per una notte a 4°C con una soluzione di un anticorpo policlonale specifico per la proteina UCP 3 (Chemicon International, CA, USA) diluito 1:3000 nello stesso buffer. Infine la membrana viene lavata tre volte per 15 minuti in una soluzione di PBS, Tween 20 0.5%, e tre volte per 15 minuti in una soluzione di PBS; viene poi incubata per un'ora a temperatura ambiente con una soluzione di anticorpo secondario, diluito 1:10000, coniugato con una fosfatasi alcalina (Promega Corporation, WI, USA). La membrana viene lavata come appena descritto, risciacquata in acqua distillata ed incubata a temperatura ambiente in una soluzione contenente CDP-Star (Sigma-Aldrich, MO, USA), un substrato chemiluminescente diluito 1:5. Le bande vengono ottenute esponendo una pellicola autoradiografica (Kodak, Eastman Kodak Company, NY, USA) alla

membrana; i dati, invece, sono acquisiti mediante un densitometro e quantificati con il Molecular Analyst Software (Bio-Rad Imaging and Software, CA, USA).

Determinazione dell'attività specifica della citocromo ossidasi

L'attività specifica della citocromo ossidasi è stata misurata con metodo polarografico usando l'elettrodo di Clark a 30°C in un mezzo contenente Na-malonato 10mM, rotenone 4µM, dinitrofenolo 0.5mM, Hepes 75mM, pH 7.4 [69]. I mitocondri sono stati diluiti in una soluzione Chappel-Perry (ATP 1mM, KCl 100mM, MgCl₂ 5mM, EDTA 1mM, EGTA 5mM, Hepes 50mM, pH 7.4) e incubati con Lubrol PX (225µg/mg di proteine mitocondriali) per 30 minuti in ghiaccio per smascherare l'attività dell'enzima. Alla fine dell'incubazione, l'attività specifica della citocromo ossidasi è stata misurata come consumo d'ossigeno in presenza di citocromo C 30µM, ascorbato 4mM e tetrametil-p-fenilendiammina(TMPD) 0.3mM. Il bianco contenente solo il substrato è stato misurato e sottratto alla misura precedente, così da ricavare il valore dell'autoossidazione dell'ascorbato.

Misura del contenuto di ANT

Il contenuto di ANT è stato determinato mediante titolazione dello Stato 3 della respirazione con concentrazioni crescenti di carbossiatrattiloside (CAT) per i mitocondri di fegato in un mezzo contenente KCl 30mM, MgCl₂ 6mM, saccarosio 75mM, EDTA 1mM, KH₂PO₄ 20mM, 0.1% di BSA libera da acidi

grassi, per i mitocondri di muscolo in un mezzo d'incubazione contenente KCl 30 mM, MgCl₂ 6 mM, saccarosio 75 mM, EDTA 1 mM, KH₂PO₄ 20 mM, pH 7.0, 0.1 % (p/v) di BSA libera da acidi grassi in presenza di succinato 10mM e rotenone 3.75μM, PH 7.0. I mitocondri sono stati preincubati con la CAT nel mezzo respiratorio per un minuto prima di aggiungere l'ADP (0.3 mM) per iniziare lo Stato 3 della respirazione. Il contenuto mitocondriale di ANT è stato determinato mediante estrapolazione della parte lineare della curva di titolazione per ottenere la quantità di CAT richiesta per inibire completamente la respirazione dello Stato 3.

Analisi statistica

I dati ottenuti sono stati riportati come le medie $\pm$ errore standard delle medie (ES) di otto differenti ratti. Le analisi statistiche sono state compiute usando l'analisi della varianza ad una via ANOVA. Il confronto tra i singoli gruppi è stato fatto tramite il test Tuckey dopo che l'ANOVA aveva evidenziato l'esistenza di differenze significative tra i gruppi. L'associazione fra variabili è stata valutata attraverso la correlazione lineare semplice. Per quanto riguarda le analisi statistiche compiute sui mitocondri, ho usato il test “ t di Student”. Il livello minimo di significatività scelto è stato $P < 0,05$.

Tutte le analisi sono state compiute usando il programma Graphpad Prism (Graphpad software inc., San Diego, CA,USA).

RISULTATI

Nel primo disegno sperimentale ho valutato la composizione corporea e i parametri metabolici dell'organismo in differenti stadi di sviluppo. In figura 1 sono riportati gli andamenti nel tempo sia del peso corporeo che dell'energia corporea (espressa in KJ/g di peso corporeo) nei ratti in fase di accrescimento di età compresa fra i 25 e i 180 giorni. Dall'analisi di questa figura si può notare che inizialmente si ha un periodo di rapido accrescimento corporeo fino al raggiungimento della maturità sessuale (circa 90 giorni), ma successivamente la velocità di guadagno di peso corporeo rallenta. Per quanto riguarda invece l'energia corporea, essa aumenta significativamente fra i 40 e 60 giorni di età e presenta un incremento anche tra i 120 ed i 150 giorni di età.

L'analisi della composizione corporea, in termini di variazioni del contenuto percentuale di acqua, proteine e lipidi corporei nei ratti nelle diverse età comprese tra i 25 ed i 180 giorni, è riportata in figura 2. Dalla curva si evince che il contenuto percentuale di acqua corporea diminuisce con l'età, a partire da un valore di circa 73% di peso corporeo nei ratti più giovani ad un valore di circa il 60% in quelli più adulti. La percentuale di proteine corporee non varia significativamente con l'età, sebbene sia evidente una tendenza alla diminuzione nei ratti di 150 e 180 giorni di età. La percentuale di lipidi, invece, aumenta considerevolmente nei ratti in fase di accrescimento, da un valore di circa il 5%

nei ratti di 25 giorni di età ad un valore di circa il 17% in quelli di 180 giorni di età.

In figura 3 sono invece riportati gli andamenti temporali dei livelli serici di leptina, acidi grassi non esterificati (NEFA) e triiodotironina (T_3). I risultati mostrano che i livelli serici di leptina aumentano significativamente nei ratti in fase di accrescimento e raggiungono un valore che rimane costante a 150 giorni e 180 giorni di età. Per quanto riguarda invece i livelli serici di NEFA, essi aumentano significativamente solo a 180 giorni di età, mentre la concentrazione ematica di T_3 mostra un picco a 60 giorni e non varia significativamente per le successive fasi di sviluppo.

In figura 4 è riportata la correlazione tra i livelli serici di leptina e contenuto di grasso corporeo, mentre la correlazione tra i livelli serici di leptina e ME introdotta nei ratti con l'avanzare dell'età è riportata in figura 5. I livelli di leptina nel siero sono fortemente correlati con la massa di grasso corporeo (figura 4) e con la energia metabolizzabile (ME) introdotta giornaliera espressa per $Kg^{0.75}$ (figura 5).

Comunque le linee di regressione per la correlazione tra i livelli serici di leptina e l'ME introdotta dimostrano una significativa variazione di tendenza, con una notevole ripidità nel periodo compreso tra 25 e 90 giorni rispetto al periodo compreso tra i 90 e 180 giorni (figura 5).

Nel secondo disegno sperimentale ho invece valutato la regolazione dell'omeostasi del glucosio da parte dell'insulina e la funzionalità mitocondriale

nel tessuto epatico e in quello muscolare scheletrico. In questa seconda parte del disegno sperimentale mi sono focalizzata solo su due fasi della vita, la fase adulta, ossia 180 giorni, e la fase postpuberale, che è quella in cui sono ormai terminate le variazioni ormonali, essendo stata raggiunta la maturità sessuale.

Nella figura 6 sono riportate le concentrazioni di insulina e di glucosio. I risultati evidenziano che nella transizione dalla fase postpuberale alla fase adulta si ha un aumento significativo della concentrazione di insulina serica, mentre la glicemia resta costante.

Per quanto concerne le analisi sulla funzionalità mitocondriale condotte nel fegato, in tabella 1 sono riportati i risultati relativi alla velocità respiratoria mitocondriale usando il succinato come substrato FAD-dipendente, il glutammato come substrato NAD-dipendente e il palmitoilCoA come substrato lipidico. Le velocità respiratorie dello Stato 3 e dello Stato 4 diminuiscono significativamente solo con il succinato e con palmitoilCoA, mentre non c'è nessuna variazione significativa per quanto riguarda il substrato NAD-dipendente.

La figura 7 evidenzia l'attività della citocromo ossidasi nei mitocondri di fegato isolati da ratti di 60 e 180 giorni. L'attività di questo enzima diminuisce significativamente nei ratti di 180 giorni rispetto ai ratti più giovani.

Il contenuto di ANT nei mitocondri di fegato isolati dai ratti di 60 giorni e di 180 giorni è stato riportato in figura 8. Il contenuto di ANT è stato trovato significativamente più basso nei ratti di 180 giorni rispetto a quelli più giovani.

Le figure 9 e 10 riportano rispettivamente le cinetiche della conduttanza protonica basale e della conduttanza protonica indotta dagli acidi grassi nei mitocondri di fegato isolati da ratti di 60 e 180 giorni. Al fine di ottenere tali cinetiche, la velocità respiratoria allo stato stazionario e il potenziale di membrana mitocondriale sono stati titolati con il malonato in assenza o in presenza di acido palmitico per la conduttanza protonica basale ed indotta, rispettivamente. Infatti le curve di titolazione così ottenute sono una misura indiretta della conduttanza protonica mitocondriale, poiché la velocità di consumo dell'ossigeno allo stato stazionario (un indice della fuoriuscita di protoni) nei mitocondri non fosforilanti è equivalente alla velocità di ingresso dei protoni dovuto alla conduttanza protonica.

La figura 9 non mostra differenze nella cinetica della conduttanza protonica basale tra i due gruppi di ratti.

Diversamente, la figura 10 mostra che la cinetica della conduttanza protonica indotta è maggiore nei mitocondri dei ratti di 180 giorni rispetto ai ratti più giovani. Infatti, la curva del consumo di ossigeno mitocondriale in funzione del potenziale di membrana ottenuta per i mitocondri di 180 giorni si trova al disotto della curva ottenuta con i mitocondri di ratti più giovani, in modo tale che, per qualsiasi velocità di consumo di ossigeno, il potenziale di membrana è più basso nei ratti adulti come risultato dell'aumento della conduttanza protonica indotta nei ratti di 180 giorni.

Nella figura 11 è riportato il disaccoppiamento indotto dagli acidi grassi nei mitocondri di fegato determinato come diminuzione nel potenziale di membrana mitocondriale ottenuto in seguito all'aggiunta di 85 μ M di palmitato. Nei ratti di 180 giorni la diminuzione del potenziale di membrana mitocondriale è maggiore che nei ratti più giovani.

Per quanto riguarda le misure effettuate nei mitocondri isolati dal muscolo scheletrico, ho innanzitutto valutato la conduttanza protonica basale ed indotta nelle due popolazioni mitocondriali che costituiscono il muscolo scheletrico, ossia mitocondri SS e IMF. In figura 12 è riportata la cinetica della conduttanza protonica basale nelle due popolazioni mitocondriali del muscolo scheletrico. Come è visibile in figura 12, i mitocondri SS presentano una conduttanza protonica basale ridotta rispetto agli IMF.

La figura 13 mostra che l'aggiunta di un disaccoppiante naturale, quale il palmitato, determina un decremento nel potenziale di membrana mitocondriale in entrambe le popolazioni.

In tabella 2 sono riportati i dati relativi alla capacità respiratoria mitocondriale della popolazione subsarcolemmatica del muscolo scheletrico usando substrati NAD- e FAD-dipendenti e substrati lipidici. I risultati ottenuti nei mitocondri SS mostrano che lo Stato 3 e il valore dell'RCR aumentano significativamente nei ratti di 180 giorni rispetto a quelli di 60 giorni, mentre lo Stato 4 resta invariato, indipendentemente dal substrato usato.

Nelle figure 14 e 15 si evidenzia che nessuna variazione nell'attività specifica della COX e nel contenuto di ANT dovuto all'età è stata trovata nei mitocondri SS isolati dal muscolo scheletrico.

Nella tabella 3 sono riportate le velocità respiratorie dello Stato 3 e dello Stato 4 dei mitocondri IMF con substrati FAD- e NAD-dipendenti e con substrati lipidici. I risultati evidenziano che un significativo incremento dello Stato 3 della respirazione è stato trovato nei ratti adulti rispetto a quelli in fase postpuberale solo con il substrato NAD-dipendente, il glutammato, sebbene i valori con il succinato e il palmitoilCoA tendono ad aumentare. La respirazione dello Stato 4 tende a essere più bassa con tutti i substrati usati nei ratti di 180 giorni, sebbene non sia una variazione significativa. Di conseguenza, un significativo incremento nel valore dell'RCR è stato trovato in ratti di 180 giorni con tutti i substrati.

In figura 14 e 15 è mostrato che non c'è nessuna variazione nell'attività specifica della COX e che il contenuto di ANT è significativamente diminuito nei ratti di 180 giorni.

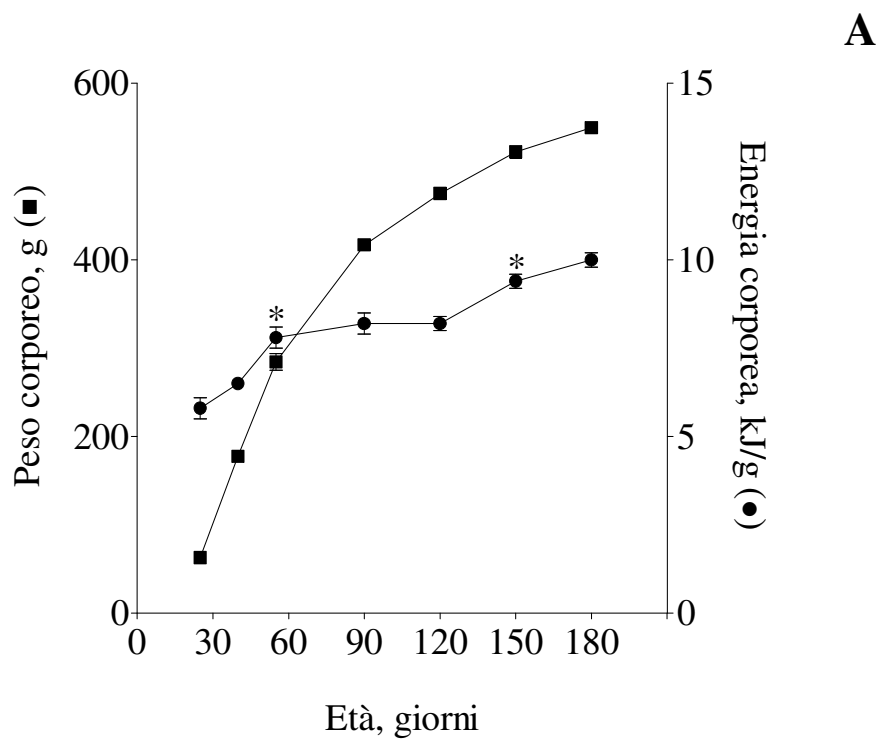
Il contenuto della proteina UCP3 è mostrato in figura 16. I risultati evidenziano che c'è un aumento significativo del contenuto di proteina disaccoppiante nei ratti adulti rispetto a quelli in fase postpuberale.

Nelle figure 17 e 18 sono riportate le cinetiche della conduttanza protonica basale ed indotta, rispettivamente, dei mitocondri SS e IMF del muscolo scheletrico. I risultati mostrano che non c'è nessuna variazione nella conduttanza protonica basale sia nei mitocondri SS che IMF isolati dal muscolo scheletrico di ratti di 60

e 180 giorni. Invece, la conduttanza protonica indotta è significativamente diminuita nei mitocondri SS e IMF isolati da ratti adulti rispetto a quelli in fase postpuberali.

Figura 1

Peso e contenuto energetico corporeo durante l'accrescimento nel ratto.

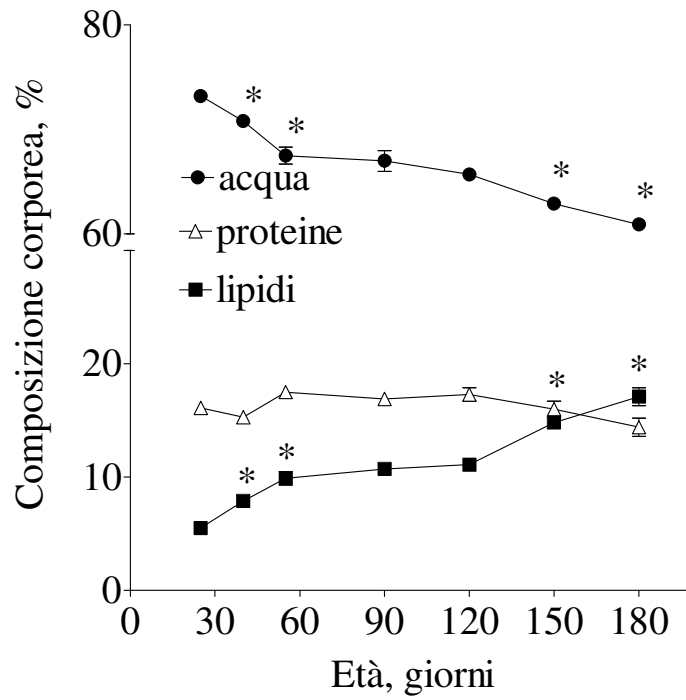


Ogni punto rappresenta la media $\pm$ ES di otto differenti ratti

* $P < 0.05$ rispetto ai ratti della precedente età (non riportato per i valori del peso corporeo).

Figura 2

Composizione corporea durante l'accrescimento nel ratto.

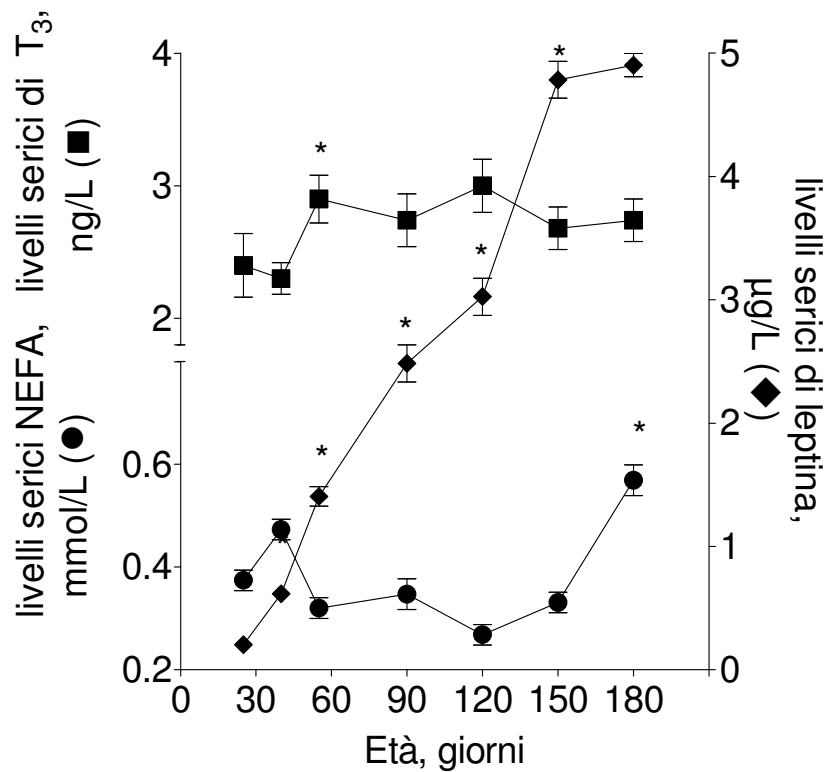


Ogni punto rappresenta la media $\pm$ ES di otto differenti ratti

*P<0.05 rispetto ai ratti della precedente età

Figura 3

Livelli serici di leptina, acidi grassi liberi e ormone tiroideo durante l'accrescimento nel ratto.

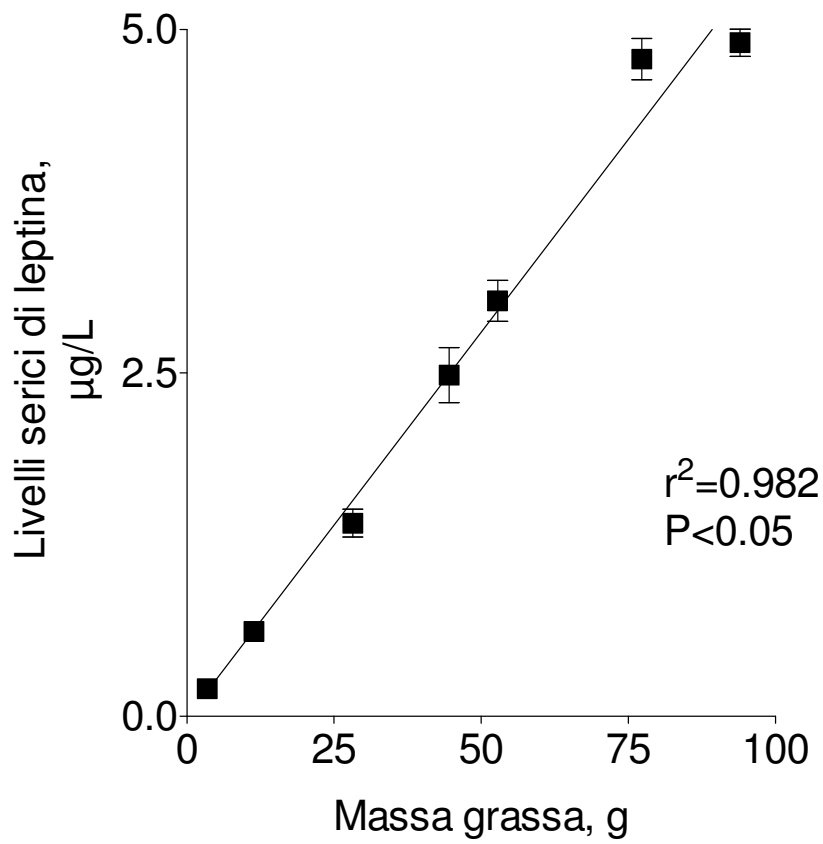


Ogni punto rappresenta la media $\pm$ ES di otto differenti ratti

*P<0.05 rispetto ai ratti della precedente età

Figura 4

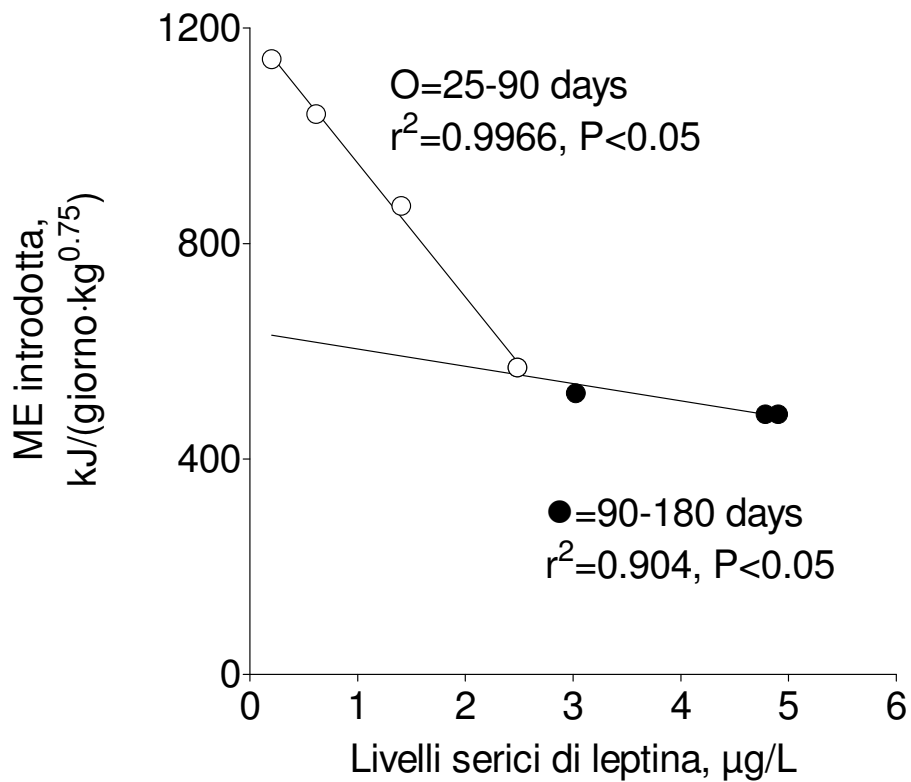
Correlazione tra i livelli serici di leptina e massa grassa corporea durante l'accrescimento nel ratto.



Ogni punto rappresenta la media $\pm$ ES di otto differenti ratti

Figura 5

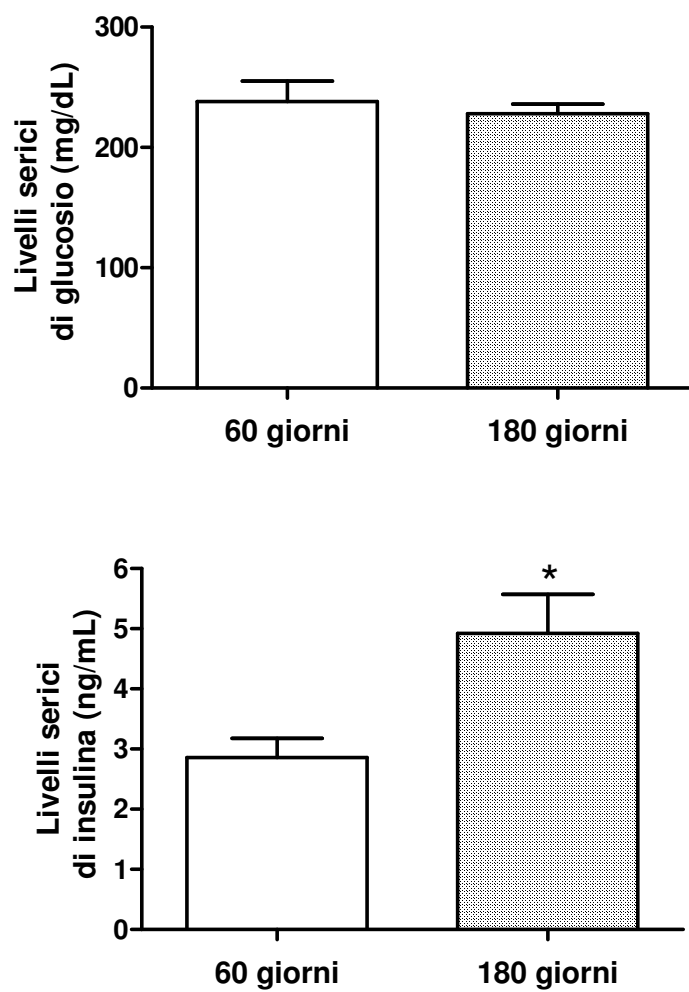
Correlazione tra i livelli serici di leptina e energia metabolizzabile introdotta (ME) durante l'accrescimento nel ratto.



Ogni punto rappresenta la media $\pm$ ES di otto differenti ratti

Figura 6

Variazioni delle concentrazioni ematiche di glucosio e di insulina in ratti di 60 e 180 giorni di età.



I valori sono riportati come medie $\pm$ ES di otto differenti esperimenti

* $P < 0.05$ rispetto ai ratti di 60 giorni.

Tabella 1

Velocità respiratorie nei mitocondri di fegato isolati da ratti di 60 e 180 giorni di età.

	60 giorni	180 giorni
Succinato + rotenone		
Stato 3	184 ± 8	$116 \pm 6^*$
Stato 4	27 ± 2	$18 \pm 1^*$
RCR	$6,8 \pm 2$	$6,3 \pm 2$
Glutammato + malato		
Stato 3	88 ± 4	94 ± 4
Stato 4	$9,1 \pm 1,2$	$8,5 \pm 0,9$
RCR	$9,7 \pm 3,2$	$11 \pm 3,2$
Palmitoil CoA + carnitina + malato		
Stato 3	$86,1 \pm 6,3$	$65,0 \pm 4,8^*$
Stato 4	$16,0 \pm 0,4$	$11,8 \pm 0,6^*$
RCR	$5,4 \pm 0,5$	$5,5 \pm 0,3$

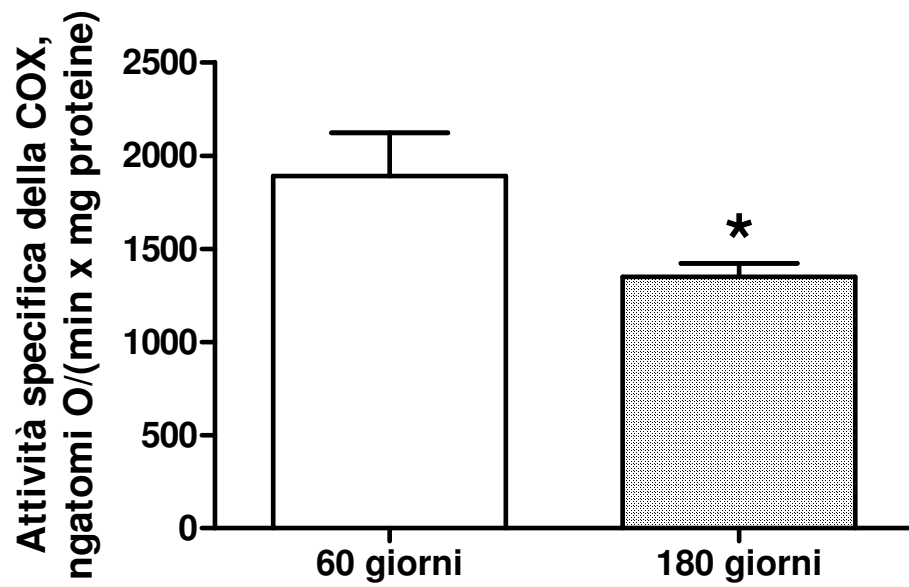
I valori sono riportati come medie $\pm$ ES di otto differenti esperimenti e sono espressi come ngatomi di O/ min x mg di proteine.

RCR = rapporto di controllo respiratorio

* $P < 0,05$ rispetto ai ratti di 60 giorni

Figura 7

Attività specifica della citocromo ossidasi (COX) nei mitocondri di fegato isolati da ratti di 60 e 180 giorni di età.

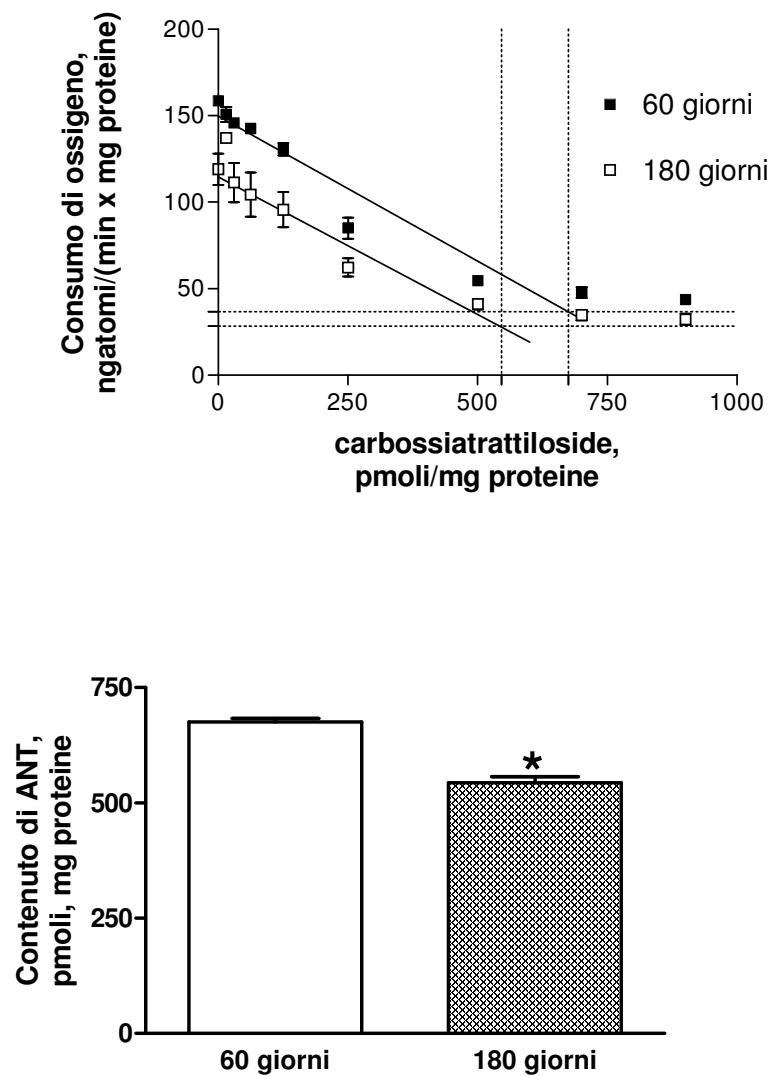


I valori sono riportati come medie $\pm$ ES di otto differenti esperimenti

* $P < 0,05$ rispetto ai ratti di 60 giorni

Figura 8

Contenuto proteico di ANT nei mitocondri di fegato isolati da ratti di 60 e 180 giorni di età.

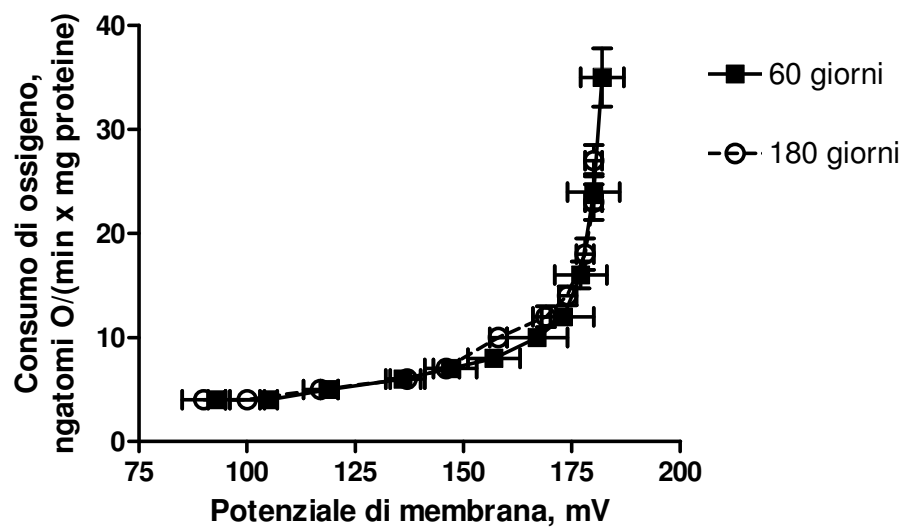


I valori sono riportati come medie $\pm$ ES di otto differenti esperimenti

* $P < 0.05$ rispetto ai ratti di 60 giorni.

Figura 9

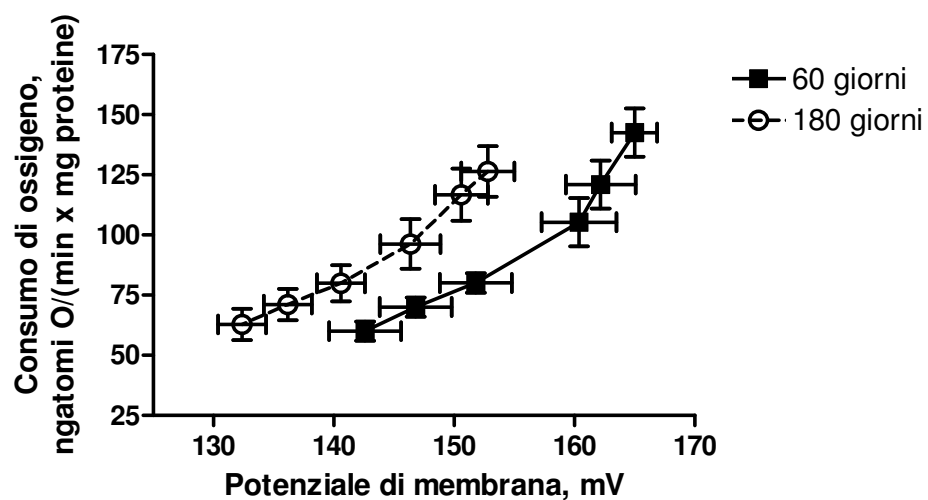
Cinetica della conduttanza protonica basale nei mitocondri di fegato isolati da ratti di 60 e 180 giorni di età.



I valori sono riportati come medie $\pm$ ES di otto differenti esperimenti.

Figura 10

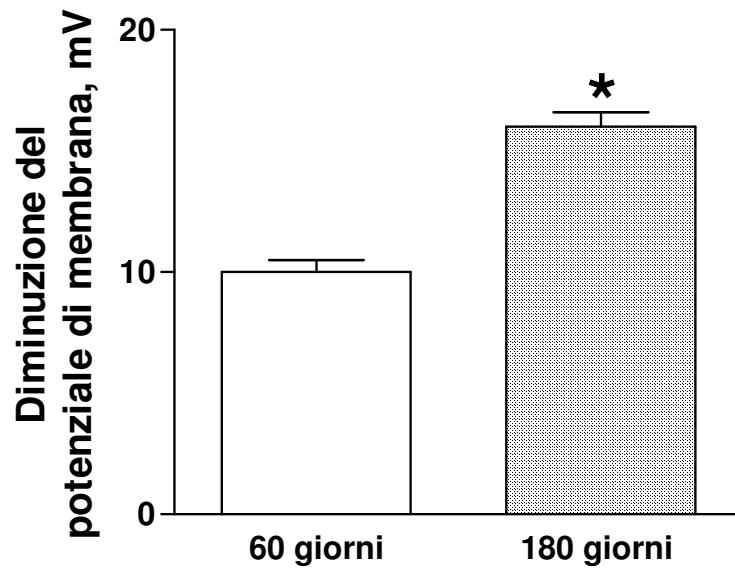
Cinetica della conduttanza protonica indotta dagli acidi grassi nei mitocondri di fegato isolati da ratti di 60 e 180 giorni di età.



I valori sono riportati come medie $\pm$ ES di otto differenti esperimenti.

Figura 11

Disaccoppiamento indotto dagli acidi grassi nei mitocondri di fegato isolati da ratti di 60 giorni e 180 giorni di età.

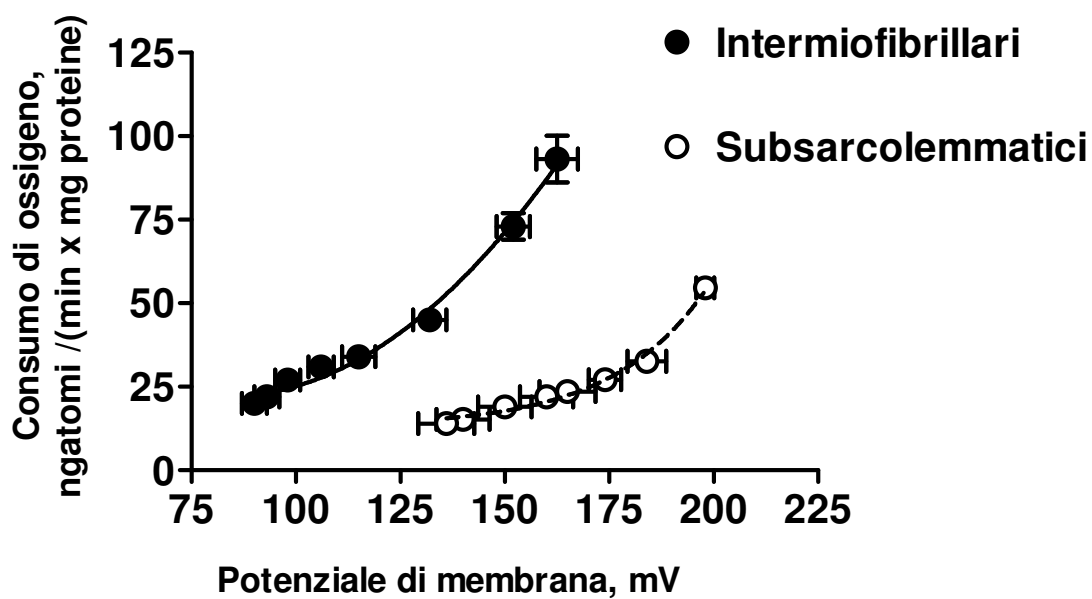


I valori sono riportati come medie $\pm$ ES di otto differenti esperimenti

* $P < 0.05$ rispetto ai ratti di 60 giorni.

Figura 12

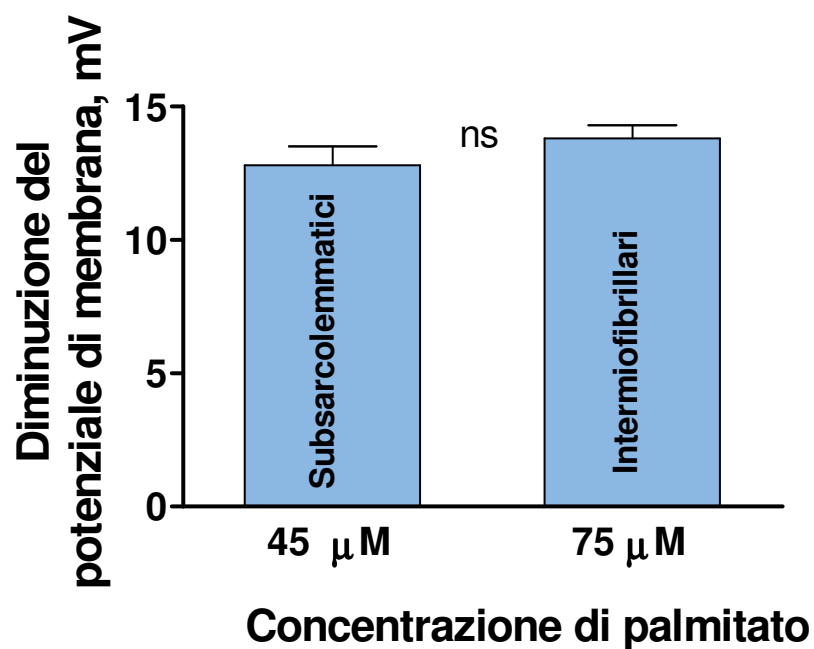
Cinetica della conduttanza protonica basale nei mitocondri subsarcolemmatici (SS) ed intermiofibrillari (IMF) del muscolo scheletrico.



I valori sono riportati come medie $\pm$ ES di otto differenti esperimenti

Figura 13

Sensibilità all'effetto disaccoppiamento degli acidi grassi nei mitocondri subsarcolemmatici (SS) ed intermiofibrillari (IMF) del muscolo scheletrico.



I valori sono riportati come medie $\pm$ ES di otto differenti esperimenti

Tabella 2

Velocità respiratorie nei mitocondri subsarcolemmatici (SS) del muscolo scheletrico isolati da ratti di 60 e 180 giorni di età.

SS	60 giorni	180 giorni
Succinato + rotenone		
Stato 3	369,1 ± 9,5	539,3 ± 21,1*
Stato 4	85,3 ± 2,9	93,1 ± 2,9
RCR	4,3 ± 0,1	5,8 ± 0,2*
Glutammato + malato		
Stato 3	257,0 ± 13,9	373,7 ± 20,0*
Stato 4	34,2 ± 3,2	35,1 ± 0,6
RCR	5,2 ± 0,1	10,7 ± 0,6*
Palmitoil CoA + carnitina + malato		
Stato 3	155,7 ± 10,9	248,1 ± 11,4*
Stato 4	30,4 ± 2,0	32,9 ± 1,4
RCR	5,2 ± 0,5	7,6 ± 0,3*

I valori sono riportati come medie ± SE di otto differenti esperimenti e sono espressi come ngatomi di O/ min x mg di proteine.

RCR = rapporto di controllo respiratorio

* P<0,05 rispetto ai ratti di 60 giorni

Tabella 3

Velocità respiratorie nei mitocondri intermiofibrillari (IMF) del muscolo scheletrico isolati da ratti di 60 e 180 giorni di età.

IMF	60 giorni	180 giorni
Succinato + rotenone		
Stato 3	698,5 ± 24,5	748,6 ± 13,0
Stato 4	133,7 ± 6,0	121,4 ± 3,0
RCR	5,2 ± 0,1	6,2 ± 0,2*
Glutammato + malato		
Stato 3	507,0 ± 17,5	638,8 ± 22,3*
Stato 4	40,4 ± 2,4	36,2 ± 0,8
RCR	13,0 ± 1,1	17,7 ± 0,7*
Palmitoil CoA + carnitina + malato		
Stato 3	283,1 ± 8,2	297,0 ± 11,8
Stato 4	34,6 ± 1,3	31,4 ± 1,2
RCR	8,2 ± 0,2	9,5 ± 0,3*

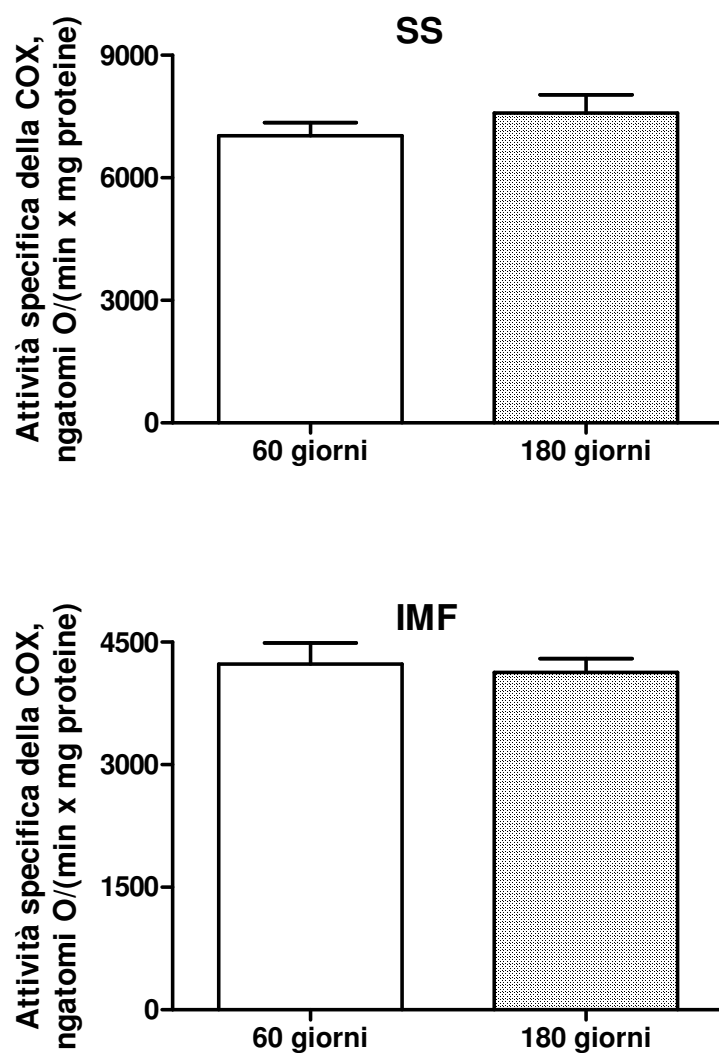
I valori sono riportati come medie ± ES di otto differenti esperimenti e sono espressi come ngatomi di O/ min x mg di proteine.

RCR = rapporto di controllo respiratorio

*P < 0,05 rispetto ai ratti di 60 giorni

Figura 14

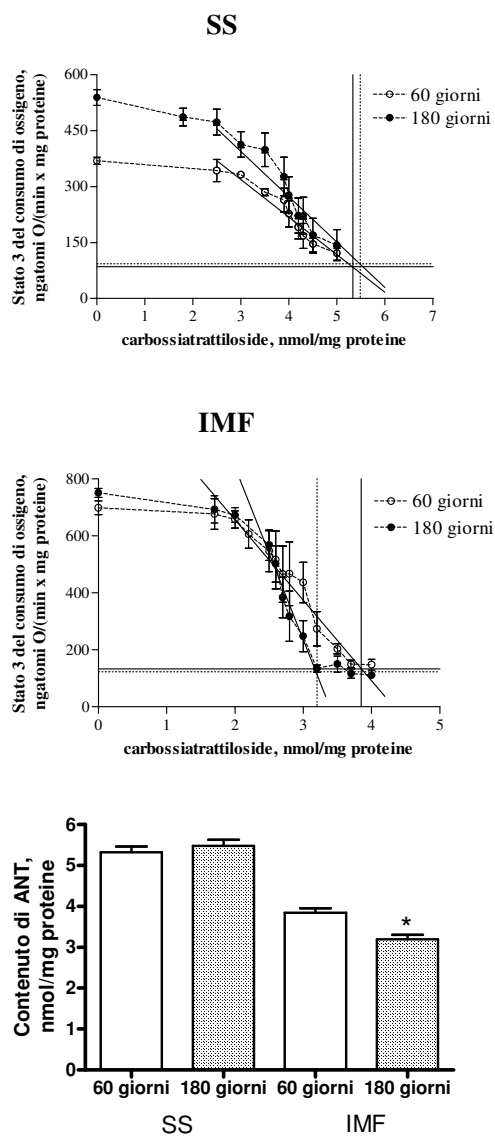
Attività specifica della citocromo ossidasi (COX) nei mitocondri subsarcolemmatici (SS) ed intermiofibrillari (IMF) del muscolo scheletrico in ratti di 60 e di 180 giorni d'età.



I valori sono riportati come medie $\pm$ ES di otto differenti esperimenti.

Figura 15

Contenuto proteico dell'ANT nei mitocondri subsarcolemmatici (SS) ed intermiofibrillari (IMF) del muscolo scheletrico in ratti di 60 e di 180 giorni d'età.



I valori sono riportati come medie $\pm$ ES di otto differenti esperimenti.

* $P < 0,05$ rispetto ai ratti di 60 giorni

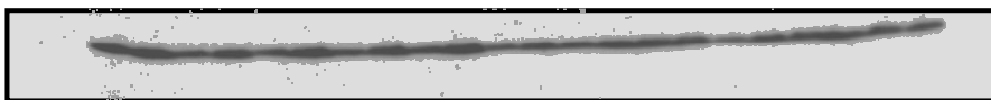
Figura 16

Misura del contenuto della proteina UCP3 nei mitocondri subsarcolemmatici (SS) ed intermiofibrillari (IMF) del muscolo scheletrico in ratti di 60 e di 180 giorni d'età.

SS

IMF

60-180 60-180 60-180 60-180 60-180 60-180 , 60-180 60-180 60-180 60-180 60-180



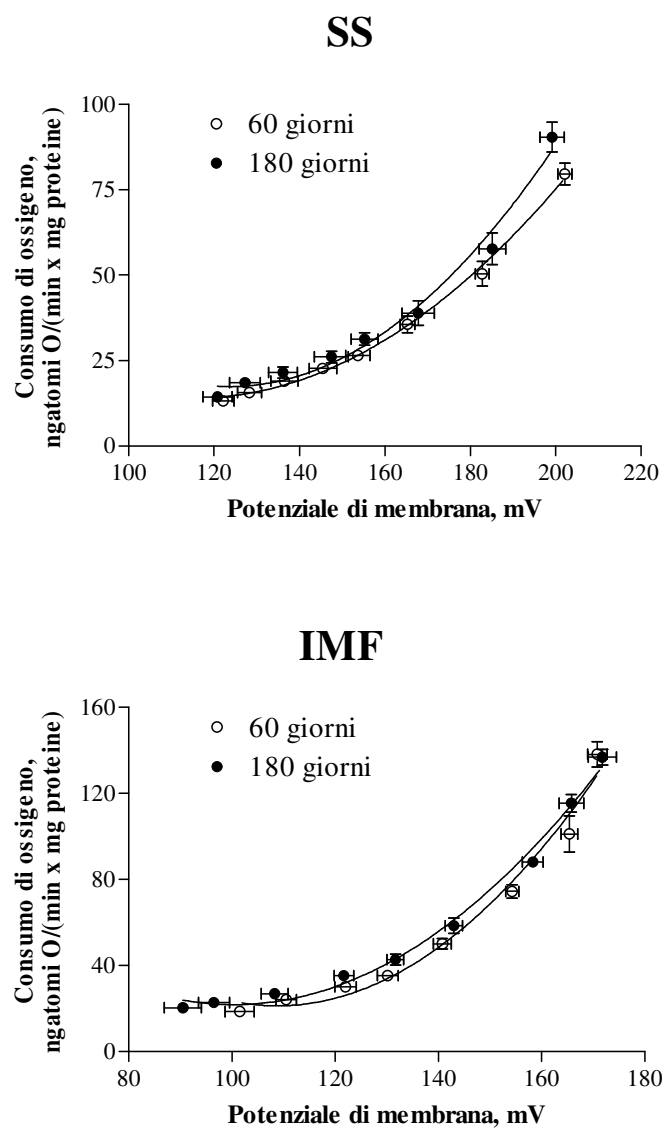
	60 giorni	180 giorni
SS	2167,6 ± 258,6	4882,6 ± 280,5*
IMF	1733,1 ± 331,3	2946,3 ± 340,8*

I valori riportati sono le medie ± ES di 5 differenti campioni e sono espressi in unita' arbitrarie / mg di proteine.

* P<0,05 rispetto ai ratti di 60 giorni

Figura 17

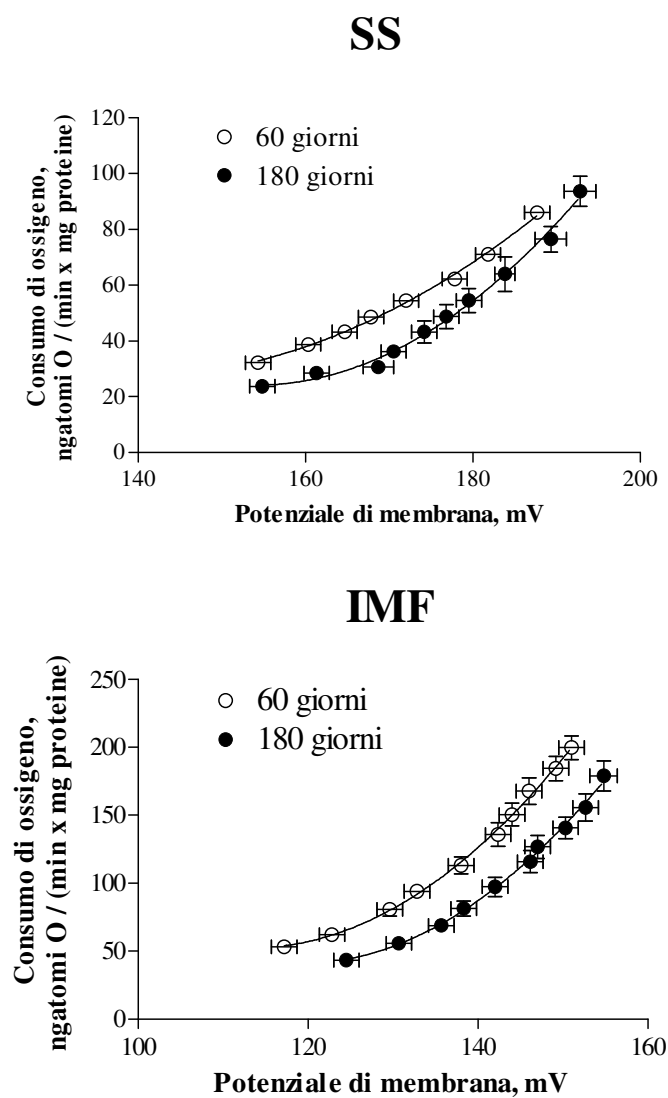
Cinetica della conduttanza protonica basale nei mitocondri subsarcolemmatici (SS) ed intermiofibrillari (IMF) del muscolo scheletrico in ratti di 60 e di 180 giorni d'età.



I valori sono riportati come medie $\pm$ ES di otto differenti esperimenti.

Figura 18

Cinetica della conduttanza protonica indotta dagli acidi grassi nei mitocondri subsarcolemmatici (SS) ed intermiofibrillari (IMF) del muscolo scheletrico in ratti di 60 e di 180 giorni d'età.



I valori sono riportati come medie $\pm$ ES di otto differenti esperimenti.

DISCUSSIONE

È ormai noto che l'invecchiamento è caratterizzato da fenomeni degenerativi a livello corporeo ed è spesso associato ad un'obesità spontanea che può essere collegata ad insulino-resistenza. In questa tesi ho quindi ritenuto interessante analizzare l'effetto dell'avanzare dell'età sul metabolismo corporeo di ratti in diverse fasi della vita, dallo svezzamento all'età adulta, attraverso la misura della composizione corporea e dei livelli serici di alcuni ormoni coinvolti nel bilancio energetico e nel metabolismo corporeo.

I risultati di questa tesi indicano che all'aumentare dell'età non solo aumenta il peso corporeo per il fenomeno dell'accrescimento (figura 1), ma aumenta anche il contenuto energetico corporeo (figura 1). È possibile anche notare che la fase di accrescimento nel ratto è caratterizzata da variazioni nella velocità di accrescimento. Fino a 90 giorni di età, infatti, si ha una rapida crescita corporea, in quanto le richieste energetiche dell'accrescimento sono elevate. Nel periodo successivo, invece, la velocità di accrescimento rallenta, approssimandosi quasi a zero. L'aumento dell'energia corporea è spiegabile con la variazione della composizione corporea, in quanto nella transizione dallo svezzamento all'età adulta si ha un aumento significativo del contenuto dei lipidi corporei, associato ad una diminuzione del contenuto di acqua, mentre il contenuto proteico non risulta essere ancora variato nelle diverse fasce di età analizzate, nonostante vi sia una leggera tendenza alla diminuzione a 150 e 180 giorni di età (figura 2). La misura dei livelli serici di acidi grassi liberi ha evidenziato, inoltre, che essi

aumentano significativamente solo a 180 giorni (figura 3). Tutto ciò sta ad indicare che già nei ratti adulti si iniziano a manifestare una tendenza all'obesità e all'aumento del contenuto lipidico corporeo.

Analizzando questi dati, ho ritenuto interessante monitorare i livelli serici di alcuni ormoni coinvolti nella regolazione del peso corporeo nelle diverse fasi della vita prese in esame, per capire quali alterazioni metaboliche potessero essere responsabili dell'aumento dei lipidi corporei riscontrati nell'età adulta. Per quanto riguarda i livelli serici dell'ormone tiroideo, le cui variazioni potrebbero essere responsabili di alterazioni del metabolismo basale corporeo e spiegare quindi parzialmente l'aumento dei lipidi corporei, essi aumentano significativamente a 60 giorni di età, ma restano quasi costanti nelle età successive (figura 3). Quindi l'alterazione del bilancio energetico, che è alla base dell'aumento della massa grassa, deve essere dovuta a variazioni di altre componenti del bilancio energetico e/o ad altri ormoni collegati alla regolazione del bilancio energetico. Ho quindi misurato anche la concentrazione ematica di leptina, ormone secreto dal tessuto adiposo che regola il bilancio energetico andando a diminuire l'assunzione di cibo all'aumentare della massa grassa corporea. La determinazione dei livelli serici di questo ormone ha confermato che, con l'avanzare dell'età, all'aumento della percentuale lipidica corporea è associato un aumento dei livelli serici di leptina (figura 3). Ho ritenuto a questo punto interessante correlare i livelli serici di leptina con la massa lipidica corporea (figura 4) e con l'energia metabolizzabile introdotta (figura 5). I risultati

hanno evidenziato che c'è una correlazione significativa tra i livelli di leptina e la massa grassa corporea (figura 4) e con l'energia metabolizzabile introdotta (figura 5). Inoltre, per quanto riguarda questa ultima correlazione, è evidente che la pendenza della linea di regressione ottenuta per il periodo dai 90 ai 180 giorni ($-31,9 \pm 7,4$) è significativamente più alta ($p=0,0068$) di quella ottenuta per il periodo 25-90 giorni ($-248,7 \pm 10,2$). Questo risultato suggerisce che a partire da 90 giorni di età in poi si ha una progressiva riduzione della risposta del ratto al segnale della leptina con l'avanzare dell'età, ossia si ha una tendenza alla leptino-resistenza. Fino ad ora, l'aumentata resistenza alla leptina era stata riscontrata solo nei ratti anziani [70;71]. Da questi dati, quindi, si evince per la prima volta che il precoce instaurarsi della resistenza alla leptina dei ratti in fase di accrescimento potrebbe essere responsabile dell'obesità spontanea associata all'età. In fase adulta, quindi, oltre alla tendenza all'obesità e all'aumento del contenuto lipidico corporeo, si assiste anche a leptino-resistenza, tutte alterazioni tipiche del processo di invecchiamento.

Lo studio condotto nella prima fase del mio lavoro di ricerca indica che a 180 giorni di età, ossia nella fase adulta, sono già manifeste alcune delle alterazioni tipiche dell'invecchiamento, quali tendenza all'obesità e leptino-resistenza. Quindi nella seconda parte della mia tesi ho focalizzato la mia attenzione solo sui ratti in fase adulta, comparandoli con ratti di 60 giorni, in fase postpuberale, età in cui sono ormai cessate le variazioni ormonali imputabili allo sviluppo sessuale.

Per avere informazioni riguardanti l'omeostasi del glucosio, ho innanzitutto misurato la concentrazione di glucosio e insulina sia nei ratti di 60 che di 180 giorni. I risultati indicano che mentre la concentrazione di glucosio non varia al variare dell'età, la concentrazione di insulina aumenta nei ratti adulti rispetto ai ratti in fase postpuberale. Questi risultati indicano una variazione della sensibilità all'insulina nei ratti di 180 giorni di età. Infatti per mantenere la stessa concentrazione di glucosio che si ha nei ratti di 60 giorni, nei ratti adulti è necessaria una maggiore quantità di insulina. Da ciò si deduce che la sensibilità all'insulina è diminuita nei ratti di 180 giorni, ossia è aumentata l'insulino resistenza (figura 6).

Inoltre, per ottenere ulteriori informazioni riguardo al complesso processo fisiologico che è alla base dell'invecchiamento, ho ritenuto opportuno misurare la capacità respiratoria e l'efficienza energetica, parametri che indicano la funzionalità mitocondriale, in due tessuti che maggiormente contribuiscono al metabolismo corporeo, ossia il tessuto epatico e quello muscolare. Infatti il fegato, pur costituendo solo il 4% del peso corporeo totale dell'organismo, contribuisce per più del 20% al metabolismo basale corporeo, mentre il muscolo, che costituisce il 30% della massa corporea di un organismo, contribuisce al 40% del metabolismo generale corporeo.

Per quanto riguarda il fegato, i risultati di questa tesi indicano, innanzitutto, che la respirazione dello stato 3 e dello stato 4, usando il succinato come substrato FAD dipendente, diminuisce nei mitocondri di fegato isolati nei ratti di 180

giorni rispetto a quelli dei ratti di 60 giorni, mentre utilizzando il glutammato come substrato NAD dipendente non si ha nessuna variazione significativa nella capacità respiratoria. Anche le velocità respiratorie misurate in presenza di substrati lipidici diminuiscono significativamente nella transizione dalla fase postpuberale alla fase adulta, suggerendo così una diminuzione dell'attività di ossidazione degli acidi grassi nei ratti adulti (tabella 1). Per quanto riguarda i danni biochimici che sono alla base della diminuzione dello stato 3, in questa tesi ho misurato l'attività della citocromo ossidasi. Il risultato mostra una significativa diminuzione dell'attività di questo enzima. Poiché questo stato respiratorio è influenzato anche dai trasportatori del sistema di fosforilazione, ho misurato il contenuto di ANT nei due gruppi di ratti. Perciò il decremento dello stato 3 nei ratti di 180 giorni di età potrebbe essere dovuto sia alla diminuzione dell'attività della citocromo ossidasi (figura 7) che del contenuto di ANT (figura 8).

Per quanto riguarda invece il decremento della respirazione mitocondriale dello stato 4, esso potrebbe essere dovuto ad una diminuzione della conduttanza protonica basale della membrana.

Questa ipotesi è basata sull'osservazione che la respirazione mitocondriale in assenza di sintesi di ADP (stato 4) serve solo a bilanciare il rientro passivo dei protoni attraverso la membrana mitocondriale e dà una sommaria stima della conduttanza protonica. Una misura più attendibile della conduttanza protonica si ottiene attraverso la determinazione della sua cinetica in presenza di oligomicina,

ottenuta dalla titolazione con inibitori del trasporto di elettroni [43]. Quindi per comprendere meglio le cause della diminuzione della velocità respiratoria dello stato 4 trovata nei mitocondri isolati da ratti di 180 giorni, ho ritenuto interessante determinare la cinetica della conduttanza protonica basale. I risultati ottenuti dimostrano che non ci sono variazioni della cinetica della conduttanza protonica basale nei ratti di 180 giorni rispetto ai ratti più giovani (figura 9). Per questo motivo si può concludere che la diminuzione dello stato 4 non è dovuto alla diminuzione della conduttanza protonica basale. Poichè la catena respiratoria controlla per il 20% questo stato respiratorio, la diminuzione della capacità ossidativa nello stato 4 potrebbe essere dovuto alla diminuzione della ossidazione del substrato, principalmente all'attività della citocromo ossidasi (figura 7). Infatti è stato dimostrato che nello stato 4 il controllo della respirazione da parte della catena è dovuto principalmente (ossia per l'85%) alla citocromo ossidasi [72].

In questa tesi ho ritenuto interessante analizzare ulteriormente l'efficienza mitocondriale nel fegato determinando anche la conduttanza protonica indotta dagli acidi grassi. In effetti, è stato postulato che gli acidi grassi liberi mediano il fenomeno del “leggero disaccoppiamento” attraverso il ciclo di conduzione protonica degli acidi grassi [53].

I risultati dimostrano che la conduttanza protonica indotta dagli acidi grassi è significativamente più alta nei ratti di 180 giorni (figura 10). Infatti il potenziale di membrana aumenta significativamente nei ratti di 180 giorni rispetto a quelli

di 60 giorni (figura 11). Questo aumento del disaccoppiamento indotto dagli acidi grassi, insieme all'aumento dei livelli serici di FFA trovati nei ratti di 180 giorni (figura 3), potrebbero portare ad una netta diminuzione dell'efficienza metabolica nei mitocondri di fegato di ratti adulti. Tenendo conto che i livelli serici di T3 mostrano una tendenza alla diminuzione nei ratti di 180 giorni (figura 3) e che è stato precedentemente mostrato un significativo decremento nei livelli epatici di T3 nei ratti adulti [73], si potrebbe supporre che l'aumento della conduttanza indotto dagli acidi grassi potrebbe sostituire parte della termogenesi obbligatoria epatica mediata dalla T3 che diminuisce a 180 giorni.

L'aumento della conduttanza protonica indotta dagli acidi grassi, trovato nei mitocondri di fegato dei ratti di 180 giorni, può svolgere un ruolo importante nella protezione contro la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS). È stato infatti suggerito che la lista dei meccanismi mitocondriali anti-ROS include sia un'elevata attività della citocromo ossidasi che il "leggero disaccoppiamento" dovuto agli acidi grassi [74]. In effetti, se la citocromo ossidasi è molto attiva, essa opera ad alta velocità anche a bassa $[O_2]$, perciò può effettivamente diminuire la concentrazione di ossigeno. Ciò può portare a mantenere il livello di ossigeno basso e non sufficiente per ottenere un'alta velocità di formazione di O_2^- da parte degli enzimi della catena respiratoria. D'altra parte il leggero disaccoppiamento indotto dagli acidi grassi mantiene il potenziale di membrana al di sotto del livello soglia richiesto per stimolare la produzione di O_2^- da parte del complesso I e III. Nei mitocondri di fegato, isolati dai ratti di 180 giorni, la

diminuzione dell'attività della citocromo ossidasi potrebbe aumentare la formazione dei ROS e provocare un precoce inizio dei danni ossidativi tipici dell'invecchiamento. Comunque, il leggero disaccoppiamento causato dalla conduttanza protonica indotta servirebbe a controbilanciare quest'effetto ed eviterebbe un eccesso di produzione di ROS. Inoltre, l'incremento dei livelli serici di acidi grassi trovati nei ratti di 180 giorni può amplificare l'effetto anti-ROS del leggero disaccoppiamento degli acidi grassi.

Quindi, i mitocondri di fegato isolati da ratti di 180 giorni esibiscono già danni tipici dell'invecchiamento, quali la diminuzione dell'attività della citocromo ossidasi. Questa diminuzione infatti causa una diminuzione dell'attività respiratoria mitocondriale e potrebbe inoltre portare ad un incremento nella produzione di ROS, entrambi processi tipici dell'invecchiamento. Comunque, la diminuzione dell'attività respiratoria mitocondriale, che è la prima lesione biochimica legata all'età della via di traduzione dell'energia, potrebbe essere compensata nell'intera cellula dall'aumento della massa proteica mitocondriale, come suggerito in un precedente lavoro [75]. D'altra parte, il danno dell'attività della citocromo ossidasi come un meccanismo anti-ROS è controbilanciato da un aumento di un altro meccanismo anti-ROS, come il leggero disaccoppiamento indotto dagli acidi grassi. La conferma dell'efficacia di questo meccanismo compensativo è data dal risultato preliminare relativo all'attività dell'aconitasi che non varia nei mitocondri dei ratti di 180 giorni di età indicando che non vi è

un effettivo aumento della produzione dei radicali liberi che potrebbe danneggiare l'attività di tale enzima.

Riassumendo i risultati di questa tesi riguardo al tessuto epatico, si può suggerire che i danni dell'invecchiamento hanno un precoce inizio nei ratti di 180 giorni, ma questi sono probabilmente attenuati da meccanismi compensatori, che probabilmente tendono a scomparire nei ratti più anziani.

Infine, mi sono interessata allo studio dell'effetto dell'avanzare dell'età sull'energetica mitocondriale del muscolo scheletrico per comprendere quali alterazioni potessero manifestarsi a livello muscolare con l'avanzare dell'età e se tali alterazioni fossero coinvolte nello sviluppo della resistenza all'insulina che ho riscontrato nei ratti adulti, visto che il muscolo è il principale target dell'azione dell'insulina.

Per quanto riguarda il confronto tra le due popolazioni mitocondriali, i risultati ottenuti mostrano un'attività respiratoria ridotta nei mitocondri SS rispetto a quelli IMF, in accordo con quanto riportato in letteratura [61;62;76;77;78]. Inoltre i mitocondri SS presentano una conduttanza protonica basale ridotta (figura 12) e mostrano una maggiore sensibilità all'effetto disaccoppiante degli acidi grassi (figura 13) rispetto agli IMF.

Per quanto riguarda l'effetto dell'età sui mitcondri isolati dal muscolo scheletrico, i risultati ottenuti per le respirazioni nelle due sottopopolazioni mitocondriali, con i diversi substrati, indicano che la capacità ossidativa aumenta nei ratti adulti. Infatti, lo Stato 3 aumenta significativamente nei ratti di 180 giorni rispetto ai ratti

di 60 giorni d'età. Questo incremento, nei mitocondri SS, è statisticamente significativo con tutti i substrati utilizzati (tabella 2), mentre nei mitocondri IMF è statisticamente significativo solo in presenza di glutammato (tabella 3). L'aumento generalizzato dello Stato 3 della respirazione trovato nei mitocondri SS isolati da ratti di 180 giorni suggerisce un incremento dell'attività respiratoria a valle del complesso II della catena di trasporto degli elettroni. Poiché l'attività della COX non è significativamente influenzata dall'aumentare dell'età (figura 16), probabilmente tale aumento potrebbe riguardare altri componenti del sistema dei citocromi. D'altra parte, nei mitocondri IMF, non variando la capacità respiratoria misurata con substrati FAD-dipendenti, è evidente solo una stimolazione dell'attività del complesso I della catena di trasporto degli elettroni. Appare chiaro, quindi, che non solo la capacità respiratoria ma anche i siti di regolazione differiscono tra i mitocondri SS e IMF. Infine, l'aumento generalizzato dell'RCR, nelle due sottopopolazioni mitocondriali suggerisce un miglioramento del grado di accoppiamento della fosforilazione ossidativa.

Quindi, i risultati ottenuti per le respirazioni nelle due sottopopolazioni mitocondriali isolate dal muscolo scheletrico indicano che la capacità ossidativa aumenta nei ratti adulti. Questi risultati mostrano che il muscolo scheletrico si comporta in modo differente dal fegato, in quanto a 180 giorni la capacità ossidativa è ancora pienamente funzionale. In accordo con questi risultati, ulteriori studi hanno trovato che l'attività dei complessi respiratori II, III e IV

raggiunge un massimo a circa un anno di vita e poi diminuisce con l'avanzare dell'età [79].

La determinazione del contenuto di ANT nelle due sottopopolazioni mitocondriali mi permette di escludere che il suddetto incremento nella velocità respiratoria sia dovuto all'ANT, che è stato trovato invariato o diminuito rispettivamente nei mitocondri SS ed IMF (figura 15). Il divergente effetto, all'aumentare dell'età, nella velocità respiratoria e nel contenuto di ANT non è contraddittorio, poiché è ben noto che l'ANT esercita un debole controllo sulla respirazione mitocondriale nel muscolo scheletrico [80], contrariamente a quanto avviene nel fegato. A conferma di ciò la curva di titolazione mostra che in seguito all'inibizione del 50% dell'ANT totale si osserva una diminuzione solo del 10% dello Stato 3 della respirazione (figura 15).

Per comprendere le variazioni dell'efficienza mitocondriale nei ratti nella transizione dalla fase postpuberale (60 giorni d'età) a quella adulta (180 giorni d'età), sono state analizzate sulle suddette subpopolazioni mitocondriali, le due componenti dell'efficienza mitocondriale, cioè la conduttanza basale e la sensibilità dei mitocondri all'effetto disaccoppiante degli acidi grassi, vale a dire la conduttanza indotta.

Per quanto riguarda la misura della conduttanza basale i risultati ottenuti mostrano che non ci sono variazioni della cinetica della conduttanza protonica basale nei ratti di 180 giorni rispetto a quelli di 60 giorni d'età (figura 17).

I dati relativi alla cinetica della conduttanza protonica indotta hanno mostrato che essa è significativamente diminuita nei mitocondri SS ed IMF isolati da ratti di 180 giorni rispetto a quelli isolati da ratti di 60 giorni d'età (figura 18).

I risultati riportati in questa tesi mostrano quindi un aumento dell'efficienza mitocondriale del muscolo scheletrico dei ratti di 180 giorni rispetto ai ratti di 60 giorni.

I risultati sottolineano anche che sembra non esserci relazione tra la regolazione della conduttanza protonica indotta da acidi grassi e i livelli di espressione della proteina UCP3. Infatti, come si vede dalla figura 16 il maggiore contenuto della proteina UCP3 nei mitocondri SS e IMF dei ratti di 180 giorni è in contrasto con la diminuzione della conduttanza protonica indotta, ma è compatibile con gli aumentati livelli serici di NEFA (figura 3), che svolgono un ruolo nella variazione dell'espressione dell'UCP3 [81].

L'aumento del grado di accoppiamento della fosforilazione ossidativa, riscontrato nei mitocondri IMF e SS isolati da ratti di 180 giorni, permette di ottimizzare la produzione d'ATP, che si ottiene dall'ossidazione dei substrati energetici, nel senso che è necessaria una quantità inferiore di substrato per ottenere ATP. Di conseguenza, ci sarà un ridotto utilizzo di substrati energetici nel muscolo scheletrico di ratti di 180 giorni, specialmente di acidi grassi. Ciò è in accordo con i dati (figura 3) che hanno evidenziato un aumento dei livelli serici di acidi grassi non estereficati (NEFA) nei ratti di 180 giorni rispetto a quelli di 60 giorni d'età.

Numerosi studi effettuati sull'uomo hanno focalizzato l'attenzione sul compartimento mitocondriale come un possibile sito della cellula coinvolto nella patogenesi della resistenza all'insulina [82;83]. Un'importante implicazione metabolica dell'aumentata efficienza mitocondriale potrebbe essere la riduzione dell'ossidazione degli acidi grassi, che porta a dannose conseguenze come l'accumulo intracellulare di trigliceridi e la lipotossicità. Le conseguenze suddette sono di grossa rilevanza, dal momento che una delle principali cause che portano ad insulino resistenza nel muscolo scheletrico è il deposito intramuscolare di trigliceridi [84;85]. Recentemente, infatti, è stato proposto che l'aumento dei livelli plasmatici e intracellulari di acidi grassi possa intervenire negativamente sul meccanismo di azione dell'insulina nel muscolo scheletrico. È noto che negli individui sani, l'insulina si lega al proprio recettore attivando il substrato del recettore dell'insulina, IRS-1, presente sulla cellula muscolare, che viene fosforilato su un residuo di tirosina dando inizio alla cascata di segnali che, attraverso l'attivazione della fosfoinositolo-3-chinasi, terminano col trasporto del glucosio dal plasma al muscolo mediante l'attivazione del trasportatore GLUT 4. Quando i livelli di acidi grassi sono elevati, però, si ha un aumento intracellulare di diacilglicerolo (DAG) che attiva la proteinchinasi C (PKC), la quale fosforila l'IRS-1 su serina, invece che su tirosina, impedendo la normale trasduzione del segnale dell'insulina [24].

Essendo il muscolo scheletrico il sito primario dell'azione di quest'ormone, esso sarà in parte responsabile dello sviluppo della resistenza all'insulina riscontrata nei ratti in fase adulta.

E' importante sottolineare, inoltre, che l'aumento dell'efficienza mitocondriale e la conseguente ridotta termogenesi nei ratti di 180 giorni potrebbero essere dovute allo sviluppo di una ridotta responsività dei miociti alla leptina. Infatti, altri studi hanno dimostrato che la leptina stimola direttamente la termogenesi nel muscolo scheletrico [86]. Poiché abbiamo visto che a 180 giorni i ratti mostrano una resistenza alla leptina indotta dall'età (figura 3), la resistenza alla leptina potrebbe essere una delle cause che conducono alla resistenza all'insulina [84].

Si può quindi concludere che già in età adulta sono manifeste le prime alterazioni metaboliche tipiche del processo di invecchiamento, come tendenza all'obesità, all'iperlipidemia, alla leptino-resistenza e all'insulino resistenza. Inoltre, ho evidenziato che nel fegato a 180 giorni sono già evidenti alterazioni biochimiche a livello dell'attività della citocromo ossidasi, che si riflettono sulla capacità respiratoria, e una diminuzione dell'efficienza mitocondriale, spiegabile come un meccanismo di difesa dal danno ossidativo. Nel muscolo, invece, l'aumento dell'efficienza mitocondriale, comportando un accumulo di trigliceridi a livello cellulare, potrebbe quindi essere la causa dell'insorgenza dell'insulino resistenza che si manifesta con l'avanzare dell'età.

Comprendere quali sono i meccanismi coinvolti nell'instaurarsi dell'insulino resistenza nel muscolo scheletrico, oltre che avere ulteriori informazioni riguardo

a eventuali danni ossidativi, potrebbe essere importante per capire meglio come si sviluppa il processo di invecchiamento.

BIBLIOGRAFIA CONSULTATA

- Arora S., Anubhuti . *Neuropeptides*. (2006) Dec; **40** (6): 375-401.
- Barr H.G., Mec Cracker K.J. *British J. Of Nutrition*. (1994); **51**:379-387.
- Barrè H., Bailly L., Rouanet J.L. *Comp. Biochem. Physiol.* (1987);**88B**:519-522.
- Barzilai N., Rossetti L. *Am. J. Physiol.* (1995); **269**: E591-E597.
- Brand M. D. *Biochim. Biophys. Acta*. (1990); **1018**: 128-133.
- Brand M. D., Chien L. F., Ainscow E. K., Rolfe D.F., Porter R. K. *Biochim. Biophys. Acta*. (1994); **1187**: 132-139.
- Campfield, L.A. *Front. Horm. Res.* (2000); **26**: 1-11.
- Coleman, D.L., Hummel, K.P. *Am J Physiol.* (1969); **217**:1298-1304.
- Cutler R.G., Mattson M.P. *Ageing Res. Rev.* (2006); **5**: 221-238.
- Dulloo A.G., Samec S. *Br. J. Nutr.* (2001); **86**: 123-139.
- Dulloo A.G., Stock M.J., Solinas G., Boss O., Montani J.P., Seydoux J. *FEBS Lett.* (2002); **515**:109-113.
- Folch J., Lees M., Sloane G.H. *J. biol. Chem.* (1957); **226**:497-509.
- Gardner P.R. *Meth. Enzimology*. (2002); **349**: 9-23.
- Hartree E.F. *Anal. Biochem.* (1972); **48**:422-427.
- Iossa S., Lionetti L., Mollica M.P., Barletta A., Liverini G. *Cell.Biochem. Funct.* (1998); **16**: 261-268.
- Iossa S., Lionetti L., Mollica M.P., Crescenzo R., Botta M., Liverini G. *Horm. Metab. Res.*(2001); **33**:343-347.

- Iossa S., Mollica M.P., Lionetti L., Barletta A., Liverini G. *Int. J.Obes.* (1995); **19**: 539-543.
- Kadenbach B. *Biochim Biophys Acta* (2003); **1604**:77-94.
- Lesnefsky E.J, Hoppel C.L. *Ageing Res. Rew.* (2006); **5**: 402-433.
- Li H., Matheny M., Nicolson M., Turner N., Scarpace P.J. *Diabetes.* (1997); **46**: 2035-2039.
- Liverini G., Iossa S., Barletta A. *Nutr.Res.* (1994); **11**: 1671-1682.
- Mitchell P. *J. Theor. Biol.* (1976); **62**, 327-367.
- Nedergaard J. *Eur. J. Biochem.* (1983); **133**:85-191.
- Petersen K.F., Befroy D., Dufour S., Dziura J., Ariyan C., Rothman D.L., Di Pietro L., Cline G.W., Shulman G.I. *Science.* (2003); **300**: 1140-1142.
- Petersen K.F., Dufour S., Befroy D., Garcia R., Shulman G.I. *N. Engl. J. Med.* (2004); **350**: 664-671.
- Petersen K.F., Shulman G.I. *Am. J. Med.*(2006); **119**: S10- S16.
- Picard F., Guarente L. *Int. J.Obes.*(2005); **29**: S36-S39.
- Rolfe D.F., Brand M.D. *Am. J. Physiol.* (1996); **271**: C1380-C1389.
- Rolfe D.F., Brown G.C. *Physiol. Rev.* (1997); **77**: 731-758.
- Samaras T.T., Storms L.H, Elrick H. *Ageing Res. Rev.*(2002); **1**: 673-691.
- Schagger H., de Coo R., Bauer M.F., Hofmann S., Godinot G., Brandt U. *J. Biol. Chem.* (2004); **279**: 36349-36353.
- Skulachev V.P. *Biochim. Biophys Acta.* (1998); **1363**: 100-124.
- Stannard S.R., Johnson N.A. *J. Physiol.* (2003); **554**: 595-607.

Stuart J.A., Harper J.A., Brindle K.M., Brand M.D. *Biochim. Biophys. Acta.* (1999); **1413**: 50-54.

Trayhurn P. Hoggard N., Mercer J.G., Rayner D.V. *Int. J.Obes.* (1999); **23**:22-28.

Weiss R., Dufour S., Taksali S.E., Tamborlane W.V., Petersen K.F., Bonadonna R.C., Boselli L., Babetta G., Allen K., Rife F., Savoye M., Dziura J., Sherwin R., Shulman G.I., Caprio S. *Lancet.* (2003); **362**: 951-957.

BIBLIOGRAFIA CITATA

1. Arora S., Anubhuti. *Neuropeptides*. (2006) Dec; **40** (6): 375-401.
2. Samaras T.T., Storms L.H, Elrick H. *Ageing Res. Rev.*(2002); **1**: 673-691.
3. Liverini G., Iossa S., Barletta A. *Nutr.Res.* (1994); **11**: 1671-1682.
4. Iossa S., Mollica M.P., Lionetti L., Barletta A., Liverini G. *Int. J.Obes.* (1995); **19**: 539-543.
5. Newby F.D., Di Girolamo M., Cotsonis G.A., Kutner M.H. *Am. J. Physiol.* (1990); **259**: 1117-1125.
6. Cutler R.G., Mattson M.P. *Ageing Res. Rev.* (2006); **5**: 221-238.
7. Rothwell N.J., Stock M.J. *J Physiol.* (1982); **382**: 371-377.
8. Barzilai N., Rossetti L. *Am. J. Physiol.* (1995); **269**: E591-E597.
9. Masoro E. J.: *Exp. Aging Res.* (1980); **6**: 261-270.
10. Toth M.J., Tchernof A. *Eur. J. Clin. Nutr.* (2000); **54** (Suppl 3): S121-S125.
11. Picard F., Guarente L. *Int. J.Obes.*(2005); **29**: S36-S39.
12. Weindruch R., Sohal R.S. *N. Engl. J. Med.* (1997); **337**: 986-994.
13. Kennedy, G. *Royal Society of London Biological Sciences.* (1953); **256**:579-600.
14. Coleman, D.L., Hummel, K.P. *Am J Physiol.* (1969); **217**:1298-1304.
15. Campfield, L.A. *Front. Horm. Res.* (2000); **26**: 1-11.
16. Trayhurn P. Hoggard N., Mercer J.G., Rayner D.V. *Int. J.Obes.* (1999); **23**:22-28.

17. Tartaglia L. *Cell.* (1995); **83**:1263-1271.
18. Lee G.H., Proenca R. et al. *Nature.* (1996); **379**: 632-635.
19. Tartaglia L. et al. *J. Biol. Chem.*(1997);**272**:16216-16223.
20. Mercer J.G. et. al. *FEBS Let.* (1996);**387**:113-116.
21. Stephens T.W., Basinski M., Bristow P.K. et al. *Nature.* (1995); **377**:530-532.
22. Morton N.M., et al. *J. Biol. Chem.* (1998); **273**: 26194-26201.
23. Campfield L.A., Smith F.J.*Proc. Nutr. Soc.*(1998);**57**:429-440.
24. Petersen K.F., Shulman G.I. *Am. J. Med.*(2006); **119**: S10- S16.
25. Okada T., Kawano Y., Sakakibara T., et al. *J. Biol. Chem.*(1994); **269**: 3568-3573.
26. Dresner A., Laurent D., Marcucci M., et al. *J. Clin. Invest.* (1999); **103**: 253-259.
27. Griffin M.E., Marcucci M., Cline G.W., et al. *Diabetes.* (1994); **48**: 1270-1274.
28. Kahn C.R. *Diabetes.* (1994); **43**: 1066-1084.
29. Reaven G.M. *Diabetes* (1988); **37**:1595-1607.
30. Stern M.P. *Diabetes.* (1995); **44**: 369-375.
31. Lesnefsky E.J, Hoppel C.L. *Ageing Res. Rew.* (2006); **5**: 402-433.
32. Frerman F.E. *Biochim. Biophys. Acta.* (1987); **893**: 161-169.
33. Schulte U.J. *Bioenerg. Biomembr.* (2001); **33**: 205-212.

34. Schagger H., de Coo R., Bauer M.F., Hofmann S., Godinot G., Brandt U.
J. Biol. Chem. (2004); **279**: 36349-36353.
35. Mitchell P. *J. Theor. Biol.* (1976); **62**, 327-367.
36. Carbajo R.J., Kellas F.A., Runswick M.J., Montgomery M.G., Walzer J.E.,
Neuhaus D. *J. Mol. Biol.* (2005); **351**: 824-838.
37. Kadenbach B. *Biochim Biophys Acta* (2003); **1604**:77-94.
38. Stucki J. W. *Eur.J.Biochem.* (1980);**109**:269-283.
39. Rolfe D.F., Brown G.C. *Physiol. Rev.* (1997); **77**: 731-758.
40. Skulachev V. P. *FEBS Lett.* (1991); **294**: 158-162
41. Jezek P., Engstova H., Zackova M., Vercesi A. E., Costa A.D., Arruda P.,
Garlid K. D. *Biochim. Biophys. Acta.* (1998); **1365**: 319-327.
42. Soboll S., Grundel S., Schwabe U., Scholtz R. *Eur J Biochem.* (1984);
141: 231-236.
43. Brand M. D. *Biochim. Biophys. Acta.* (1990); **1018**: 128-133.
44. Brand M. D., Chien L. F., Ainscow E. K., Rolfe D.F., Porter R. K.
Biochim. Biophys. Acta. (1994); **1187**: 132-139.
45. Rolfe D.F., Brand M.D. *Am. J. Physiol.* (1996); **271**: C1380-C1389.
46. Stuart J.A., Harper J.A., Brindle K.M., Brand M.D. *Biochim. Biophys.*
Acta. (1999); **1413**: 50-54.
47. Wojtczak L. *J. Bioenerg. Biomembr.* (1976); **8**: 293-311.
48. Wojtczak L. , Schönfeld P. *Biochim. Biophys. Acta.* (1993); **1183**: 41-57.

49. Hulsmann W.C., Elliot W.B., Slater E.C. *Biochim. Biophys. Acta.* (1960); **39**: 267-276.
50. Zborowski J., Wojtczak L. *Biochim. Biophys. Acta.* (1963); **70**: 596-598.
51. Wrigglesworth J.M., Sharpe M.A., Cooper C.E. *Biochem. Soc. Trans.* (1993); **21**: 781-784.
52. Dedukhova V.I., Mokhova E.N., Skulachev V.P., Starkov A.A., Arigoni-Martelli E., Bobyleva V.A. *FEBS Lett.* (1991); **295**: 51-54.
53. Schönfeld P. *FEBS Lett.* (1990); **264**: 246-248.
54. Schönfeld P. , Bohnensack R. *FEBS Lett.* (1997); **420**: 167-170.
55. Polčic P., Šabová L., Kolarov J. *FEBS Lett.* (1997); **412**: 207-210.
56. Skulachev V.P. *Biochim. Biophys Acta.* (1998); **1363**: 100-124.
57. Gellerich F.N., Bohnensack R., Kunz W. *Biochim. Biophys Acta.* (1983); **722**, 381-391.
58. Robinson N.C., Strey F., Talbert L. *Biochemistry* (1980); **19**: 3656-3661.
59. Davies S.M., Poljak A., Duncan M.W., Smythe G.A., Murphy M.P. *Free Radic. Biol. Med.*(2001); **31**: 181-190.
60. Freake H.C., Oppenheimer J.H. *Annu. Rev. Nutr.* (1995); **15**: 263-291.
61. Krieger D.A., Tade C.A., McMillin-Wood J., Booth F.W. *J. Appl. Physiol*, (1980); **48**: 23-28.
62. Cogswell A.M., Stevens R.J., Hood D.A. *Am. J. Physiol.* (1993); **264**: C383-C389.

63. Palmer J.W., Tandler B., Hoppel C.L. *J. Biol. Chem.*, (1997) **252**, 8731-8739.
64. Muller W. *Cell. Tissue Res.* (1976); **174**: 367-389.
65. Folch J., Lees M., Sloane G.H. *J. biol. Chem.* (1957); **226**:497-509.
66. Barr H.G., Mec Cracker K.J. *British J. Of Nutrition.* (1994); **51**:379-387.
67. Hartree E.F. *Anal. Biochem.* (1972); **48**:422-427.
68. Nedergaard J. *Eur. J. Biochem.* (1983); **133**:85-191.
69. Barrè H., Bailly L., Rouanet J.L. *Comp. Biochem. Physiol.* (1987); **88B**:519-522.
70. Li H., Matheny M., Nicolson M., Turner N., Scarpace P.J. *Diabetes.* (1997); **46**: 2035-2039.
71. Qian H., Azain M.J., Hartzell D.L., Baile C.A. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* (1998); **219**:160-165.
72. Ainskow E.W. *Eur. J. Biochem.* (1995) ; **231**: 579-586.
73. Iossa S., Lionetti L., Mollica M.P., Crescenzo R., Botta M., Liverini G. *Horm. Metab. Res.* (2001); **33**:343-347.
74. Gardner P.R. *Meth. Enzimology.* (2002); **349**: 9-23.
75. Iossa S., Lionetti L., Mollica M.P., Barletta A., Liverini G. *Cell. Biochem. Funct.* (1998); **16**: 261-268.
76. Bizeau M.E., Willis W.T., Hazel J.R. *J. Appl. Physiol.* (1998); **85**: 1279-1284.

77. Yajid F., Mercier J.G., Mercier B.M., Dubouchaud H., Prefaut C. *J. Appl. Physiol.* (1998); **84**: 479-485.
78. Lombardi A., Damon M., Vincent A., Goglia F., Herpin P. *FEBS Lett.* (2000); **475**: 84-88.
79. Kwong L.K., Sohal R.S. *Arch. Biochem. Biophys.* (2000); **373**: 16-22.
80. Rossignol L., Letellier T., Malgat M., Rocher C., Mazat J.P. *Biochem J.* (2000); **374**: 45-53.
81. Dulloo A.G., Samec S. *Br. J. Nutr.* (2001); **86**: 123-139.
82. Petersen K.F., Befroy D., Dufour S., Dziura J., Ariyan C., Rothman D.L., Di Pietro L., Cline G.W., Shulman G.I. *Science.* (2003); **300**: 1140-1142.
83. Petersen K.F., Dufour S., Befroy D., Garcia R., Shulman G.I. *N. Engl. J. Med.* (2004); **350**: 664-671.
84. Stannard S.R., Johnson N.A. *J. Physiol.* (2003); **554**: 595-607.
85. Weiss R., Dufour S., Taksali S.E., Tamborlane W.V., Petersen K.F., Bonadonna R.C., Boselli L., Babetta G., Allen K., Rife F., Savoye M., Dziura J., Sherwin R., Shulman G.I., Caprio S. *Lancet.* (2003); **362**: 951-957.
86. Dulloo A.G., Stock M.J., Solinas G., Boss O., Montani J.P., Seydoux J. *FEBS Lett.* (2002); **515**: 109-113.