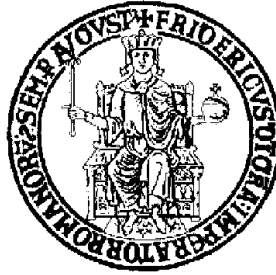


**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI
"FEDERICO II"**

*TESI DI DOTTORATO DI RICERCA IN
BIOLOGIA APPLICATA
XXII CICLO*



*“Disfunzione del compartimento mitocondriale in un
modello sperimentale di obesità e insulino-resistenza”*

Coordinatore
Ch.mo Prof.
EZIO RICCA

Candidata
Dott.ssa
ITALIA FALCONE

Docente Tutore
Ch.ma Prof.ssa
GIOVANNA LIVERINI

INDICE

INTRODUZIONE	1
<i>L'insulina</i>	8
<i>Resistenza all'insulina</i>	16
<i>Steatosi epatica</i>	18
<i>Diete iperlipidiche</i>	21
<i>Acidi grassi</i>	26
<i>Bilancio energetico</i>	31
<i>Mitocondri</i>	35
<i>Efficienza mitocondriale</i>	41
<i>Radicali liberi</i>	49
SCOPO DELLA TESI	54
PARTE SPERIMENTALE	65
<i>I° Disegno sperimentale</i>	66
<i>II° Disegno sperimentale</i>	69
<i>III° Disegno sperimentale</i>	71
<i>Misure del contenuto energetico della carcassa</i>	74
<i>Misura della composizione corporea</i>	76
<i>Misura del contenuto lipidico del fegato</i>	78
<i>Misura del bilancio energetico</i>	79
<i>Determinazione dei livelli plasmatici di NEFA, glucosio e insulina</i> ..	82
<i>Test di tolleranza al glucosio</i>	83

<i>Isolamento delle frazioni mitocondriali del muscolo scheletrico</i>	84
<i>Isolamento dei mitocondri epatici</i>	85
<i>Determinazione del contenuto proteico mitocondriale</i>	89
<i>Misura dell'attività respiratoria sui mitocondri isolati</i>	90
<i>Misura del potenziale di membrana</i>	92
<i>Misura della conduttanza protonica basale</i>	94
<i>Misura della conduttanza protonica indotta dagli acidi grassi</i>	96
<i>Determinazione dell'attività dell'aconitasi mitocondriale</i>	97
<i>Determinazione dell'attività della superossido dismutasi</i>	100
<i>Perossidazione lipidica</i>	102
<i>Determinazione della massa proteica mitocondriale</i>	104
<i>Analisi statistiche</i>	105
RISULTATI	106
<i>Risultati I° Disegno sperimentale</i>	107
<i>Risultati II° Disegno sperimentale</i>	117
<i>Risultati III° Disegno sperimentale</i>	129
DISCUSSIONE	141
<i>Discussione I° Disegno sperimentale</i>	142
<i>Discussione II° Disegno sperimentale</i>	147
<i>Discussione III° Disegno sperimentale</i>	155
BIBLIOGRAFIA CITATA	163

BIBLIOGRAFIA CONSULTATA 173

INTRODUZIONE

Gli ultimi decenni sono stati per il mondo occidentale anni di sviluppo economico, tecnologico e sociale. Il crescente benessere cui sono andate incontro le popolazioni dei cosiddetti “paesi ricchi” e le nuove scoperte in ambito scientifico hanno determinato l’istaurarsi di migliori prospettive e condizioni di vita. L’età media è aumentata notevolmente rispetto al solo secolo scorso e gravi patologie, un tempo considerate incurabili, sono state debellate. In apparente contraddizione, il benessere, però, ha determinato un’epidemia di obesità con gravi patologie associate. Sembra che una grande disponibilità di cibo ad alto contenuto calorico lipidico e generalmente molto palatabile per tutte le classi sociali e uno stile di vita sempre più sedentario hanno portato ad un notevole aumento di soggetti sia in soprappeso sia obesi. Infatti, si calcola che attualmente in molti paesi del mondo occidentale il 65% degli adulti sia in soprappeso con un indice di massa corporea (BMI) $> 25 \text{ kg/m}^2$, e il 30% sono obesi BMI $> 30 \text{ kg/m}^2$.

L’obesità, oltre ad essere generalmente un evidente problema estetico, è soprattutto una patologia complessa ad eziologia multifattoriale, caratterizzata da un aumento del peso corporeo a causa di un aumento della percentuale di massa grassa nell’organismo. Rappresenta di sicuro il disordine nutrizionale più comune, e a differenza di quanto si

potrebbe pensare, non caratterizza più soltanto i paesi industrializzati ma anche quelli in via di sviluppo, nel momento in cui acquisiscono lo stile di vita del mondo occidentale, tanto che l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) la definisce "pandemia".

L'obesità nasce dalla combinazione variabile di due componenti:

1. la componente genetica (ovvero la predisposizione genetica di un soggetto a diventare obeso);
2. la componente ambientale (ovvero l'utilizzo di cibi altamente energetici, comportamenti sedentari).

Si ritiene che la componente genetica incida per il 30-40% e che la componente ambientale/comportamentale per il restante 60-70% [Bouchard C. (1994)]. Dal momento che all'obesità sono associate gravi malattie a larga diffusione quali la resistenza all'insulina, il diabete mellito non insulino dipendente, l'ipertensione, l'ipercolesterolemia, l'aterosclerosi, le malattie dell'apparato cardio-circolatorio, è di grande attualità per la ricerca individuare le cause che sono alla base di tale patologia. Infatti per la formulazione di nuove terapie in grado di contrastare lo sviluppo dell'obesità è necessario comprendere quali sono i meccanismi sia genetici sia fisiologici che vi sono alla base.

Una delle patologie maggiormente collegate all'obesità è sicuramente l'insulino-resistenza rappresentata da una ridotta risposta dei tessuti periferici (fegato, muscolo scheletrico, tessuto adiposo) all'azione dell'insulina. Tale situazione determina una minore captazione del glucosio da parte di questi organi e tessuti e la conseguente iperglicemia postprandiale protratta nel tempo che, alla lunga, può dare origine al diabete. Per poter comprendere quelli che sono i meccanismi alla base dell'obesità e correlata insulino-resistenza un buon modello animale è rappresentato dal ratto, in quanto per questi animali l'avanzare dell'età è associata all'obesità e resistenza all'insulina, così come negli uomini. In più ratti alimentati "ad libitum" e con una limitata attività fisica, dovuta alle condizioni normali di stabulazione, sono un ottimo modello animale per simulare lo stile di vita del mondo occidentale (sedentarietà e iperalimentazione). Gli animali, infatti, possono essere alimentati "ad libitum" con diete ad alto contenuto di grassi, simili a quelle utilizzate normalmente nel mondo occidentale e molti studi riportano che, alimentando ratti adulti con una dieta ad alto contenuto lipidico e calorico, questi diventano obesi, resistenti all'insulina e presentano danni al metabolismo del glucosio [Han D. & coll. (1997); Bernstein RS. & coll. (1977); Kraegen EW. & coll. (1991); Kelley DE. & coll.

(1996); Furler SM. & coll. (1997); Ikemoto S. & coll. (1995)]. Diversi studi hanno anche sottolineato l'importanza della lunghezza del trattamento dietetico con diete ad alto contenuto di grassi nello sviluppo della resistenza all'insulina nei ratti. Sembra che un trattamento acuto non sia in grado di provocare insulino-resistenza [Iossa S. & coll. (2003)], mentre un trattamento cronico può associare all'obesità una diminuita sensibilità degli organi bersaglio all'insulina [Brown JL. & coll. (2002); Woods SC. & coll. (2003)].

Nel corretto mantenimento dell'omeostasi del glucosio giocano un ruolo chiave, sia il muscolo scheletrico sia il fegato. Certamente, per quanto riguarda il muscolo scheletrico, essendo esso il sito primario di azione dell'insulina [Stannard SR. & Johnson NA. (2003)], un suo coinvolgimento nei soggetti obesi nello sviluppo dell'insulino-resistenza corporea è facilmente prevedibile.

Per quanto riguarda il fegato, tenendo presente il ruolo svolto da questo organo nel mantenimento del metabolismo corporeo alterazioni della sua funzionalità potrebbero influenzare non solo l'omeostasi del glucosio ma lo stato di salute dell'intero organismo. Una delle complicanze epatiche, correlate con l'obesità indotta dalla dieta è la steatosi epatica [Carmiel-Haggai MM. & coll. (2004)]. Essa è rappresentata da un'eccessiva presenza di trigliceridi depositati nel

fegato che, al lungo andare, potrebbero dare origine a patologie più gravi come le epatopatie non alcoliche e la cirrosi epatica, che possono poi compromettere il ruolo svolto dal fegato nel funzionamento dell'organismo.

Un'ipotesi emergente è che disfunzioni del compartimento mitocondriale negli organi suddetti siano associate allo sviluppo dell'obesità e patologie correlate, soprattutto resistenza all'insulina e diabete di tipo 2 [Petersen & coll.(2004); Ritov & coll. (2005)]. Questa ipotesi è molto plausibile poiché il controllo della respirazione mitocondriale e della fosforilazione ossidativa è fondamentale per il mantenimento dell'omeostasi cellulare. I mitocondri, infatti, rappresentano il principale sito dei processi ossidativi e cambiamenti nell'attività metabolica cellulare potrebbero risultare da cambiamenti dell'attività respiratoria mitocondriale. Inoltre, i mitocondri rappresentano il maggior sito cellulare coinvolto nel metabolismo degli acidi grassi e la sorgente maggiore di specie reattive dell'ossigeno (ROS), essi potrebbero, quindi, anche giocare un ruolo chiave nel deposito ectopico di grassi e nelle loro relative complicazioni.

Partendo dunque da queste considerazioni, ho ritenuto interessante analizzare la funzionalità dei mitocondri del muscolo scheletrico e del

fegato in ratti resi obesi e insulino-resistenti, mediante somministrazione cronica di una dieta iperlipidica.

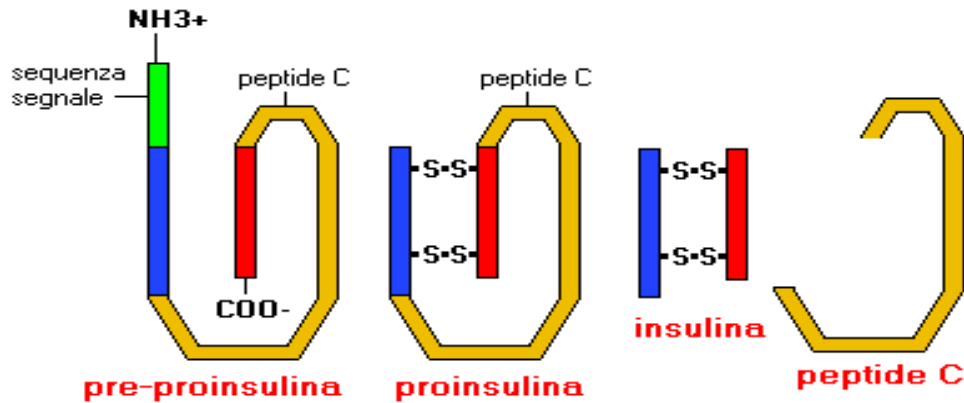
Prima, però, di addentrarmi nella problematica sperimentale, credo sia opportuna una breve descrizione del contesto in cui si andrà ad operare.

L'INSULINA

L'insulina è un ormone di natura proteica costituito da 51 aa che viene sintetizzato dal pancreas endocrino nelle cellule β delle *Isole di Langerhans*. È costituito da due catene polipeptidiche, chiamate α (21 aa) e β (30 aa), unite fra di loro da due ponti disolfuro che si trovano fra le due cisteine in posizione 7 e 19.

Viene prodotta sottoforma di precursore inattivo a singola catena definito *preproinsulina* il quale possiede una sequenza segnale ammino-terminale. Ad opera di un enzima proteolitico si ottiene il distacco della sequenza segnale e la formazione di tre ponti disolfuro con la conseguente trasformazione in *proinsulina* che viene conservata nei granuli di secrezione delle cellule β . All'interno di tali granuli, prima che il processo di secrezione avvenga, si attua ad opera di una endopeptidasi il distacco del *peptide C* dalla proinsulina e si ottiene la molecola di ormone finale costituita dalle catene α e β tenute insieme dai due ponti disolfuro. Un terzo ponte è localizzato invece all'interno della catena α (Fig. 1)

FIGURA 1. *Struttura dell'insulina*



L'insulina è da sempre considerata l'ormone "dell'abbondanza", in quanto è rilasciata in circolo proprio quando l'organismo si trova in una condizione di surplus di substrati (ad esempio dopo un pasto) e la sua funzione è proprio quella di permettere il deposito dei substrati in eccesso.

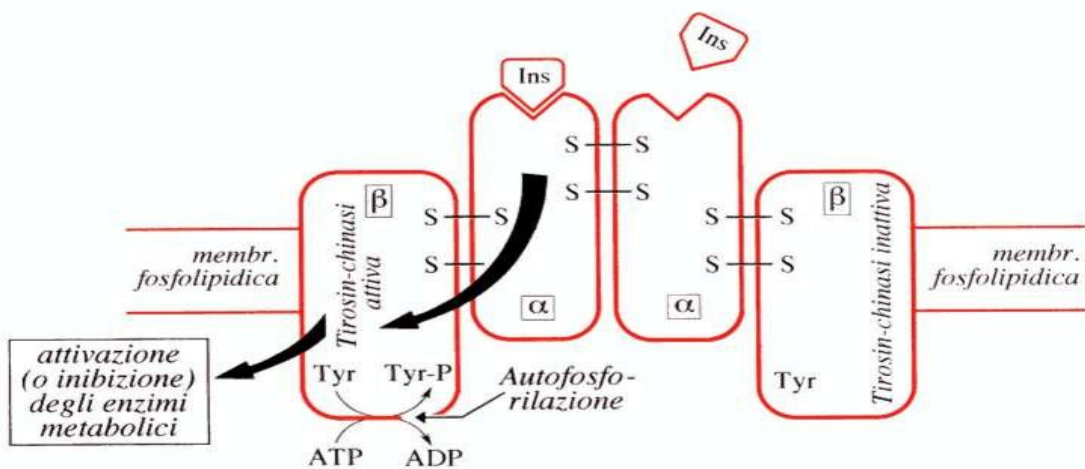
Le cellule β del pancreas sono stimulate al rilascio dell'insulina quando si verifica l'aumento della concentrazione di glucosio nel sangue; l'ormone attraverso il circolo sanguigno arriva a livello delle sue cellule bersaglio ovvero epatociti, miociti ed adipociti e qui interagisce con il proprio recettore.

Il recettore dell'insulina è una glicoproteina costituita da due subunità α extracellulari che legano l'ormone e da due subunità β che invece attraversano la membrana e possiedono attività tirosina chinasi.

Dopo il legame con l'insulina, probabilmente a seguito di un cambiamento conformazionale fra le unità α e β , si determina un processo di trans/auto-fosforilazione su alcuni residui di tirosina localizzati sul lato citoplasmatico delle due subunità β .

A seguito di questa attivazione vengono creati siti di legame per proteine che si associano al dominio citosolico e si ha la fosforilazione di molti substrati intracellulari attraverso una serie di reazioni a catena la cui sequenza è la seguente: IRS-1 (substrato recettore insulinico-1), PI3-Kinasi (fosfatidilinositolo-3-chinasi), PIP2 (fosfatidilinositolo di fosfato), PIP3 (fosfatidilinositolo trifosfato), PKB (proteina chinasi B), PKC (proteina chinasi C).

FIGURA 2. Recettore dell'insulina



Come detto precedentemente, gli organi periferici insulino-dipendenti sono tre:

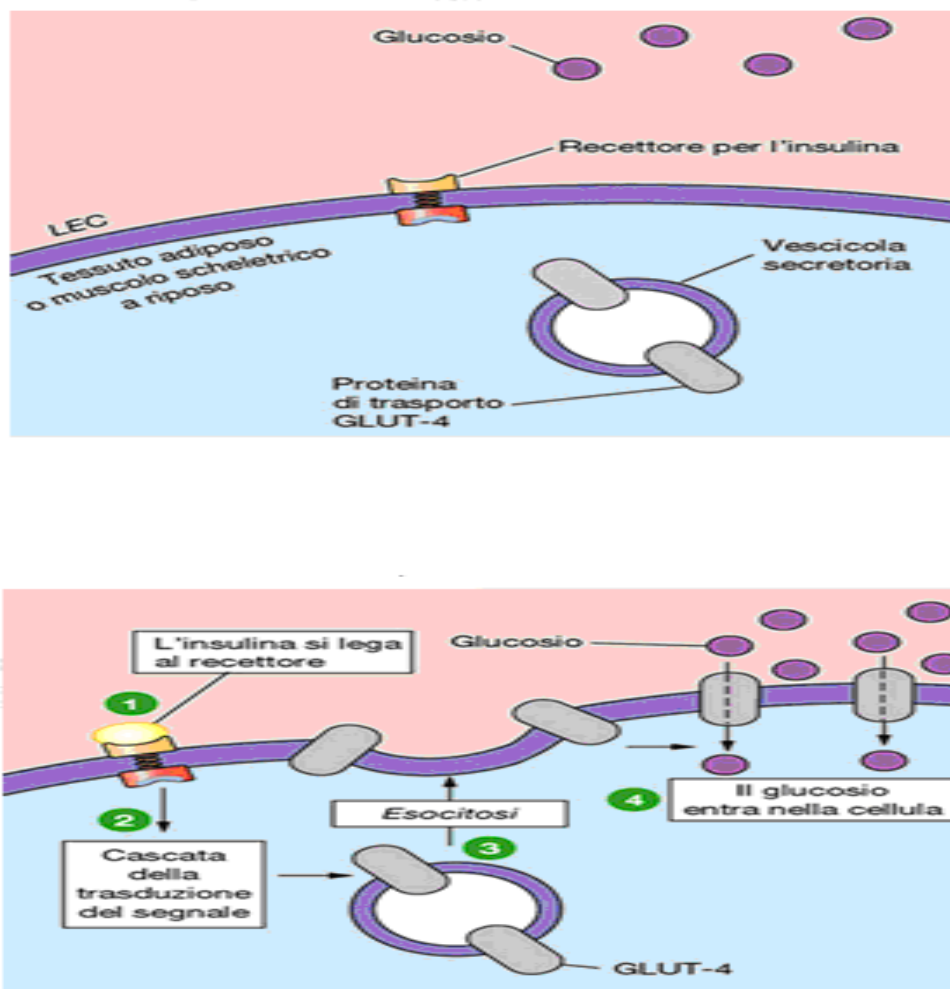
- il tessuto muscolare;
- il tessuto adiposo;
- il fegato.

L'azione dell'insulina a livello del tessuto muscolare e del tessuto adiposo è quella di aumentare il numero dei trasportatori del glucosio (GLUT 4) a livello della membrana plasmatica, con conseguente aumento della velocità del trasporto del glucosio. Nel muscolo questo substrato energetico è depositato sottoforma di glicogeno che rappresenta un importante deposito da cui attingere nei periodi di digiuno mentre nel tessuto adiposo, in cui non sono presenti depositi di glicogeno, è trasformato in glicerolo fosfato che servirà, poi, principalmente per la sintesi dei trigliceridi.

Quindi il legame dell'insulina con il suo recettore, tramite la fosforilazione di diversi substrati intracellulari, stimola il trasferimento dei trasportatori del glucosio GLUT 4 dal citoplasma alla membrana cellulare, in modo da incentivare il trasporto dello zucchero. In assenza di insulina i trasportatori GLUT 4 di tali tessuti sono rimossi dalla membrana cellulare ed immagazzinati in vescicole citoplasmatiche. Quando, invece, il recettore è attivato dal legame con

l'insulina la cascata di fosforilazioni intracellulari promuove lo spostamento delle vescicole verso la membrana cellulare e l'inserimento in essa dei trasportatori per esocitosi.

FIGURA 3. Azione dell'insulina sui trasportatori del glucosio GLUT 4 nel muscolo scheletrico e nel tessuto adiposo



In più, sempre a livello muscolare, l'insulina regola l'attività di alcuni enzimi coinvolti nel metabolismo del glucosio e nella sintesi del glicogeno e stimola l'assorbimento cellulare di amminoacidi e la sintesi proteica.

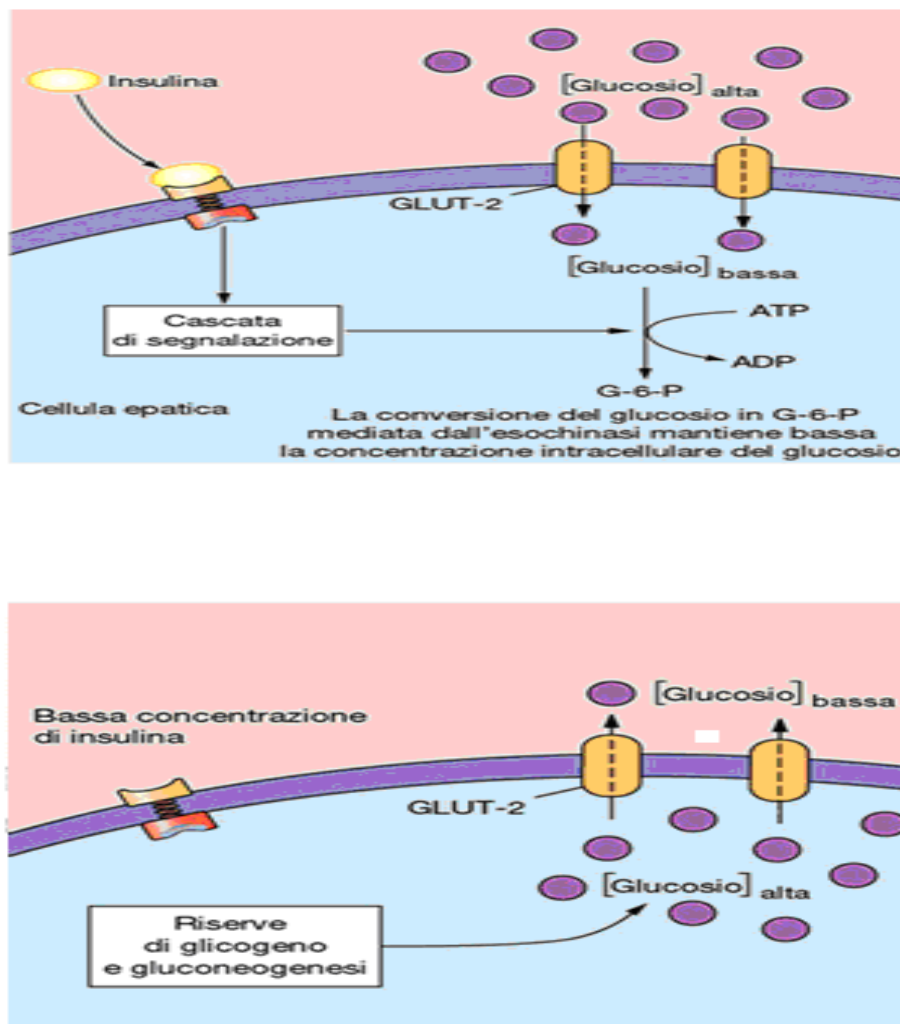
A differenza di quanto avviene nel muscolo e nel tessuto adiposo, a livello delle cellule epatiche il trasporto del glucosio non è direttamente insulino-dipendente, in quanto a livello di queste cellule entra in gioco un'altra classe di trasportatori per il glucosio definiti GLUT 2. Il numero di questi trasportatori è sempre costante nella membrana plasmatica, quindi l'insulina non porta nessun messaggio che regoli il loro numero a livello della membrana. La loro caratteristica è quella di essere dei trasportatori a bassa affinità per cui la velocità del trasporto è direttamente proporzionale alla concentrazione del glucosio nel sangue. Durante la fase post-prandiale (cioè quella che segue un pasto), quando le concentrazioni di glucosio sono elevate a livello ematico, la velocità del trasporto sarà elevata; invece durante la fase post-assorbitiva (cioè quella che segue l'assorbimento cellulare dei nutrienti), quando la concentrazione del glucosio è bassa, non vi è ingresso dello zucchero negli epatociti. Perciò l'azione dell'insulina a livello epatico non interessa il trasportatore, ma riguarda essenzialmente l'attivazione e l'inibizione

di un certo numero di enzimi la cui attività è necessaria per mantenere un gradiente favorevole all'ingresso di glucosio. Quando l'insulina si lega al suo recettore stimola la glucochinasi e la esochinasi epatiche che catalizzano la trasformazione del glucosio in glucosio-6-fosfato, impedendo, così che il glucosio possa fuoriuscire dagli epatociti. Inoltre, promuove il deposito dello zucchero sotto forma di glicogeno attivando rapidamente il complesso enzimatico glicogeno-sintetasi e stimola la trasformazione del glucosio in piruvato e lattato (glicolisi). In questo modo le concentrazioni intracellulari di glucosio rimangono costantemente più basse rispetto a quelle del sangue, così che questo substrato energetico possa continuamente diffondere negli epatociti tramite il trasportatore GLUT 2. Contemporaneamente, l'insulina riduce l'immissione in circolo di glucosio inibendo la glicogenolisi.

Durante lo stato post-assorbitivo, invece, quando i livelli plasmatici di insulina sono bassi, mentre sono elevati quelli degli ormoni controregolatori, il glucosio fuoriesce dagli epatociti e si riversa nel sangue contribuendo a mantenere la propria omeostasi. In questa fase, gli epatociti convertono i depositi di glicogeno e gli aminoacidi gluconeogenetici in glucosio che si sposta secondo il proprio gradiente di concentrazione verso l'esterno della cellula utilizzando sempre i GLUT 2, ma nella direzione contraria.

Inoltre, a livello epatico, l'insulina blocca la lipolisi mentre promuove la lipogenesi, ovvero la sintesi di acidi grassi, che poi vengono assemblati nelle VLDL (lipoproteine a bassissima densità) rilasciate nel sangue.

FIGURA 4. Azione dell'insulina sul fegato



RESISTENZA ALL'INSULINA

Il termine insulino-resistenza è usato per indicare una situazione in cui, per mantenere l'omeostasi dei livelli di glucosio nel sangue, è necessaria una maggiore concentrazione dei livelli plasmatici di insulina. Tale alterazione della regolazione omeostatica è dovuta ad una diminuita sensibilità degli organi bersaglio dell'insulina, infatti l'insulino-resistenza è caratterizzata da una costante iperinsulinemia che può, a sua volta, portare ad una diminuzione delle vie stimulate dall'insulina negli organi bersaglio dell'ormone.

La misurazione del grado di insulino-resistenza può essere fatta, soprattutto nell'uomo, con il metodo HOMA (Homeostasis Model Assesment) che è un indice derivato di insulino-resistenza. Infatti, l'indice HOMA è una particolare trattazione matematica, che ci permette di valutare eventuali cambiamenti della sensibilità all'insulina in funzione dei livelli circolanti a digiuno di glucosio e dell'ormone. La base fisiologica dell'indice HOMA risiede nelle interazioni tra i livelli plasmatici di glucosio e i relativi livelli plasmatici di insulina. Nello stato basale (fase post-assorbitiva), la concentrazione nel sangue di glucosio è regolata sia dal glucosio rilasciato dal fegato, che è insulino-dipendente, sia dalla

concentrazione circolante di insulina, che è dipendente dalla risposta delle cellule β del pancreas allo zucchero. Il modello matematico calcola queste interazioni in modo che può essere determinata l'insulino-resistenza tenendo conto delle concentrazioni plasmatiche di insulina e glucosio, utilizzando la seguente formula:

$$\mathbf{HOMA} = \text{insulinemia (mU/L)} \times \text{glicemia (mg/dL)} / 405$$

Alternativamente, soprattutto nel modello animale, la condizione di insulino-resistenza può essere vagliata determinando la dinamica dell'omeostasi glucidica misurando i valori della glicemia e dei livelli plasmatici di insulina dopo un carico di glucosio (test di tolleranza al glucosio).

STEATOSI EPATICA

La steatosi epatica è una delle patologie croniche del fegato più diffuse nei paesi occidentali ed è considerata la manifestazione epatica della sindrome metabolica e della resistenza all'insulina [Musso G. & coll. (2003); Musso G. & coll. (2008)]. Essa è caratterizzata da un accumulo eccessivo di grasso, soprattutto trigliceridi, nelle cellule epatiche, in quanto si instaura uno squilibrio fra l'arrivo di lipidi al fegato (grassi provenienti dalla circolazione sanguigna e lipogenesi de novo) e il loro smaltimento (ossidazione degli acidi grassi e produzione di VLDL). La steatosi, in una percentuale variabile, può evolvere verso processi infiammatori e necrotici con eventuale fibrosi progressiva del fegato. Tale accumulo lipidico rappresenta, con il passare del tempo, anche una condizione favorevole per lo sviluppo di patologie del fegato più gravi, come la cirrosi nel 25% dei pazienti [Farrell GC. & coll. (2006)].

In condizioni non patologiche, le maggiori fonti di lipidi per il fegato sono quelli immagazzinati nel tessuto adiposo che arrivano all'organo sottoforma di NEFA, gli acidi grassi introdotti con la dieta, che arrivano al fegato con i residui chilomicronici, e quelli di nuova sintesi prodotti dal fegato mediante la lipogenesi de novo. Gli acidi grassi che arrivano al fegato possono essere o degradati, principalmente nella β -

ossidazione mitocondriale, o esterificati. Dopo la fase di esterificazione, i trigliceridi possono o essere depositati nell'organo sottoforma di goccioline lipidiche o secreti nel sangue come VLDL. Un accumulo eccessivo di grasso nel fegato (steatosi epatica) si instaura quando la velocità di ingresso o di sintesi degli acidi grassi non è compensata da un aumento della loro ossidazione o da una maggiore esportazione di quest'ultimi in circolo sottoforma di VLDL. Studi condotti sia sugli uomini sia sui roditori hanno dimostrato che, i meccanismi che portano ad un eccessivo accumulo epatico di trigliceridi, sono soprattutto legati ad un maggiore afflusso di NEFA dal tessuto adiposo espanso e da quelli sintetizzati dallo stesso fegato mediante la lipogenesi de novo [Lewis GF. & coll. (2002)]. Ulteriori ricerche hanno dimostrato che in soggetti colpiti da steatosi epatica, l'insulina non è in grado di sopprimere il processo lipolitico nel tessuto adiposo, così come in soggetti sani [Lewis GF. & coll. (2002)]. Infatti, in condizioni di insulino-resistenza, l'insulina non inibisce in modo adeguato la lipasi ormone sensibile e la lipolisi nel tessuto adiposo non è soppressa. Ciò determina l'arrivo al fegato di maggiori quantità di NEFA che si aggiungono ai grassi provenienti dalla dieta. In più la combinazione di elevate concentrazioni ematiche di glucosio (iperglicemia) e di elevate concentrazioni di insulina (iperinsulinemia)

promuove la sintesi di nuovi grassi mediante la lipogenesi de novo e pregiudica la β -ossidazione.

I soggetti che presentano la steatosi epatica sono altamente insulino-resistenti a livello:

1. del muscolo scheletrico perché esibiscono un ridotto assorbimento del glucosio a livello di questo tessuto [Bugianesi E. & coll. (2005)];
2. del fegato perché esibiscono una diminuita soppressione della produzione endogena di glucosio [Bugianesi E. & coll. (2005); Seppala-Lindroos A. & coll. (2002)];
3. del tessuto adiposo perché esibiscono un aumento del processo lipolitico a livello di questo tessuto e presentano maggiori quantità di NEFA circolanti [Bugianesi E. & coll. (2005); Sanyal AJ. & coll. (2001)].

Studi condotti sia sugli animali sia sull'uomo indicano che è soprattutto il tessuto adiposo viscerale la sorgente maggiore di acidi grassi che poi arriveranno al fegato. L'incremento del grasso viscerale è stato associato con l'insulino-resistenza epatica [Seppala-Lindroos A. & coll. (2002); Gastaldelli A. & coll. (2007)], in quanto è un tessuto altamente lipolitico e gli acidi grassi sono rilasciati direttamente nella vena porta.

DIETE IPERLIPIDICHE

Uno degli elementi basilari per migliorare le condizioni di vita di un soggetto è sicuramente rappresentato da una dieta varia ed equilibrata.

Una sana alimentazione deve permettere l'assunzione giornaliera di tutti i nutrienti in quantità necessarie e proporzionate secondo parametri ben precisi. In Italia, a tal proposito, sono stati istituiti i Livelli di Assunzione Raccomandata dei Nutrienti o LARN (equivalenti agli RDA americani) e tali parametri sono fondamentali per evitare carenze nutrizionali ed eccessi alimentari. Ogni nutriente, infatti, deve essere assunto in una quantità definita "ottimale" perché a tale concentrazione corrisponde un funzionamento ottimale dell'organismo. Quindi, quando o per eccesso o per difetto, ci si allontana dalla concentrazione ottimale si diminuiscono le funzioni biologiche.

Nella nostra società moderna, caratterizzata da benessere sia economico sia sociale, è di larga diffusione l'utilizzo di cibi raffinati, ad alta densità energetica e ad elevata quota lipidica. Tale consuetudine, tipica inizialmente solo dei paesi anglosassoni e nord-europei, si è diffusa anche nei paesi di tipica tradizione mediterranea come l'Italia. L'apporto giornaliero di lipidi nella dieta varia a seconda dell'età, del sesso e dello stile di vita condotto da un soggetto

anche se, i livelli raccomandati per un adulto medio, corrispondono al 25% della quota calorica complessiva. Una giusta assunzione di grassi è fondamentale per il corretto funzionamento dell'organismo, in quanto essi forniscono più del doppio dell'energia ottenuta dall'ossidazione dei carboidrati e delle proteine (9 Kcal/g), apportano gli acidi grassi essenziali delle famiglie omega-6 ed omega-3 e favoriscono l'assorbimento di vitamine liposolubili e carotenoidi. Naturalmente è necessario evitare gli eccessi perché un aumento della quota lipidica incoraggia nel tempo l'istaurarsi dell'obesità.

In alcuni studi, è stato osservato che la scelta di cibi altamente energetici e soprattutto ricchi di lipidi sembra essere un comportamento biologico "programmato" che interessa in modo trasversale tutte le specie. Tale processo, infatti, è la conseguenza dei meccanismi di pressione selettiva istauratisi durante i periodi di carenza alimentare cronica. Uno studio a tal riguardo è stato effettuato su ratti che erano stati messi nella condizione di scegliere fra quello che è il loro cibo abituale a basso contenuto lipidico (circa il 7% delle calorie introdotte) e prodotti di "caffetteria" ad elevato contenuto lipidico (circa il 38% delle calorie introdotte). I prodotti di caffetteria comprendevano una serie di spuntini che vengono abitualmente consumati nei bar. I ratti hanno scelto proprio questi ultimi [Rothwell

NJ. & Stock MJ. (1982)], e gli animali che se ne alimentavano non erano in grado di ridurre l'assunzione di cibo in maniera sufficiente a compensare l'aumentato apporto calorico e di conseguenza sono ingrassati [Warwich Z. & Schiffman S. (1992)]. È stato osservato che anche i neonati tendono ad introdurre più latte quando quest'ultimo presenta un contenuto maggiore di lipidi rispetto, invece, a quando il latte ne è più povero [Nysembaum A. & Smart J. (1982)]. Infine, in una ricerca condotta in Danimarca, si è osservato che all'aumento della quantità di grassi nella dieta corrispondeva, nel successivo decennio, ad un aumento analogo della percentuale di obesi [Lissner L. & Heithmann B. (1985)]. In realtà questa relazione fra aumento della quota lipidica ed obesità è ovvia solo in apparenza in quanto l'aumento di peso è correlato ad una serie di motivazioni ancora non del tutto chiare. Infatti la capacità "ingrassante" dei lipidi non è legata soltanto al loro contenuto energetico e alla loro densità calorica ma anche ad una serie di altri motivi. Un esempio è lo scarso senso di sazietà suscitato da un pasto lipidico rispetto a quello indotto da un pasto ricco in carboidrati. Ciò comporta che una dieta iperlipidica non risulta quasi mai isocalorica [Lawton C. & coll. (1993)]. Seppur conservando un apporto calorico equilibrato, il passaggio da un regime alimentare iperglicidico ad uno iperlipidico determina

comunque un aumento di peso. Quindi a parità di calorie i lipidi “ingrassano” più dei carboidrati [Rolls BJ. & Slide DJ. (1992)] e ciò dipende da diversi fattori, dei quali due ricoprono un ruolo preponderante: il basso effetto termico dei lipidi ed il loro preferenziale immagazzinamento rispetto all’ossidazione. L’energia in eccesso, infatti, viene depositata nell’organismo essenzialmente sottoforma di trigliceridi nel tessuto adiposo e solo in minima parte sottoforma di glicogeno. È stato osservato, inoltre, che aumentando la quota di carboidrati nella dieta aumenta in modo proporzionale la loro ossidazione. Invece una quota maggiore di lipidi introdotti produce solo un lieve aumento dell’ossidazione lipidica e, in soggetti normopeso ma con una condizione di obesità alle spalle, tale aumento è ancora più contenuto. Ciò indica l’esistenza di una componente genetico-costituzionale [Thomson C. & coll. (1992)].

Per indurre obesità nelle cavie, da lungo tempo in laboratorio si utilizzano diete ad elevato contenuto lipidico. I ratti ed i topi alimentati con tali diete presentano, rispetto a quelli trattati con una dieta di controllo (dove i lipidi costituiscono il 10% delle calorie totali), un aumento del peso corporeo e dei depositi lipidici (a volte fino all’estrema obesità) [Scalfani A. (1993); Oscai LB. & coll. (1984)]. Diversamente da quanto accade per i carboidrati, l’introito e

l'ossidazione lipidica non sono regolati in modo accurato [Flatt JP. (1987)]. Di conseguenza un consumo eccessivo di grassi determina minori effetti inibitori sull'introito calorico successivo.

Molti studi hanno dimostrato che i ratti preferiscono diete ricche in grassi rispetto a quelle che ne contengono meno [Scalfani A. (1993); Oscai LB. & coll. (1984); Flatt JP.(1987); Hamilton CL. (1964)]. Tale preferenza è dovuta al gusto e al sapore che presentano i cibi ricchi di grassi e l'attrazione che i ratti hanno nei confronti del sapore dei lipidi è presente fin dalla giovane età.

ACIDI GRASSI

Gli acidi grassi sono acidi monocarbossilici alifatici e sono i costituenti di quasi tutti i lipidi.

I lipidi (dal greco lipos = grasso) comprendono tutti i composti organici insolubili in acqua, ma altamente solubili in solventi organici quali l'etere e l'acetone. Sono molecole che presentano una densità significativamente inferiore rispetto a quella dell'acqua e dunque galleggiano.

I carboidrati ed i lipidi presentano gli stessi elementi strutturali (C,H,O), ma differiscono per quanto riguarda i legami fra gli atomi in quanto, nei lipidi, il rapporto idrogeno/ossigeno supera in modo considerevole quello presente nei carboidrati che è sempre pari a 2/1.

Nell'organismo umano gli acidi grassi sono presenti come:

- lipidi semplici, o neutri, presenti nel tessuto adiposo soprattutto come trigliceridi (composti da tre molecole di acido grasso legate ad una molecola di glicerolo);
- fosfolipidi, glicolipidi, lipoproteine, definiti anche lipidi composti, la cui struttura anfipatica ne permette l'utilizzo a livello di strutture biologiche importanti;
- lipidi derivati che si formano dall'unione tra i lipidi semplici e quelli composti. Tra i lipidi derivati quelli più importanti sono il

colesterolo, elemento base per la sintesi di tutti i composti steroidei del nostro organismo, e gli acidi grassi.

Gli acidi grassi vengono classificati in base alla lunghezza della loro catena carboniosa, in quanto a seconda di tale lunghezza prendono una strada di distribuzione ematica diversa. A seconda del numero di atomi di carbonio che costituiscono la catena carboniosa gli acidi grassi si suddividono in:

- grassi a catena corta (con un numero di atomi di carbonio da 1 a 4);
- grassi a catena media (con un numero di atomi di carbonio da 8 a 14);
- grassi a catena lunga (con un numero di atomi di carbonio da 16 a 24).

Un acido grasso è definito dal numero di doppi legami che costituiscono il suo grado di insaturazione. Sono saturi gli acidi grassi che presentano solo legami semplici (C-C), monoinsaturi quando presentano un solo doppio legame (C=C) e polinsaturi quando espongono più doppi legami. Gli acidi grassi saturi hanno una configurazione spaziale lineare che consente loro di potersi disporre in modo ordinato. Ciò favorisce le interazioni molecolari e, di conseguenza, presentano una temperatura di fusione elevata e a temperatura ambiente si ritrovano solitamente allo stato solido. Gli

acidi grassi mono e polinsaturi, invece, a causa dei doppi legami che creano uno squilibrio elettrostatico, non riescono ad allinearsi in modo regolare. Ciò determina pochi legami intramolecolari ed il punto di fusione risulta più basso, motivo per cui a temperatura ambiente sono liquidi.

Esistono degli acidi grassi polinsaturi, definiti essenziali, che devono essere assunti necessariamente con la dieta in quanto il nostro organismo non è in grado di sintetizzarli. Vengono chiamati $\omega 3$ e $\omega 6$ perché il doppio legame si trova rispettivamente al carbonio in posizione 3 e 6 partendo dal gruppo metilico. Questi grassi sono utilizzati non tanto come fonte energetica, quanto come precursori di altre molecole necessarie per l'organismo. Ad esempio, dall'acido linoleico, $\omega 6$, che si trova soprattutto negli oli di semi e nella frutta secca, si forma l'acido arachidonico. Tale molecola è a sua volta precursore delle prostaglandine, che intervengono nei processi infiammatori, nella coagulazione del sangue e nella formazione delle membrane cellulari. Gli $\omega 3$, presenti soprattutto nei pesci di mare non allevati, sono invece considerati degli agenti protettivi contro l'insorgenza di patologie cardiovascolari. Infatti, essendo in grado di diminuire nel sangue il livello dei trigliceridi e la capacità di aggregazione delle piastrine, riducono il rischio di trombosi.

Affinchè una dieta possa essere considerata equilibrata e sana, è necessario che il rapporto fra gli acidi grassi polinsaturi e saturi (P/S) sia mantenuto sempre su valori alti, al fine di non favorire l'utilizzo di alimenti ricchi di grassi saturi. Quest'ultimi, infatti, tendono a far innalzare il livello di colesterolo nel sangue aumentando così il rischio di insorgenza di aterosclerosi e di tutti i problemi cardiovascolari che ne conseguono [Caggiula AW. & Mustak VA. (1997)]. Il problema è che il colesterolo introdotto con la dieta arriva a tutte le cellule, le quali però sono anche in grado di sintetizzarlo a partire dall'acetil-CoA. Per questo motivo possono verificarsi facilmente eccessi di colesterolo. Quando arriva troppo colesterolo al fegato, questo si difende producendo le lipoproteine a bassissima densità dette VLDL. Durante il loro percorso le VLDL vengono metabolizzate in lipoproteine a bassa densità, o LDL, le quali trasportano il colesterolo a tutte le cellule. Dalla degradazione cellulare delle LDL si libera colesterolo (oltre a fosfolipidi e acidi grassi) e se le sue concentrazioni sono eccessive, la cellula è costretta ad adottare delle contromisure. In primo luogo la cellula blocca la sintesi endogena di colesterolo e ne favorisce il suo utilizzo, ad esempio a livello delle membrane. In realtà la quota adoperabile è limitata perché, in quantità eccessiva, il colesterolo può provocare la rottura delle membrane. Un altro

rimedio è quello di trasformare il colesterolo in esteri del colesterolo (che rimangono nel citoplasma) mediante l'azione dell'enzima ACAT (acil-CoA colesterol trasferasi). Tale enzima utilizza l'acil-CoA per esterificare il colesterolo, ma la reazione è favorita dalla presenza di grassi insaturi, per i quali l'enzima mostra maggiore affinità.

Dunque un'alimentazione povera di grassi saturi è fondamentale per un corretto funzionamento dell'enzima ACAT che, altrimenti, non è in grado di esterificare il colesterolo e si assiste ad un innalzamento dei suoi livelli. Tale aumento determina l'interazione, a livello nucleare, dello stesso colesterolo con fattori di trascrizione i cui prodotti inibiscono la sintesi dell'Apo-B-100, ovvero il recettore che a livello della membrana plasmatica determina il riconoscimento e l'internalizzazione delle LDL. In queste condizioni le lipoproteine a bassa densità non riescono più ad entrare nella cellula e, circolando nel sangue, possono infiltrarsi nelle pareti arteriose e scatenare l'inizio del processo aterosclerotico.

BILANCIO ENERGETICO

Affinchè il peso corporeo possa rimanere costante nel tempo, è necessario che un soggetto sia in grado di bilanciare l'energia assunta con l'energia spesa. Quando, infatti, l'introito calorico supera la spesa energetica, si verifica un guadagno energetico corporeo, generalmente sottoforma di depositi lipidici, che predispone con il tempo all'insorgenza dell'obesità.

In accordo con la prima legge della termodinamica secondo cui, l'energia non può essere né creata né distrutta ma solo trasformata, è chiaro che l'energia introdotta nell'organismo deve essere uguale alla somma tra quella consumata e quella conservata nelle riserve metaboliche.

Non tutta l'energia che si introduce con l'alimentazione è poi a disposizione delle cellule, in quanto una frazione viene persa con le scorie (ovvero feci ed urine). L'energia che, invece, è realmente a disposizione dell'organismo, per il mantenimento delle sue funzioni biologiche fondamentali, viene definita Energia Metabolizzabile. Tenendo presente ciò, l'equazione del bilancio energetico può essere scritta come segue:

E. metabolizzabile = E. spesa – E. conservata nelle riserve

Il bilancio energetico è la risultante di diversi fattori: l'assunzione di cibo, l'energia spesa e l'energia depositata nel tessuto adiposo [Campfield LA. & coll. (1997)]. Il peso è quindi la risultante tra l'energia introdotta attraverso bevande e cibi, contenenti substrati energetici quali carboidrati, proteine e lipidi; e le uscite di energia attraverso quella che viene definita spesa energetica.

I principali determinanti della spesa energetica sono:

- il metabolismo basale;
- l'effetto termico del cibo (TEF);
- l'attività fisica.

Il metabolismo basale corrisponde all'energia necessaria all'organismo per sopravvivere in quanto è utilizzata per il metabolismo delle cellule e per supportare il lavoro svolto da organi e tessuti. Rappresenta la frazione maggiore del consumo energetico, infatti corrisponde all'incirca al 60-70% dell'intera spesa energetica. L'effetto termico del cibo, invece, corrisponde all'energia necessaria per la digestione e assorbimento dei nutrienti e contribuisce per il 10% al dispendio di energia. La TEF dipende dal tipo di alimento introdotto, cioè dal composto chimico che lo caratterizza, dalla quantità di alimento ingerito e dalla stimolazione sensoriale che questo provoca. Durante la fase postprandiale, l'energia dissipata

corrisponde al 5-10% per i carboidrati, al 3-5% per i lipidi e al 20-30% per le proteine.

L'ultima componente della spesa energetica, ovvero l'attività fisica, è quella più variabile da soggetto a soggetto in quanto può essere responsabile di una considerevole quota di energia nei soggetti molto attivi, mentre in quelli sedentari corrisponde generalmente solo al 20% della spesa totale.

Se vi è un equilibrio tra assunzione e dispendio energetico si osservano modeste fluttuazioni della massa corporea. Quando invece l'apporto energetico eccede la spesa energetica, le calorie in eccesso, rispetto alla reale richiesta giornaliera, portano alla sintesi di grasso e ad un conseguente aumento di peso. Se questo sbilancio energetico positivo si protrae nel tempo, si va incontro ad obesità. Quando, invece, la spesa energetica è superiore all'apporto calorico, in questo caso il nostro organismo ricava le calorie necessarie a soddisfare le sue necessità dai depositi di grasso con il risultato di una perdita di peso. Regolare il peso corporeo significa quindi non solo regolare ciò che introduciamo ma anche regolare la spesa energetica. Quindi in un organismo la cui massa grassa rimane più o meno costante nel tempo esisteranno meccanismi di controllo a lungo termine che agiscono sull'assunzione dell'energia e/o sulla spesa energetica. Questi

meccanismi attraverso i quali il peso corporeo e il contenuto lipidico corporeo sono mantenuti vicino ad un determinato set-point rimangono largamente sconosciuti.

I MITOCONDRI

I mitocondri sono organuli cellulari di forma generalmente allungata presenti in tutte le cellule eucariotiche. Sono gli organelli deputati alla respirazione cellulare e, dunque, la loro funzione primaria è quella di estrarre energia chimica dai substrati energetici e di immagazzinarla in una molecola facilmente utilizzabile: l'ATP.

Il nome “mitocondrio” (dal greco mitos = filo e khondrion = granulo) si rifà alla dinamicità della forma di questi organuli che possono variare la loro forma allungata, da granulare a bastoncellare, in relazione ai differenti momenti funzionali della cellula. Anche le dimensioni sono molto variabili, ma in genere la lunghezza è compresa tra 1 e 6 μm mentre il diametro varia tra 0.5 e 1 μm .

Dal punto di vista ultrastrutturale, i mitocondri sono circondati da due membrane, la membrana esterna e quella interna, che circoscrivono a loro volta due spazi ben differenziati. La membrana esterna, che permette il passaggio di piccole molecole, delimita lo spazio intermembrana, una regione che gioca un ruolo importante nella produzione mitocondriale di ATP [Silverthorn DU. & Johnson BR. (2005)]. La membrana interna, selettivamente permeabile e ripiegata in estroflessioni chiamate creste mitocondriali che ne aumentano la

superficie, invece, circonda la matrice mitocondriale che contiene enzimi, ribosomi, granuli e catene di DNA.

La membrana mitocondriale esterna è caratterizzata dalla presenza di molte copie di una proteina di trasporto chiamata porina, la quale forma grossi canali acquosi attraverso il doppio strato lipidico. Tale membrana, quindi, risulta permeabile a tutte le molecole di dimensioni inferiori a 5 kDa, comprese le piccole proteine. Queste molecole possono giungere allo spazio intermembrana, ma la maggior parte di esse non possono attraversare la membrana interna impermeabile. Così mentre lo spazio intermembrana risulta chimicamente equivalente al citosol, la matrice invece contiene una serie altamente selezionata di piccole molecole. La membrana interna è altamente specializzata e contiene un'alta proporzione del fosfolipide "doppio" cardiolipina, il quale contiene quattro acidi grassi e contribuisce a rendere la membrana particolarmente impermeabile agli ioni. Essa contiene una serie di proteine di trasporto che la rendono selettivamente permeabile a quelle piccole molecole che sono metabolizzate, o richieste, dai molti enzimi mitocondriali concentrati nella matrice. Proprio a livello della matrice e della membrana interna si svolgono le fasi salienti del processo di respirazione cellulare e cioè: il ciclo dell'acido citrico (o ciclo di Krebs) e il trasporto degli

elettroni lungo la catena respiratoria con successiva fosforilazione ossidativa.

Per la sintesi di ATP, la cellula ricava l'energia necessaria dall'ossidazione completa dei substrati organici, soprattutto da quelli derivati dalla glicolisi come il piruvato. In misura minore, la cellula utilizza anche i chetoacidi, amminoacidi e acidi grassi derivanti dall'idrolisi di proteine e lipidi. Dunque è soprattutto il piruvato che, arrivato a livello mitocondriale, viene decarbossilato ed entra nel ciclo di Krebs determinando la produzione di un certo numero di coenzimi ridotti, quali il nicotinammide adenin-dinucleotide (NADH) e il flavin adenin-dinucleotide (FADH₂). Tali coenzimi sono molecole ricche di energia, in quanto contengono una coppia di elettroni ad elevato potenziale di trasferimento; per riossidersi, cedono gli atomi di idrogeno alla catena respiratoria situata sulla membrana mitocondriale interna. A questo punto la catena di trasporto degli elettroni si occupa di separare i protoni dagli elettroni trasportando quest'ultimi attraverso i complessi lipoproteici che la costituiscono verso l'accettore finale che è l'ossigeno, con formazione di acqua come prodotto finale (Fig. 5). L'energia liberata dai processi di ossidoriduzione viene poi utilizzata per pompare i protoni dalla matrice al di fuori della membrana contro forza spingente. Tutto ciò

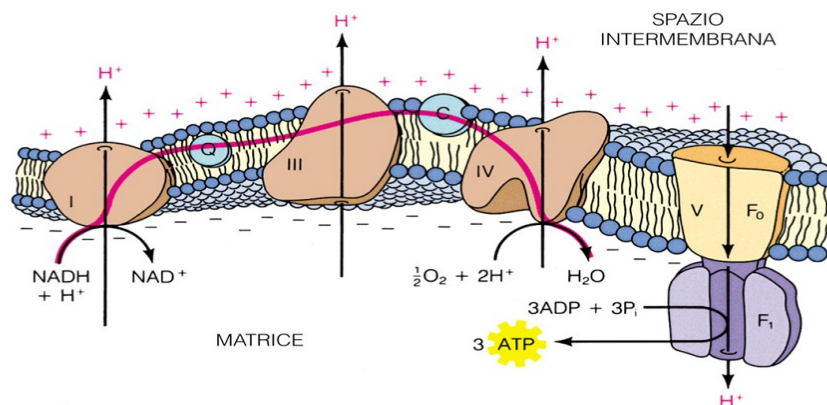
dà origine al cosiddetto “gradiente protonico elettrochimico” (Δp) tra lo spazio intermembrana (nel quale sono stati convogliati i protoni) e la matrice mitocondriale. Infatti all'esterno aumenta la concentrazione di protoni, determinando la formazione di un gradiente chimico che tende a farli rientrare e si instaura una differenza di potenziale tra i due lati della membrana. Tale differenza di potenziale determina un'ulteriore forza spingente verso l'interno in quanto i protoni, carichi positivamente, sono attratti dalla negatività del lato opposto della membrana.

Le due diverse componenti di questo gradiente determinano quindi un flusso protonico che attiva specifici enzimi della membrana mitocondriale interna, le ATP-sintetasi, e fornisce l'energia necessaria per convertire l'ADP ed il fosfato inorganico in ATP, compiendo dunque il processo di fosforilazione ossidativa.

L'ATP sintetasi è un complesso enzimatico costituito da una parte idrofobica F_0 integrata alla membrana mitocondriale, che contiene il canale protonico, e da una porzione catalitica idrofilica F_1 che sporge entro la matrice del mitocondrio (Fig. 5). I protoni accumulati nello spazio intermembrana durante il trasporto degli elettroni permeano attraverso F_0 prima e F_1 poi, consentendo all'ATP sintetasi di attivare la sintesi di ATP, mentre gli H^+ abbandonano la porzione catalitica F_1

e rientrano nella matrice mitocondriale. L'ATP sintetasi si comporta dunque come una permeasi protonica che tende a riequilibrare il gradiente elettrochimico dei protoni fra i due lati della membrana, traducendo l'energia del gradiente in energia conformazionale e quindi in energia di legame chimico dell'ATP. Si formerebbero così tre molecole di ATP dall'ossidazione di una molecola di NADH, e due dall'ossidazione di una molecola di FADH₂ (per coppia di elettroni trasferiti e per atomo di ossigeno utilizzato) [Alpi A. & coll. (2000)].

FIGURA 5. Catena respiratoria



Durante la fosforilazione ossidativa, la velocità con cui procede il trasporto di elettroni lungo la catena respiratoria dipende dalla

quantità di substrati reagenti e soprattutto dalla presenza di ADP. Questo fenomeno prende il nome di controllo da parte dell'accettore o "controllo respiratorio". Nel caso in cui manca l'ADP non avviene alcun tipo di fosforilazione e di conseguenza non c'è sintesi di ATP. Tale condizione è definita Stato 4 della respirazione ed equivale allo stato di riposo. Quando l'ADP viene aggiunto al sistema, la capacità ossidativa dei mitocondri aumenta in modo repentino in quanto il fosfato ha di nuovo il suo accettore e sarà quindi possibile la sintesi di ATP. Questa condizione rappresenta lo Stato 3 della respirazione ovvero la fase di respirazione attiva del mitocondrio. Nel momento in cui tutto l'ADP aggiunto viene fosforilato, si ritorna allo Stato 4 di riposo a causa di un nuovo decremento della velocità di consumo dell'ossigeno.

Per misurare l'integrità dei mitocondri isolati, è possibile determinare il "rapporto di controllo respiratorio" (RCR) che equivale al rapporto fra la velocità del consumo di ossigeno nello Stato 3 e 4 della respirazione. Maggiore è il rapporto migliore sarà lo stato in cui si trovano i mitocondri che sono, quindi, in grado di fosforilare l'ADP. Quando l'RCR diminuisce fino a raggiungere il valore di 1, i mitocondri risultano danneggiati ed incapaci di fosforilare l'ADP.

EFFICIENZA MITOCONDRIALE

L'efficienza metabolica può essere definita come la misura dell'entità con cui un organismo ottiene energia (sottoforma di ATP) dai nutrienti che introduce con l'alimentazione. I meccanismi che concorrono a regolare l'efficienza metabolica sono ancora poco conosciuti anche se, non è un errore ritenere che, variazioni a livello di organi e tessuti che particolarmente contribuiscono alla velocità metabolica corporea, si riflettono a livello dell'organismo in toto. A livello cellulare, invece, variazioni dell'efficienza energetica mitocondriale possono sicuramente contribuire alle variazioni dell'efficienza metabolica corporea.

L'efficienza energetica, ovvero la quantità di ATP prodotta in relazione alla quantità di substrato ossidato, dipende dalle caratteristiche di impermeabilità agli H^+ della membrana mitocondriale interna. 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. 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. Il disaccoppiamento basale è una via di perdita protonica passiva, dovuto alle caratteristiche intrinseche della membrana mitocondriale interna, definito anche *conduttanza protonica basale* (CPB) [Brand MD. (1990)]. 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 [Brand MD.& coll. (1994)].

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 [Brand MD. & coll. (1994); Rolfe DFS. & Brand MD. (1996)]. 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 % [Rolfe DFS. & Brand MD. (1996)]. È 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 [Brand MD. & coll. (1994)]. La conduttanza protonica basale mitocondriale è presente non soltanto 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 [Stuart JA. & coll. (1999)].

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 [Soboll S. & coll. (1984)].

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 [Wojtczak L. (1976); Wojtczak

L. & Schönfeld P. (1993)]. 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 [Hulsmann WC. & coll. (1960); Zborowski J. & Wojtczak L. (1963)].

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 [Wrigglesworth JM. & coll. (1993)]. Questi ricercatori evidenziarono che l'oleato può catalizzare il trasporto del protone attraverso il doppio strato lipidico mediante un meccanismo che prevede che l'acido grasso possa diffondere all'interno della matrice mitocondriale come acido associato (AH). La velocità del trasporto dipenderà dalla natura dell'acido grasso. Viene anche proposto che la velocità di movimento dell'acido indissociato sia più elevata di quella della forma anionica dell'acido grasso dissociato. 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.

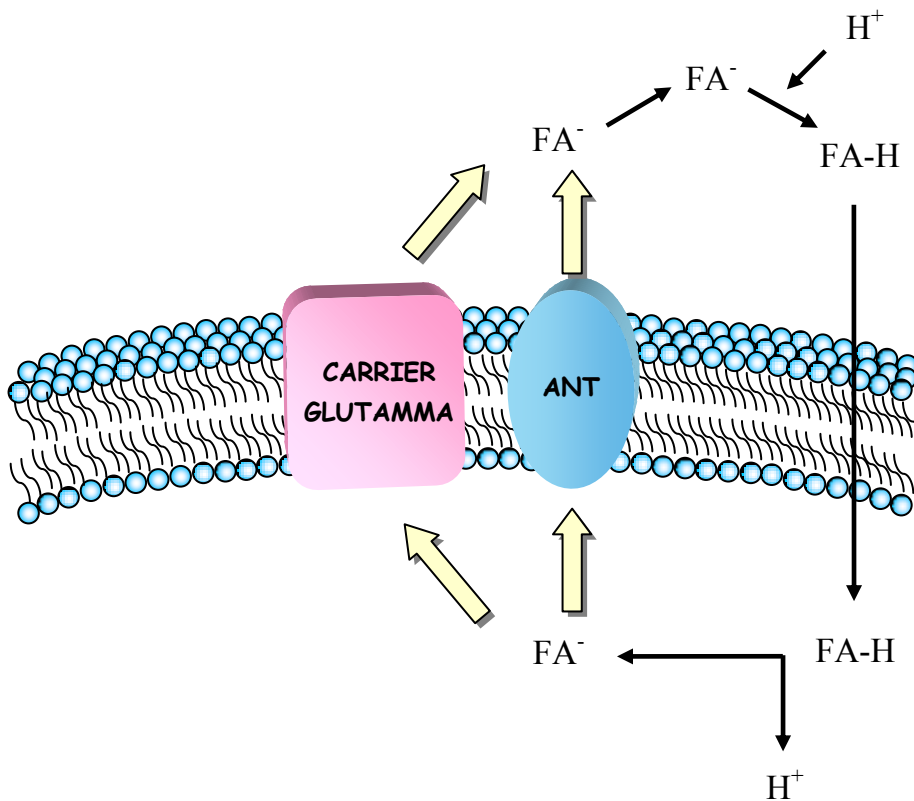
Studi successivi suggerirono che gli acidi grassi sono in grado di incrementare la conduttanza protonica nei mitocondri, interagendo con alcuni componenti della membrana mitocondriale interna. Il gruppo di Skulachev, infatti, osservò che l'ADP ed alcuni inibitori dell'adenina nucleotide traslocasi (ANT) erano in grado di abolire parte dell'effetto disaccoppiante del palmitato [Dedukhova VI. & coll. (1991)]. 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 [Schönfeld P. (1990)]. 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 [Schönfeld P. & Bohnensack R. (1997)]. 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 [Polčic P. & coll. (1997)]. 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 [Skulachev VP. (1998)].

Sulla base di tali risultati è stato proposto un nuovo modello che spieghi l'effetto disaccoppiante degli acidi grassi (Fig. 6). 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 processi diffusionali. Nella matrice mitocondriale gli acidi grassi vengono nuovamente deprotonati, causando così il trasferimento netto di un protone dal citosol alla matrice mitocondriale.

FIGURA 6. *Trasporto di H^+ attraverso il doppio strato lipidico mediato dall'acido grasso*



La funzionalità mitocondriale dipende da due componenti importanti: la capacità respiratoria e il grado di accoppiamento tra l'ossidazione dei substrati energetici e la fosforilazione ossidativa. È chiaro che un'elevata capacità respiratoria permette alla cellula di poter ossidare i substrati energetici e produrre elevate quantità di ATP. Tale ATP viene poi utilizzato affinché siano possibili tutti quei processi che sono alla base della sopravvivenza cellulare: funzionamento delle pompe, dei trasporti attivi, del potenziale di membrana ed ecc. Dunque, una diminuita capacità ossidativa della cellula, può compromettere il corretto funzionamento della stessa cellula.

Ma, come detto in precedenza, gioca un ruolo chiave nella funzionalità mitocondriale anche il grado di accoppiamento energetico. Infatti se tale grado di accoppiamento risulta elevato, la cellula è in grado di produrre ATP a costo energetico basso con conseguente accumulo di substrati energetici; quando, invece, il grado di accoppiamento energetico risulta basso, la cellula è in grado di produrre ATP più velocemente e ad un costo energetico più elevato evitando l'accumulo di substrati.

RADICALI LIBERI

I radicali liberi sono molecole altamente reattive che vengono prodotte a livello cellulare sia durante i normali processi metabolici sia in seguito a stimoli esterni come radiazioni ionizzanti, farmaci, sostanze chimiche e stress di vario genere. Sono considerati la causa delle principali patologie e dell'invecchiamento degli esseri viventi. I radicali liberi vengono generalmente classificati in ROS (o specie reattive dell'ossigeno) e RNS (o specie reattive dell'azoto).

Sono soprattutto le specie reattive dell'ossigeno a giocare un ruolo chiave nel danneggiamento cellulare. Esse rappresentano specie chimiche con un solo elettrone spaiato in un orbitale esterno che possono formarsi spontaneamente per reazione diretta dell'ossigeno molecolare con cationi non chelanti o enzimaticamente per poi andare incontro ad una serie di reazioni biochimiche. La configurazione altamente instabile, che caratterizza tali specie, crea energia poi liberata durante le reazioni con altre molecole organiche, quali acidi nucleici, proteine e lipidi convertiti essi stessi in radicali liberi.

La configurazione dei ROS è conseguente ad una riduzione parziale della molecola di ossigeno, la quale necessita di quattro elettroni per potersi ridurre ad acqua. Dalla riduzione dell' O_2 da parte di un singolo

elettrone si produce il radicale superossido $O_2^{\cdot -}$; mentre dalla riduzione da parte di due elettroni si forma perossido di idrogeno H_2O_2 .

La maggior sorgente del radicale superossido ($O_2^{\cdot -}$) cellulare, che produce H_2O_2 tramite la reazione di dismutazione e le specie ossidriliche ($\cdot OH$) altamente reattive tramite la reazione di Fenton, è la catena respiratoria, localizzata nella membrana interna dei mitocondri [Maklashina E. & coll. (2004)]. Durante il passaggio degli elettroni dal complesso I e II fino alla citocromo ossidasi, si assiste ad una maggiore produzione di ROS quando la velocità di trasporto degli elettroni diminuisce. Nonostante tutto, il principale sito di produzione del superossido è l'ubichinone [Wallace DC. (1992); Quant PA. & coll. (1991)] e la sua forma ridotta, l'ubichinolo, mostra proprietà antiossidanti.

I mitocondri rappresentano non soltanto i maggiori produttori di radicali liberi, ma sono anche il principale bersaglio dei loro effetti dannosi. Ad esempio i livelli del danno ossidativo al DNA mitocondriale isolato dal fegato di ratto o da varie regioni del cervello umano sono maggiori rispetto a quelli del DNA nucleare [Mecocci P. & coll. (1993)]. Questi livelli superiori di danno sono da attribuire alla localizzazione del DNA vicino ai siti della membrana mitocondriale interna in cui si formano gli ossidanti. Inoltre il DNA mitocondriale

non è caratterizzato dal classico impacchettamento con proteine istoniche tipico del DNA nucleare. Dunque viene a mancare il ruolo protettivo svolto da tali proteine nei confronti degli agenti esterni.

Danni ingenti, causati dai radicali liberi, possono interessare anche le proteine mitocondriali. L'accumulo di proteine con gruppi carbonilici ossidati, porta a delle reazioni inter/intra-molecole con gruppi amminici di altre proteine, con la conseguente perdita della loro funzionalità fisiologica e biochimica [Ames BN. & coll. (1995)]. Un esempio di proteina mitocondriale danneggiata dai radicali liberi è l'aconitasi, un enzima del ciclo di Krebs. Tale proteina contiene nel suo sito attivo un "cluster" (4Fe-4S) che è il principale bersaglio dei superossidi. È stato proposto che il cluster (4Fe-4S)²⁺ è ossidato dallo ione superossido formando il cluster inattivo (3Fe-4S)¹⁺, a causa del rilascio reversibile del ferro [Vasquez-Vivar J. & coll. (2000)]. In questa reazione i probabili prodotti sono ferro e H₂O₂, perciò, l'inattivazione dell'aconitasi mitocondriale, mediata dal superossido, potrebbe incrementare la formazione del radicale idrossilico (·OH) attraverso la reazione di Fenton nei mitocondri [Vasquez-Vivar J. & coll. (2000)]. Questa selettiva e reversibile distruzione dei cluster (4Fe-4S), può essere usata per stimare la concentrazione dei superossidi nelle cellule di mammifero [Longo VD. & coll. (2000)].

A livello mitocondriale, ulteriore sito di danno da parte dei ROS, è rappresentato dai lipidi costituenti la membrana mitocondriale. È già noto da tempo, che le membrane giocano un ruolo centrale nella bioenergetica delle cellule. Infatti, i mitocondri presentano una membrana con caratteristiche di permeabilità altamente selettiva: ciò rende possibile separare le vie del metabolismo in compartimenti diversi. In più la membrana mitocondriale fornisce anche il sostegno per il sistema di traduzione dell'energia [Hansford RG. (1983)]. Cambiamenti nella permeabilità di membrana sono dovuti ad un incremento della perossidazione lipidica [Ames BN. & coll. (1995)], che determina una diminuzione della fluidità di membrana rendendola più rigida.

Per evitare la formazione dei ROS (e di conseguenza tutti i problemi ad essi collegati) e rimuovere quelli formati, il mitocondrio è fornito di un elaborato sistema di difesa [Skulachev VP. (1998)]. Giocano un ruolo chiave nella difesa mitocondriale contro i ROS due meccanismi importanti:

1. la superossido dismutasi (SOD) che è un enzima localizzato nella matrice mitocondriale ed è deputato alla conversione, mediante dismutazione, del radicale $O_2^{\cdot -}$ in H_2O_2 e O_2 . Il perossido di

idrogeno può uscire dal mitocondrio essendo più permeabile del radicale superossido;

2. il leggero disaccoppiamento dovuto all'azione degli acidi grassi liberi. Tale disaccoppiamento contrasta la formazione dei radicali, in quanto mantiene il potenziale protonico mitocondriale al di sotto del livello di soglia richiesto per stimolare la produzione di superossido da parte del complesso I e III [Skulachev VP. (1998)].

SCOPO DELLA TESI

L'incidenza dell'obesità è in continua crescita nella maggior parte dei paesi del mondo, ma le cause che ne sono alla base sono ancora scarsamente conosciute. Comunque, il mantenimento di un peso corporeo stabile dipende dall'abilità ad adattare la spesa energetica corporea alle variazioni dell'assunzione energetica. Infatti, la regolazione del peso corporeo è ottenuta attraverso una fine coordinazione tra assunzione e spesa energetica. Per quanto riguarda i fattori che determinano lo sviluppo dell'obesità, la composizione in macronutrienti della dieta e l'età possono essere importanti.

È risaputo che le diete iperlipidiche sono generalmente associate allo sviluppo di obesità, mentre diete a basso contenuto di grassi permettono un miglior controllo del peso corporeo. È stato calcolato che, maggiore è la percentuale di grasso nella dieta, più grande è la possibilità di sviluppare l'obesità [Bray GA. & coll. (2004)]. Un livello di grasso che eccede il 25-30% delle calorie assunte giornalmente può, potenzialmente, indurre l'obesità. È importante considerare che un'eccessiva quantità di grasso nella dieta potrebbe indurre iperfagia a causa dell'estrema palatabilità delle diete iperlipidiche, ma anche in caso di normofagia, l'eccessiva presenza di grasso potrebbe portare ad una diminuzione della energia spesa per

depositare i substrati energetici in eccesso, con un risultante bilancio energetico positivo.

Anche l'età può essere determinante per lo sviluppo dell'obesità e ciò è stato dimostrato in studi precedentemente condotti nel laboratorio in cui ho svolto il dottorato. Infatti sia i ratti appena svezzati (di circa 30 giorni di età) [Liverini G. & coll. (1996)] sia i ratti in fase post-puberale (di circa 50 giorni di età) [Iossa S. & coll. (1999)], alimentati con una dieta iperlipidica per due settimane, esibivano un aumento dell'assunzione di energia associato ad un aumento adattativo della spesa energetica. Questo incremento regolatorio della capacità termogenica si opponeva completamente allo sviluppo dell'obesità nei ratti appena svezzati, mentre riusciva solo in parte a contrapporsi allo sviluppo dell'obesità nei ratti in fase post-puberale. Per questo motivo si può ipotizzare che le risposte regolatorie ad un eccessivo introito calorico siano inibite con l'avanzare dell'età. E' stato inoltre dimostrato che la capacità di resistere allo sviluppo dell'obesità tende a diminuire con l'età, anche se i ratti sono alimentati con diete ipolipidiche [Barzilai N. & Rossetti L. (1995)]. Infatti, con l'avanzare dell'età i ratti sviluppano una tendenza spontanea all'obesità. Inoltre, sempre in lavori precedentemente condotti nel laboratorio dove ho svolto il dottorato, è stato dimostrato che in ratti adulti (tra 90 e 180

giorni di età) l'eccesso di energia ingerita è interamente immagazzinata come grasso piuttosto che ossidata, e quindi inizia a svilupparsi l'obesità associata all'età [Iossa S. & coll. (1999)].

Inoltre, diversi studi hanno sottolineato l'importanza della durata della dieta iperlipidica così come la composizione di grassi nella dieta sullo sviluppo dell'insulino-resistenza nei ratti [Zhou YP. & Grill VE. (1994)], fenomeno strettamente associato all'obesità. Infatti, è ben noto che l'insulino-resistenza ed il diabete sono la più comune complicanza dell'eccesso di grasso corporeo [Jackson AA. (1984)]. In una situazione di bilancio energetico cronicamente positivo si assiste ad ipertrofia e ad iperplasia degli adipociti. In particolare la condizione di ipertrofia può provocare uno stress adipocitario. Tale stress è lo stimolo che dà origine alla produzione da parte del tessuto sottocutaneo addominale e viscerale di una particolare citochina: il $TNF\alpha$, fattore chiave nel determinare lo stato di insulino-resistenza negli adipociti sottocutanei addominali e viscerali in quanto diminuisce la sintesi del recettore dell'insulina e la fosforilazione dell'IRS-1. La resistenza all'insulina rallenta sia l'ingresso di glucosio che la sintesi di trigliceridi negli adipociti in quanto provoca un ridotto ingresso di acidi grassi che rimangono circolanti nel sangue. Ma, il tessuto adiposo, oltre a diminuire la liposintesi aumenta la lipolisi in

quanto in tali condizioni l'azione antilipolitica dell'insulina si esplica poco e la conseguenza immediata di tale situazione è una maggiore liberazione di grassi dal tessuto adiposo che vanno in circolo per rimanere nel sangue o depositarsi in altri tessuti quali muscolo scheletrico, fegato e pancreas e provocare, quindi, il cosiddetto accumulo di grasso in sede ectopica, responsabile dell'insulino-resistenza nel fegato e nel muscolo.

Quindi, per comprendere meglio sia meccanismi che sono alla base della tendenza ad accumulare grasso tipico dei ratti alimentati con una dieta iperlipidica prolungata nel tempo, sia l'associata insulino-resistenza, ho ritenuto interessante valutare le variazioni dell'assunzione di cibo e della spesa energetica in ratti adulti (90 giorni di età), che già presentano una naturale tendenza ad accumulare grasso. Questi ratti sono stati alimentati con una dieta iperlipidica messa a punto nel laboratorio in cui ho svolto il dottorato. Questa dieta è ottenuta aggiungendo al mangime standard da laboratorio: burro (per aumentare il contenuto lipidico e calorico della dieta), carne liofilizzata (sia per mantenere costante l'apporto proteico sia per indurre l'iperfagia perché il sapore della carne sembra essere quello maggiormente preferito dai ratti) [Naim M. & coll. (1985); Allard M., Le Blanc J. (1988)] ed un mix di vitamine e minerali (per fornire alla

dieta una giusta quantità di micronutrienti). Sui ratti alimentati con tale dieta ho effettuato tutte le misure necessarie per risalire al loro bilancio energetico.

Inoltre, per ottenere informazioni su alcune delle modificazioni metaboliche indotte dalla dieta iperlipidica nei ratti adulti, connesse con l'insulino-resistenza, ho determinato sia i livelli plasmatici dei NEFA sia i livelli plasmatici di glucosio e insulina dopo un carico di glucosio.

Tenendo presente che le variazioni della spesa energetica, riscontrate a livello dell'intero organismo, riflettono le variazioni dell'attività metabolica dei singoli organi e tessuti, è presumibile che il quadro metabolico indotto nel ratto adulto dalla somministrazione cronica della dieta iperlipidica potrebbe dipendere da variazioni metaboliche a livello di singoli organi particolarmente coinvolti nel metabolismo, come il fegato ed il muscolo scheletrico [Rolfe DFS. & Brown GC. (1997)]. A livello cellulare i mitocondri sono il principale sito dei processi ossidativi e quindi variazioni dell'attività metabolica cellulare possono essere il risultato di variazioni della funzionalità mitocondriale.

Un'idea emergente attuale è che le disfunzioni mitocondriali possono portare allo sviluppo di malattie metaboliche come l'obesità, il diabete

mellito di tipo 2 e le steatoepatiti non alcoliche. Alcuni gruppi di ricerca hanno, infatti, mostrato che a livello cellulare sembra che l'obesità e il diabete di tipo 2 siano associati con danni alla biogenesi e alla funzionalità dei mitocondri [Kelley DE. & coll. (2002); Petersen KF. & coll. (2004)]. In un recente lavoro [Kelley DE. & coll. (2002)] è stato proposto che la resistenza all'insulina nell'obesità e il diabete di tipo 2 siano strettamente collegati ad un danneggiamento della funzione mitocondriale a livello dei mitocondri subsarcolemmatici, del muscolo scheletrico. Infatti, in soggetti obesi o diabetici diminuiva il numero di questi mitocondri e c'era anche una più bassa attività della catena di trasporto degli elettroni. Questa scoperta è molto importante perché il muscolo scheletrico è uno dei siti primari di azione dell'insulina dell'intero organismo [Stannard SR. & Johnson NA. (2003)] ed è quindi collegato allo sviluppo di resistenza all'insulina. Sulla base di queste osservazioni, ho ritenuto interessante misurare la capacità ossidativa del muscolo scheletrico, di ratti alimentati con una dieta ad alto contenuto di grassi per 7 settimane per valutare l'effetto a lungo termine di una dieta ad alto contenuto di grasso sulla funzionalità mitocondriale del muscolo scheletrico.

Studi precedenti condotti sul muscolo cardiaco e scheletrico hanno dimostrato, che in questi tessuti sono presenti due popolazioni di

mitocondri, una localizzata direttamente sotto il sarcolemma (mitocondri subsarcolemmatici) ed un'altra tra le miofibrille (mitocondri intermiofibrillari) [Palmer JW. & coll. (1997)].

L'isolamento delle due popolazioni mitocondriali ha permesso una loro analisi separata. Inoltre, è stato dimostrato che queste due popolazioni di mitocondri, non solo presentano una localizzazione diversa nella cellula, ma differiscono anche biochimicamente [Palmer JW. & coll. (1997)]. Infatti, la capacità ossidativa dei mitocondri intermiofibrillari è più alta di quella dei mitocondri subsarcolemmatici con tutti i substrati utilizzati. Le differenze tra i mitocondri intermiofibrillari e subsarcolemmatici hanno suggerito che queste due popolazioni giocano un differente ruolo metabolico nell'economia della cellula.

Alla luce di queste osservazioni ho esaminato l'effetto di un'alimentazione ad alto contenuto di grassi per 7 settimane sulla capacità ossidativa delle due popolazioni mitocondriali del muscolo scheletrico utilizzando un substrato FAD-dipendente, quale il succinato, un substrato NAD-dipendente quale il glutammato, ed infine, un substrato lipidico, quale il Palmitoil CoA. Inoltre, ho anche determinato l'efficienza energetica mitocondriale, misurando la conduttanza protonica basale e indotta dagli acidi grassi. Infine ho

ritenuto interessante valutare, i danni ossidativi a carico delle due popolazioni di mitocondri, in seguito al trattamento di una dieta ad alto contenuto di grassi per 7 settimane.

Tenendo presente che oltre il muscolo scheletrico, un altro organo importante nell'omeostasi del glucosio è proprio il fegato, ho successivamente spostato l'attenzione dal muscolo scheletrico al fegato, nel modello animale suddetto. Tale studio ha notevoli implicazioni dato che il fegato svolge un ruolo cruciale nel mantenimento del metabolismo corporeo, quindi alterazioni della funzione epatica potrebbero influenzare non solo l'omeostasi glucidica, ma anche lo stato di salute dell'organismo.

È noto che una comune complicanza dell'obesità indotta dalla dieta iperlipidica associata ad insulino-resistenza è la steatosi epatica o accumulo di grassi nel fegato. Tale deposito ectopico di grassi deriva da uno stato di insulino-resistenza degli adipociti. Infatti, tali cellule nei soggetti obesi sviluppano insulino-resistenza e non sono in grado di depositare grasso dopo un pasto, ciò comporta un aumento di acidi grassi non esterificati nel sangue e conseguentemente ne entrano una maggiore quantità nel fegato [Carmiel-Haggai MM. & coll. (2004)]. I grassi si accumulano nel fegato quando la velocità di ingresso degli acidi grassi nelle cellule epatiche non è compensata dalla loro

scomparsa. Vi sono due vie principali di smaltimento degli acidi grassi: la β -ossidazione mitocondriale per la produzione di ATP e la loro secrezione nel sangue come trigliceridi nelle VLDL. Alterazioni in questi processi risultano nell'accumulo di trigliceridi nel fegato o steatosi epatica.

Tale stato di per sé non è una patologia, ma degenerando potrebbe innescare nel tempo vere e proprie patologie anche molto gravi, come epatopatie non alcoliche e cirrosi epatica. Tale transizione sembrerebbe essere determinata tra l'altro da danni ossidativi che contribuiscono al passaggio da semplice steatosi a stati patologici gravi [Fromenty B. & coll. (2004)]. Poiché i mitocondri sono il maggior sito cellulare implicato sia nel metabolismo degli acidi grassi sia nella produzione dei ROS, potrebbero svolgere un ruolo importante nell'accumulo ectopico di grassi nel fegato e correlate patologie. In effetti, solo pochi dati sono presenti in letteratura sul coinvolgimento del compartimento mitocondriale in questo processo [Vianna CR. & coll. (2006)].

Alla luce di queste considerazioni, ho anche condotto un esame dettagliato del compartimento mitocondriale epatico, sia dal punto di vista della funzionalità, sia come produttori di ROS in un modello animale di obesità e insulino-resistenza. Entrambe queste

caratteristiche sono importanti nel determinare la steatosi epatica e anche la successiva degenerazione.

Le misure sono state condotte su ratti adulti sedentari per le loro condizioni di stabulazione, alimentati per sette settimane con la dieta iperlipidica precedentemente illustrata. Ho determinato in questi animali, insieme alla massa proteica mitocondriale, le capacità respiratorie mitocondriali nell'omogenato di fegato e sugli organelli isolati, utilizzando differenti substrati. Per avere informazioni sull'efficienza energetica mitocondriale ho anche misurato sui mitocondri isolati la conduttanza protonica basale agli ioni H^+ , importante determinante del grado di accoppiamento mitocondriale. Le misure precedenti condotte a livello del compartimento mitocondriale mi hanno permesso di valutare la funzionalità dei mitocondri epatici isolati da ratti con obesità dieta-indotta. Ho anche valutato il danno ossidativo mitocondriale e i sistemi di difesa contro lo stress ossidativo.

PARTE SPERIMENTALE

1° DISEGNO SPERIMENTALE: MISURE DEL BILANCIO ENERGETICO, DELLA COMPOSIZIONE CORPOREA E DELLO STATO METABOLICO

Per lo svolgimento del primo disegno sperimentale sono stati utilizzati 24 ratti maschi adulti del ceppo Wistar di circa 90 giorni di età, ottenuti dalla Charles River (Calco, Como, Italia). Gli animali sono stati stabulati singolarmente in gabbia ad una temperatura controllata di circa 24°C e sono stati sottoposti ad un ciclo circadiano artificiale luce/buio di 12 ore (06.30-18.30).

I ratti sono stati divisi in tre gruppi e selezionati in base al loro peso corporeo medio di circa 440g. Un gruppo di ratti è stato sacrificato all'inizio del periodo sperimentale per determinare la composizione corporea iniziale ed il contenuto energetico. I due gruppi restanti sono stati alimentati, uno con una dieta di controllo (Mucedola 4RF21, Settimo Milanese, Milano, Italia) a basso contenuto di grassi (il 10.6% dell'energia deriva dai grassi) e l'altro con una dieta ricca di grassi (il 50% dell'energia deriva dai grassi) per sette settimane. La dieta ad alto contenuto di grassi, rispetto a quella di controllo, è stata formulata in modo da differire solamente per il contenuto di lipidi e di carboidrati ma sono identiche, in termini di proteine, vitamine, sali minerali e fibre (Tab. 1). La dieta iperlipidica è caratterizzata non solo

da un elevato contenuto di grassi ma anche dalla presenza della carne che è tra i sapori maggiormente preferiti dai ratti. Un'ulteriore differenza tra le due diete è la composizione in acidi grassi che è stata determinata mediante cromatografia gas-liquida (Tab. 2). L'analisi delle due diete mostrava che nella dieta ipolipidica prevalevano i grassi insaturi, mentre nella dieta iperlipidica prevalevano i grassi saturi, in modo che il rapporto acidi grassi polinsaturi su acidi grassi saturi (P/S) era 4.2 per la dieta ipolipidica e 1.7 per la dieta iperlipidica. I suddetti cambiamenti nelle diete erano ottenuti da una parziale sostituzione dell'acido linoleico ($C_{18:2n6}$) con acidi grassi saturi ($C_{4:0}$ - $C_{18:0}$).

Al termine del periodo sperimentale, i ratti, messi a digiuno per sei ore, sono stati sottoposti al test della curva da carico di glucosio allo scopo di valutare la risposta del sistema insulinemico. Il giorno seguente, gli animali sono stati anestetizzati mediante un'iniezione intraperitoneale di cloralio idrato (40mg/100g di peso corporeo) e sono stati sacrificati mediante decapitazione, seguita dal prelievo di un'aliquota di sangue. Dopo il sacrificio, gli animali sia alimentati con la dieta ad elevato contenuto lipidico sia con quella ipolipidica sono stati utilizzati per la determinazione della composizione corporea. A tal fine le carcasse degli animali sono state pesate, autoclavate per 90

minuti, quindi sminuzzate, mescolate accuratamente ed infine, omogeneizzate con acqua (volume finale uguale a due volte il peso della carcassa) in un omogeneizzatore Politron. Aliquote dell'omogenato sono state poi utilizzate per l'analisi del contenuto energetico, lipidico, proteico e di acqua della carcassa.

Il trattamento, la stabulazione ed il sacrificio degli animali sono stati eseguiti in conformità alle linee guida del Ministero della Sanità.

2° DISEGNO SPERIMENTALE: MUSCOLO SCHELETRICO E RELATIVE MISURE

Per il secondo disegno sperimentale sono stati utilizzati 32 ratti maschi Wistar caratterizzati dallo stesso peso medio di quelli utilizzati nel disegno precedente. Sono stati stabulati singolarmente ad una temperatura controllata di circa 24°C e sono stati sottoposti ad un ciclo circadiano artificiale luce/buio di 12 ore (06.30-18.30).

Gli animali sono stati divisi in due gruppi entrambi alimentati per sette settimane, rispettivamente con la dieta ipolipidica (di controllo) e la dieta iperlipidica, utilizzate anche durante il primo disegno sperimentale.

Al termine del periodo di trattamento i ratti, anestetizzati mediante un'iniezione di cloralio idrato (40mg/100g di peso corporeo), sono stati sacrificati con la medesima procedura eseguita per il sacrificio degli animali del precedente disegno ed è stato prelevato loro, dagli arti posteriori, il muscolo scheletrico. Questo tessuto è stato ripulito dall'eccesso di connettivo, finemente sminuzzato, omogeneizzato in un'apposita soluzione fisiologica ed utilizzato, poi, per l'isolamento delle due popolazioni mitocondriali che lo contraddistinguono: i mitocondri subsarcolemmatici (SS) ed i mitocondri intermiofibrillari (IMF). Questi due gruppi di mitocondri, che presentano caratteristiche

biochimiche e funzionali diverse, sono stati isolati mediante una serie di centrifugazioni differenziali.

3° DISEGNO SPERIMENTALE: FEGATO E RELATIVE MISURE

Per lo svolgimento del terzo disegno sperimentale sono stati utilizzati 16 ratti maschi Wistar di circa 90 giorni di età. Così come descritto precedentemente, sono stati ripartiti in due gruppi in base al loro peso medio (440 g), stabulati singolarmente per gabbia ad una temperatura di circa 24°C e sono stati sottoposti ad un ciclo circadiano artificiale luce/buio di 12 ore (06.30-18.30).

Questi due gruppi di animali sono stati sottoposti agli stessi regimi di dieta descritti per i ratti dei precedenti disegni sperimentali.

Allo scadere delle sette settimane di trattamento, i ratti, anestetizzati con cloralio idrato (40mg/100g peso corporeo), sono stati sacrificati mediante decapitazione ed è stato prelevato loro il fegato. Una piccola quantità di tale organo è stata omogeneizzata con acqua (volume finale uguale a due volte il peso del fegato) ed è stata utilizzata per la determinazione del contenuto lipidico. La restante parte di fegato, invece, è stata finemente sminuzzata ed omogeneizzata in un'apposita soluzione fisiologica e, così come proceduto per il muscolo scheletrico, anche da quest'organo sono stati isolati i mitocondri mediante una serie di centrifugazioni differenziali.

Tabella 1. Composizione delle diete

Componenti delle diete (g/100g)	Dieta ipolipidica	Dieta iperlipidica
Mangime standard ¹	100.0	28.0
Carne liofilizzata ²	39.5
Burro	17.8
Alphacel	12.0
AIN 76 Mineral mix ³	2.0
AIN 76 Vitamin mix ⁴	0.7
Densità energetica (KJ/g)	15.88	19.85
Proteine	29.0	29.0
Lipidi	10.6	50.0
Carboidrati	60.4	21.0

¹Mucedola 4 RF21, Settimo Milanese, Milano.

²Liomellin STAR S.p.a. Milano, Italia, contenente (in 10 g) : 5.8 g di proteine (Nx 6,25), 1.2 g di lipidi, 2.57 g di carboidrati, 0.2 g di minerali, 0.2 g di acqua.

³AIN= American Institute of Nutrition (1977).

⁴AIN= American Institute of Nutrition (1980).

Tabella 2. Composizione in acidi grassi (g/100g di acidi grassi) delle diete ipolipidica ed iperlipidica

Acidi grassi	Dieta ipolipidica	Dieta iperlipidica
C _{4:0} – C _{10:0}	0	4.1
C _{12:0}	0	1.3
C _{14:0}	0	4.3
C _{16:0}	16.3	20.7
C _{18:0}	2.9	6.6
C _{14:1}	0	0.6
C _{16:1}	0.8	1.4
C _{18:1}	22.8	24.7
C _{20:1}	1.8	0.9
C _{22:1}	1.4	0.8
C _{18:2}	50.0	31.5
C _{18:3}	4.0	3.1
Totale acidi grassi a corta e a media catena	0	10.3
Totale acidi grassi a lunga catena	100	89.7

MISURE 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 DELLA COMPOSIZIONE CORPOREA

Dall'omogenato di carcassa vengono prelevate delle aliquote per la determinazione del contenuto di lipidi e di acqua.

Per quanto riguarda il contenuto lipidico, esso è stato determinato gravimetricamente, in accordo con il metodo di Folch [Folch & coll. (1957)]. Il primo passaggio della procedura consiste in una estrazione dei lipidi dall'omogenato di carcassa diluito 20 volte in una miscela di cloroformio-metanolo (2:1), seguita da filtrazione. Nel passaggio successivo, al filtrato ottenuto si aggiungono 0,2 volumi di NaCl 0,29%. Dopo agitazione vigorosa di 30 minuti e una centrifugazione a 1000 g per 20 minuti a 21°C si ottengono due fasi: una superiore acquosa ed una inferiore lipidica. La fase superiore viene aspirata e l'interfaccia viene lavata con una miscela cloroformio-metanolo-NaCl (3:48:47) con lo scopo di eliminare i contaminanti non lipidici dell'estratto. La fase lipidica così ottenuta viene versata in palloni di vetro, di cui è noto il peso, dai quali il solvente viene fatto evaporare mediante l'ausilio di un evaporatore rotante (Heidolph, Germania). Si risale così al peso dei lipidi per grammo di carcassa e, attraverso il coefficiente 39.2 KJ/g, il contenuto lipidico è convertito in KJ di energia corporea depositata sotto forma di lipidi.

L'energia corporea depositata sotto forma di proteine è stata determinata sottraendo al contenuto energetico totale della carcassa, ottenuto alla bomba calorimetrica, il contenuto energetico lipidico. Il valore ottenuto diviso per una costante indicante il contenuto energetico per grammo di proteina (23.5 KJ/g), fornisce il contenuto proteico della carcassa.

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 stufa a secco e lasciate essiccare per 48 ore a 60°C.

Dopo ciò, per differenza tra il peso delle vaschette contenenti l'omogenato prima e dopo l'essiccazione, è stato determinato il contenuto di acqua della carcassa.

MISURA DEL CONTENUTO LIPIDICO DEL FEGATO

Il contenuto lipidico epatico, così come quello della carcassa, è stato determinato gravimetricamente in accordo con il metodo di Folch [Folch & coll. (1957)]. Il primo passaggio della procedura consiste in una estrazione dei lipidi dall'omogenato di fegato diluito 20 volte in una miscela di cloroformio-metanolo (2:1), seguita da filtrazione. Nel passaggio successivo, al filtrato ottenuto si aggiungono 0,2 volumi di NaCl 0,29%. Dopo agitazione vigorosa di 30 minuti e una centrifugazione a 1000 g per 20 minuti a 21°C si ottengono due fasi: una superiore acquosa ed una inferiore lipidica. La fase superiore viene aspirata e l'interfaccia viene lavata con una miscela cloroformio-metanolo-NaCl (3:48:47) con lo scopo di eliminare i contaminanti non lipidici dell'estratto. La fase lipidica così ottenuta viene versata in palloni di vetro, di cui è noto il peso, dai quali il solvente viene fatto evaporare mediante l'ausilio di un evaporatore rotante (Heidolph, Germania). Si risale così al peso dei lipidi per grammo di fegato.

MISURA DEL BILANCIO ENERGETICO

Durante il periodo di trattamento, al fine di stabilire il guadagno di peso corporeo e l'introito energetico lordo, sono stati giornalmente controllati e misurati sia il peso corporeo degli animali sia la quantità di cibo introdotta, sottraendo eventualmente quella persa durante l'assunzione del pasto. Inoltre le feci sono state quotidianamente raccolte, essiccate in una stufa e con procedimento analogo a quello seguito per la carcassa, dopo essere state sminuzzate e trasformate in pasticche di circa 200 mg, sono state ossidate all'interno del calorimetro adiabatico Parr per determinarne il contenuto energetico.

Con la medesima procedura è stato possibile stabilire il contenuto energetico lordo delle diete con cui sono stati alimentati i ratti e che risultano essere di 15.88 KJ/g per la dieta ipolipidica e 19.85 KJ /g per la dieta iperlipidica.

Il valore dell'energia metabolizzabile (ME) introdotta è stata, dunque, determinata sottraendo l'energia contenuta nelle feci dall'introito energetico lordo e moltiplicando il valore ottenuto per il fattore di correzione dell'energia persa con le urine che è pari a 0.96 [Barr HG. & coll. (1984)].

Il guadagno energetico corporeo è stato calcolato mediante differenza tra il contenuto energetico finale ed iniziale corporeo. Per stimare il

contenuto energetico corporeo iniziale è stato preso come riferimento quello del gruppo di ratti sacrificati all'inizio del periodo sperimentale. Nella medesima maniera, è stato calcolato il guadagno proteico e lipidico.

La spesa energetica è stata determinata dalla differenza tra la ME introdotta ed il guadagno energetico corporeo.

È stato poi possibile calcolare il costo di deposito delle proteine e dei lipidi, tenendo conto che il costo energetico per il deposito di 1 KJ di proteine è di 1.25 KJ [Pullar JD. & coll. (1977)], mentre quello corrispondente per il deposito di 1 KJ di lipidi è 0.36 KJ per le diete ad elevato contenuto di carboidrati e 0.16 KJ per quella iperlipidica [Lee YP.& coll.(1965)]. Dalla differenza tra la spesa energetica ed il costo di deposito totale (dato dalla somma di quello proteico e quello lipidico), è stato possibile risalire alla spesa energetica netta (NEE).

Inoltre, è stato determinato il rapporto, espresso in %, tra il guadagno energetico corporeo e la ME introdotta durante tutto il periodo di trattamento. Tale rapporto rappresenta l'efficienza metabolica, cioè, la percentuale di ME trattenuta sotto forma di energia corporea. La diminuzione del suddetto rapporto sta ad indicare un calo dell'efficienza metabolica. In tal caso è necessario introdurre una quantità di energia più elevata di quella richiesta teoricamente,

affinché il peso corporeo aumenti di un solo grammo. Si può dedurre quindi, che l'energia introdotta in eccesso, anziché indurre un aumento di peso, provoca una produzione extra di calore. D'altra parte, un aumento del rapporto denota una maggiore efficienza del cibo, pertanto diminuisce la quantità di energia da introdurre per aumentare il peso corporeo di un grammo. E' stato anche determinato il rapporto espresso in % tra la spesa energetica netta e la ME introdotta durante tutto il periodo di trattamento. Tale rapporto rappresenta la percentuale di ME utilizzata dall'organismo e quindi eliminata sottoforma di calore. Concettualmente è una misura esattamente opposta a quella dell'efficienza metabolica, un suo aumento indica, infatti, che una maggior percentuale di ME è stata utilizzata dall'organismo e non viene depositata sottoforma di energia corporea. Quindi, in generale, se l'efficienza metabolica aumenta, il rapporto percentuale tra la spesa energetica netta e la ME dovrebbe diminuire.

DETERMINAZIONE DEI LIVELLI PLASMATICI DI NEFA, GLUCOSIO E INSULINA

I campioni di sangue, posti in apposite provette contenente l'anticoagulante, sono stati centrifugati alla velocità di 1400 g per 8 minuti, alla temperatura di 4°C. E' stato poi rimosso il plasma che è stato conservato ad una temperatura di -20°C fino a quando i campioni sono stati utilizzati per la determinazione delle misure di interesse. In particolare si è provveduto alla misura dei livelli plasmatici di NEFA, glucosio e insulina.

I NEFA e il glucosio sono stati valutati mediante un metodo enzimatico calorimetrico usando un kit commerciale (Roche Diagnostic, Italia per gli FFA e Pokler, Italia, per il glucosio).

I livelli di insulina sono stati, infine, determinati mediante il dosaggio ELISA che sfrutta il metodo del doppio anticorpo (sandwich) ed utilizza come enzima coniugato alla perossidasi di rafano. In seguito all'aggiunta del substrato della perossidasi, si sviluppa un composto colorato la cui intensità è proporzionale alla quantità di enzima presente.

TEST DI TOLLERANZA AL GLUCOSIO

Per effettuare il test di tolleranza al glucosio i ratti, messi a digiuno per sei ore (dalle ore 9:00 del mattino), sono stati sottoposti ad un piccolo taglio all'estremità della coda, mediante il quale è stato possibile prelevare un primo campione di sangue venoso (il cosiddetto punto 0).

A seguito di un'iniezione intraperitoneale di glucosio (2g/Kg), sono stati prelevati diversi campioni di sangue in diversi tempi: a 20, 40, 60, 90, 120 e 150 minuti di distanza dall'iniezione, in modo tale da permettere la realizzazione di una curva da carico del glucosio.

Dopo centrifugazione a 1400 g per 8 minuti a 4°C è stato rimosso il plasma dai campioni e conservato ad una temperatura di -20°C fino al momento del suo utilizzo per la determinazione di substrati ed ormoni.

La determinazione plasmatica di glucosio ed insulina è stata effettuata mediante gli stessi dosaggi descritti in precedenza.

ISOLAMENTO DELLE FRAZIONI MITOCONDRIALI DEL MUSCOLO SCHELETRICO

Per l'isolamento dei mitocondri SS ed IMF si è proceduto come descritto in Figura 7. Il muscolo è stato, quindi, liberato dall'eccesso di grassi e di tessuto connettivo e sminuzzato in una soluzione contenente KCl 100 mM, TRIS 50 mM, MgCl₂ 5 mM, EDTA 1 mM, EGTA 5 mM, 0.1% (peso/volume) di BSA libera da acidi grassi, ad un pH di 7.5.

In particolare i frammenti di muscolo sono stati omogeneizzati nella suddetta soluzione (1,8 peso/volume) in un omogeneizzatore Potter Elvehjem (Heidolph, Kelheim, Germany) regolato a 500 rpm (4 colpi al minuto). L'omogenato è stato poi centrifugato a 500 g per 10 minuti ed il pellet che ne è derivato è stato usato per la preparazione dei mitocondri IMF, mentre il surnatante è stato utilizzato per isolare i mitocondri SS. Il surnatante è stato centrifugato a 3000 g per 10 minuti ed il pellet che ne è risultato, contenente i mitocondri SS, è stato risospeso e centrifugato due volte e alla fine sospeso in un mezzo contenente saccarosio 250 mM, TRIS 50 mM, 0.1% di BSA ad un pH di 7.5.

Il pellet derivato dalla centrifugazione a 500 g è stato trattato con proteasi Nagarse (8.3 U/g di tessuto) per 5 minuti. La sospensione è

stata poi omogeneizzata, filtrata attraverso una garza sterile e centrifugata a 3000 g per 10 minuti. Il surnatante è stato eliminato ed il pellet è stato risospeso e centrifugato a 500 g per 10 minuti. Il surnatante contenente i mitocondri IMF è stato centrifugato a 3000 g per 10 minuti. Il pellet è stato risospeso e centrifugato una sola volta e sospeso infine in un mezzo contenente saccarosio 250 mM, TRIS 50 mM, 0.1% di BSA ad un pH 7.5. Caratterizzazioni enzimatiche e microscopiche hanno dimostrato che, questa procedura da me utilizzata per l'isolamento fornisce una frazione mitocondriale con un buon grado di purezza.

ISOLAMENTO DEI MITOCONDRI EPATICI

Per l'isolamento dei mitocondri, 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 bovina libera da acidi grassi (BSA) a pH 7.4, in un omogeneizzatore Potter Elvehjem settato a 500 rpm (Fig. 8). L'omogenato è stato poi filtrato attraverso una garza sterile e i suoi campioni sono stati usati per le misure della respirazione. L'utilizzo dell'omogenato serve a collegare la capacità ossidativa mitocondriale con l'effettiva massa delle proteine mitocondriali.

Tramite una centrifugazione a 1000 g per 10 minuti, l'omogenato è stato privato di cellule intatte e nuclei; i surnatanti ottenuti sono stati ulteriormente centrifugati a 3000 g per 10 minuti. Quindi 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 BSA libera da acidi grassi, a pH 7.0. Caratterizzazioni enzimatiche e microscopiche hanno dimostrato che, questa procedura utilizzata per l'isolamento dei mitocondri (centrifugazioni a 3000 g per 10 minuti), fornisce una frazione cellulare che è costituita essenzialmente da mitocondri.

FIGURA 7. Isolamento dei mitocondri subsarcolemmatici (SS) ed intermiofibrillari (IMF)

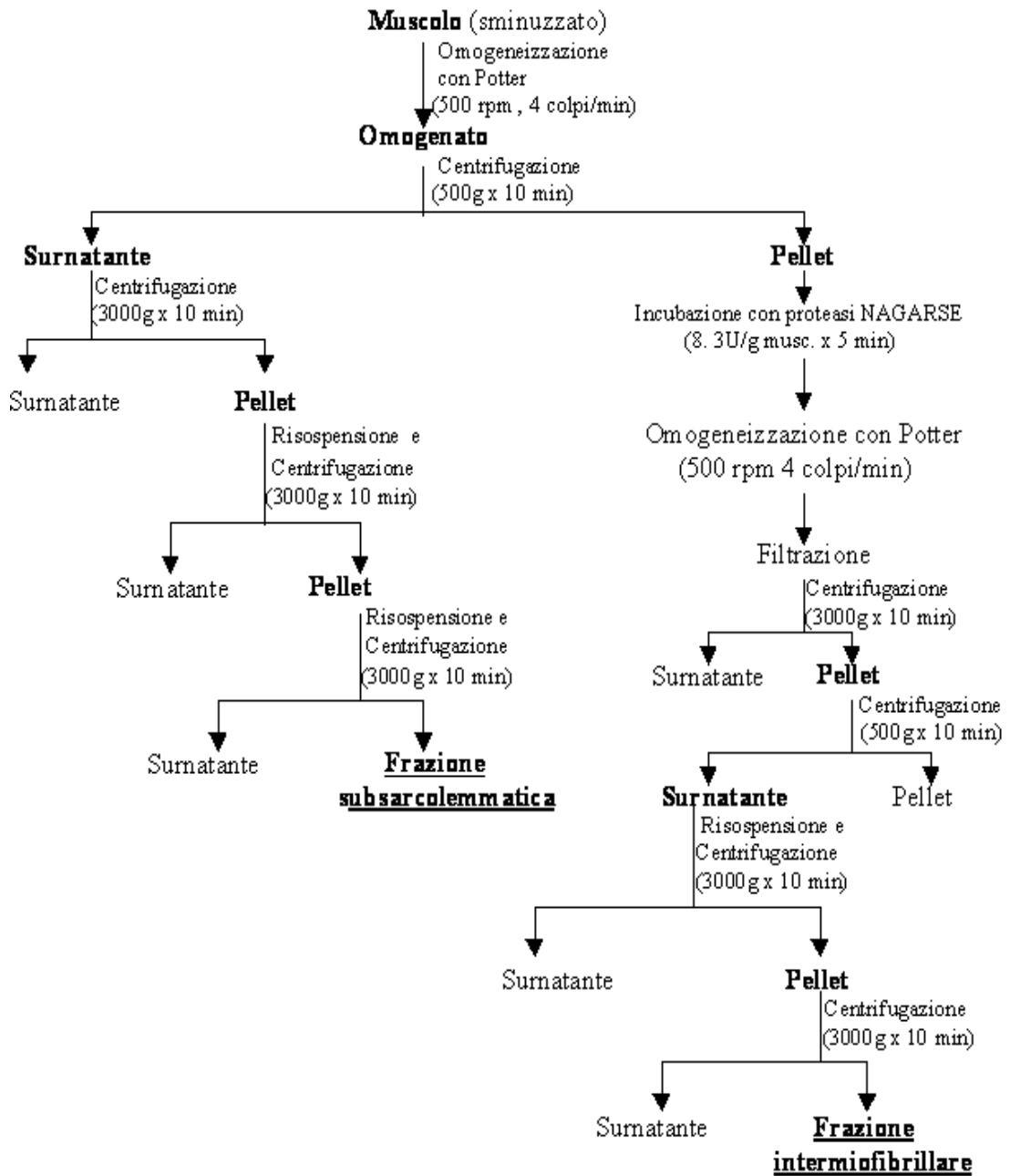
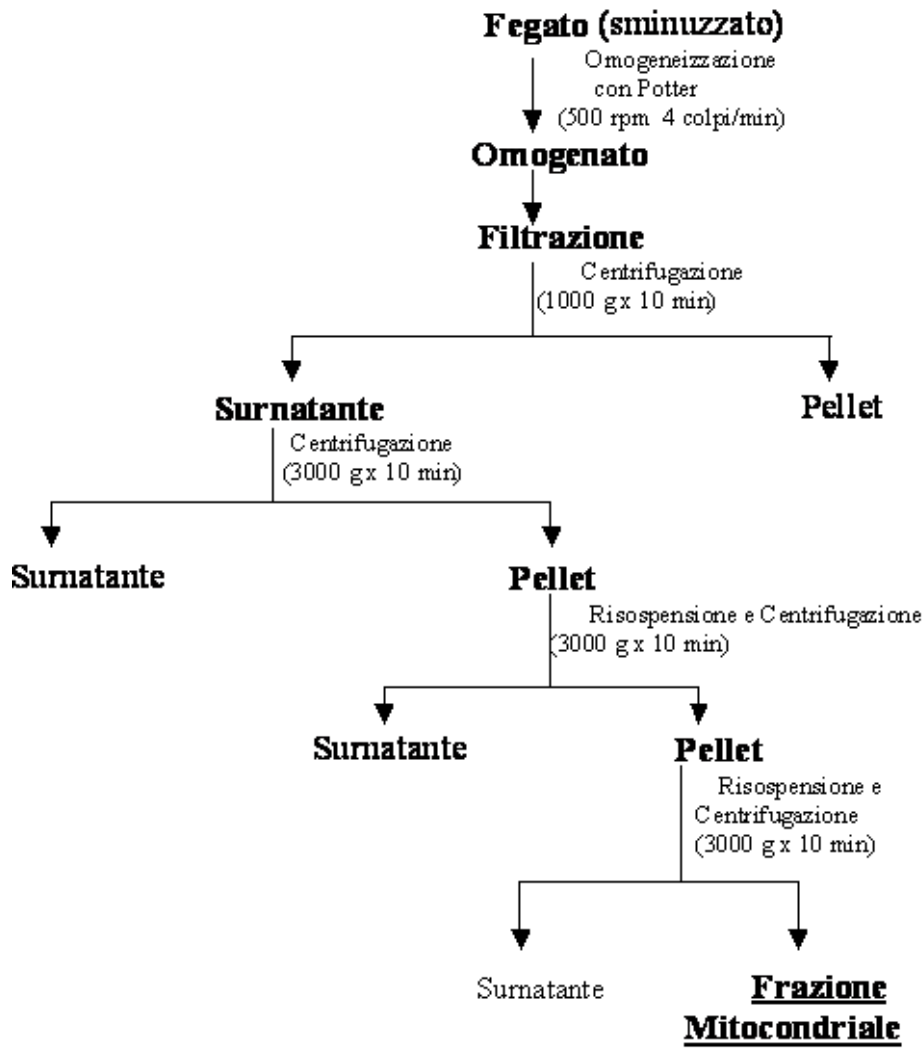


FIGURA 8. Isolamento dei mitocondri di fegato



DETERMINAZIONE DEL CONTENUTO PROTEICO MITOCONDRIALE

Il contenuto proteico della sospensione mitocondriale è stato determinato con il metodo di Hartree [Hartree EF. (1972)], una modificazione del metodo di Lowry, utilizzando l'albumina di siero bovino come proteina standard. Questo metodo combina la reazione del biuretto con la reazione di Folin-Ciocalteu. Il colore che si sviluppa proviene dalla riduzione degli acidi fosfotungstico e fosfomolibdico a blu di tungsteno e blu di molibdeno, operata dal complesso Cu-proteina, dal triptofano e dalla tirosina delle proteine in ambiente alcalino. La modifica rispetto al metodo di Lowry consiste in un aumento della concentrazione di tartrato sodico-potassico, e nell'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'ATTIVITA' RESPIRATORIA SUI MITOCONDRI ISOLATI

Il consumo d'ossigeno è stato misurato nei mitocondri SS e IMF e in quelli epatici 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 di teflon. L'ossigeno diffonde attraverso la membrana dalla soluzione presente nella camera di misura al compartimento dell'elettrodo. In questo modo, 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 di ossigeno al catodo. La tensione di 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 effettuate in camere termostate ad una temperatura di 30°C utilizzando, per i mitocondri del muscolo

scheletrico, un mezzo di incubazione contenente KCl 30 mM, MgCl₂ 6 mM, saccarosio 75 mM, EDTA 1 mM, KH₂PO₄ 20 mM, 0.1% (peso/volume) di BSA libera da acidi grassi ad un pH di 7.0; per i mitocondri epatici è stato utilizzato un mezzo di incubazione contenente KCl 80 mM, HEPES 50 mM, K₂HPO₄ 5 mM, EGTA 1 mM, 0.1 % (peso/volume) di BSA libera da acidi grassi, a pH 7.

Prima di procedere alla misura del consumo di ossigeno, i campioni sono indotti a consumare i substrati endogeni, mediante una preincubazione di qualche minuto, alla fine della quale sono aggiunti i substrati respiratori.

I substrati usati per la respirazione sono stati: succinato (10 mM) in presenza di rotenone (3.75 μM); glutammato (10 mM) in presenza di malato (2.5 mM); palmitoil-CoA (40 μM) in presenza di malato (2.5 mM) e di carnitina (2.0 mM).

Le misure sono state fatte in assenza (Stato 4) e in presenza (Stato 3) di 0.6 mM di ADP.

MISURA DEL POTENZIALE DI MEMBRANA

Il potenziale di membrana mitocondriale è stato misurato utilizzando la misura spettrofotometrica (spettrofotometro JASCO a doppia lunghezza d'onda) [Nedergaard J. (1983)] di un colorante carico, la safranina O, che ha la peculiarità di legarsi alla membrana mitocondriale in maniera direttamente proporzionale al potenziale. È stato utilizzato uno spettrofotometro a doppia lunghezza d'onda (511-533), in cui la lunghezza d'onda di riferimento è il cosiddetto punto isosbastico, ossia quel punto dello spettro d'assorbimento in cui il colorante presenta la stessa assorbanza a prescindere dal suo stato, che nel caso della safranina è legato o non legato alla membrana mitocondriale.

La lunghezza d'onda di lettura è, invece, quella in cui l'assorbanza cambia al variare dello stato del colorante.

In presenza di valinomicina 3 μM che è un trasportatore specifico del potassio, e di quantità crescenti di una soluzione di KCl necessarie ad alterare la concentrazione esterna di K^+ ($[\text{K}^+]_{\text{out}}$) nel range 0.1-20 mM, è stata tracciata una retta di taratura da cui si è risalito alla $[\text{K}^+]_{\text{intra}}$ ed extramitocondriale e mediante l'equazione di Nernst: $\Delta\psi = 61 \text{ mV} \cdot \log ([\text{K}^+]_{\text{intra}} / [\text{K}^+]_{\text{out}})$ si è risalito al potenziale di membrana dei

mitocondri. La misura del potenziale di membrana ci ha permesso di valutare le due componenti dell'efficienza mitocondriale, cioè la conduttanza protonica basale e la conduttanza protonica indotta.

MISURA DELLA CONDUTTANZA PROTONICA BASALE

La conduttanza protonica basale è stata valutata applicando il metodo descritto da Brand [Brand MD. (1990)] che consiste nel valutare le variazioni del potenziale di membrana mitocondriale associate alle variazioni del consumo di ossigeno, ottenute mediante titolazione con quantità crescenti di malonato a partire dallo Stato 4 della respirazione in presenza di oligomicina, utilizzando succinato come substrato FAD-dipendente. Il malonato è un inibitore della catena respiratoria, mentre l'oligomicina è un antibiotico che inibisce l'ATP sintetasi prevenendo il passaggio di H^+ attraverso la subunità F_0 . L'utilizzo di oligomicina è fondamentale in questa misura in quanto, per poter determinare la conduttanza protonica basale, è necessario abolire il flusso protonico attraverso l'ATP sintetasi. Le misure sono state effettuate a 30°C ed i mitocondri sono stati incubati in una soluzione contenente LiCl 30 mM, $MgCl_2$ 6 mM, saccarosio 75 mM, EDTA 1 mM, Tris- PO_4 20 mM, 0.1% (peso/volume) di BSA libera da acidi grassi, pH 7.0. La titolazione dello Stato 4 è stata eseguita attraverso aggiunte consecutive di malonato in presenza di succinato (10 mM), rotenone (3.75 μ M), oligomicina (2 μ g/ml), safranina O (83.3 nmol/mg) e nigericina (80 ng/ml).

La nigericina, essendo uno scambiatore H^+/K^+ , è capace di annullare la differenza di pH ai lati della membrana mitocondriale interna convertendola in differenza di potenziale elettrico in modo che il gradiente elettrochimico protonico sia rappresentato solo dal potenziale di membrana.

MISURA DELLA CONDUTTANZA PROTONICA INDOTTA DAGLI ACIDI GRASSI

La conduttanza protonica indotta da acidi grassi è stata valutata dalla titolazione della respirazione con aggiunte sequenziali di malonato, fino ad una concentrazione di 0,6 mM, e parallela registrazione del potenziale di membrana [Nedergaard J. (1983)]. Il potenziale di membrana mitocondriale ed il consumo d'ossigeno sono stati misurati come descritto precedentemente in presenza di succinato 10 mM, rotenone 3,75 μ M, oligomicina 2 μ g/ml, safranina O (83,3 nmol/mg) e di palmitato 45 μ M per i mitocondri SS e 75 μ M per gli IMF e per i mitocondri epatici. L'effetto disaccoppiante degli acidi grassi è stato misurato determinando la diminuzione di potenziale di membrana e l'incremento di respirazione provocato dall'aggiunta di quantità fisiologiche di un acido grasso libero, l'acido palmitico.

DETERMINAZIONE DELL'ATTIVITA' DELL'ACONITASI MITOCONDRIALE

Aconitasi parziale

L'aconitasi, il secondo enzima del ciclo di Krebs, catalizza l'interconversione reversibile di acido citrico in isocitrico, che viene poi ossidato dalla isocitrico deidrogenasi ad α -chetoglutarato, con formazione di NADP ridotto. Poiché il NADPH assorbe a 340 nm, il dosaggio dell'aconitasi viene effettuato spettrofotometricamente, misurando l'aumento di assorbanza a 340nm dovuto proprio alla formazione di NADPH.

Il dosaggio dell'aconitasi è un metodo sensibile per misurare i danni "in vivo" prodotti dai radicali liberi sulla funzione delle macromolecole biologiche [Gardner PR. (2002)]. Infatti l'aconitasi è particolarmente sensibile all'attacco e all'inattivazione da parte dei radicali ossigeno [Fridovich I. (1995); Flint DH. (1993); Gardner PR. & coll. (1997); Drapier JC. (1996)], per cui la sua attività è danneggiata dalla presenza di elevati livelli di radicali liberi.

Per il dosaggio si utilizzano campioni di mitocondri congelati in azoto liquido immediatamente dopo l'isolamento e conservati alla temperatura di -80°C , in quanto l'attività dell'aconitasi si danneggia in tempi molto brevi.

I campioni si incubano a 25°C in un tampone costituito da Tris-HCl 50mM (pH 7.4) e MnCl₂ 0.6mM, NADP⁺ 0.2 mM, sodio-citrato 30 mM e 2 U/ml di isocitrico deidrogenasi.

La misura è realizzata in presenza del Triton 1%, allo scopo di rompere la membrana mitocondriale e solubilizzare l'enzima per poterlo dosare.

La determinazione dell'attività dell'aconitasi è stata effettuata monitorando l'assorbanza a 340 nm ogni minuto per 50 minuti (SS) o 90 minuti (IMF e mitocondri epatici). L'attività dell'aconitasi è calcolata usando il coefficiente di estinzione molare ϵ del NADPH, $6,22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, e assumendo la conversione di una molecola di citrato in una molecola di NADPH mediante l'isocitrico deidrogenasi. Quindi, dalla media dei $\Delta A_{\text{min}}^{-1}$ per ogni campione, si calcola la molarità del NADP ridotto formatosi al minuto, corrispondente all'attività dell'aconitasi.

Assumendo inoltre che una milliunità di attività dell'aconitasi rappresenti la quantità che catalizza la conversione di 1 nmol di citrato in isocitrato al minuto, si calcola l'attività dell'enzima espressa come mU/mg di proteine mitocondriali.

Aconitasi totale

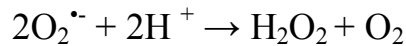
L'enzima attivo contiene un nucleo $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$, tre degli ioni ferro sono legati a residui di cisteina, mentre il quarto interagisce con il citrato o l'isocitrato durante il ciclo catalitico.

In presenza di radicali liberi si ha una rapida inattivazione dell'aconitasi a causa della perdita di ferro, che determina l'inattivazione dell'enzima. Questa perdita di ferro può essere recuperata in condizioni riducenti e in presenza di ferro, per questo motivo nella determinazione dell'attività aconitasica totale rispetto a quella parziale si aggiunge nelle provette: solfato ammonio ferroso 0.2 mM, Na_2S 0.2 mM e DL-ditiotreitolo (DTT) 50 mM, quest'ultimo impedisce al ferro di ossidarsi. In questo modo non si verifica la perdita di attività da parte dell'aconitasi e si può quindi calcolare l'attività totale dell'aconitasi seguendo le stesse procedure seguite per la determinazione dell'aconitasi parziale.

Una volta determinate entrambe le misure dell'aconitasi, si utilizza il rapporto tra l'attività dell'aconitasi parziale e l'attività dell'aconitasi totale, per evidenziare in presenza di un'alterazione dell'attività enzimatica se questa è realmente dovuta all'azione di ROS, oppure ad un riarrangiamento delle proteine mitocondriali messo in atto dalla cellula.

DETERMINAZIONE DELL'ATTIVITA' DELLA SUPEROSSIDO DISMUTASI

La superossido dismutasi è un enzima che catalizza la reazione:



Quindi ha il compito di ripulire la cellula dai radicali liberi e mantiene la concentrazione dei radicali ossigeno ad un livello straordinariamente basso in diverse cellule e organelli [Imley JA. (1991)].

Il dosaggio della superossido dismutasi si realizza spettrofotometricamente andando a monitorare la velocità di riduzione del citocromo c, utilizzando il sistema xantina-xantina ossidasi come produttore di $\text{O}_2^{\cdot-}$. La superossido dismutasi, competendo con i radicali $\text{O}_2^{\cdot-}$ che determinano la riduzione del citocromo c, provoca una diminuzione della velocità di riduzione del citocromo c. Il dosaggio si effettua spettrofotometricamente ad una lunghezza d'onda di 550 nm, utilizzando il metodo descritto da Flohè ed Otting [Flohè L. & Otting F. (1994)].

Si incubano per dieci minuti i mitocondri, diluiti 1:10, in una soluzione contenente KH_2PO_4 50 mM, EDTA 0.1 mM e Triton 0.2%. Al termine dell'incubazione si procede alla misura del campione, utilizzando un buffer costituito da KH_2PO_4 50 mM, EDTA 0.1 mM,

KCN 2 mM, xantina 0.1 mM, NaOH 0.1 mM, citocromo c 20 e 0.0033 U/ml di xantina ossidasi.

Viene effettuata anche una misura della riduzione del citocromo c in un bianco, misura effettuata con tutti i reagenti tranne il campione. Si costruisce poi una curva di calibrazione in cui il reciproco delle variazioni di assorbanza al minuto del citocromo c è riportato in funzione della concentrazione di proteine del campione e si ottiene una relazione di tipo lineare, dalla quale è possibile ricavare l'attività del campione, espressa come Unità/mg di proteine, sapendo che una Unità di superossido dismutasi è definita come la quantità di enzima che inibisce del 50% la riduzione del citocromo c.

PEROSSIDAZIONE LIPIDICA

La perossidazione lipidica, importante indice del danno ossidativo, è un fenomeno che avviene sia nelle piante sia negli animali e coinvolge la formazione e la propagazione dei radicali lipidici. L'attacco dei radicali determina un riarrangiamento dei doppi legami insaturi dei grassi, ed un'eventuale distruzione dei lipidi di membrana, con la produzione di tutta una serie di prodotti, tra cui alcoli, chetoni, aldeidi ed eteri. Le membrane biologiche sono spesso ricche di acidi grassi insaturi e sono immerse in un fluido ricco di ossigeno e contenente metallo. Pertanto i lipidi di membrana sono facilmente suscettibili all'attacco perossidativo.

La perossidazione lipidica è stata determinata sperimentalmente misurando l'assorbanza a 530nm dei substrati reattivi all'acido tiobarbiturico (TBARS), che si formano dalla reazione tra il prodotto della perossidazione lipidica (la malondialdeide) e l'acido tiobarbiturico.

I TBARS che si formano durante tale reazione sono stati calcolati utilizzando il coefficiente di estinzione molare (ϵ) pari a $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ed espressi in nmolTBARS/mg di proteine.

Per il dosaggio sono stati utilizzati solo campioni di mitocondri congelati in azoto liquido subito dopo l'isolamento e conservati a -

80°C. Tali campioni sono stati poi incubati a temperatura ambiente in un mezzo contenente KCl 17mM, Tris-HCl 1mM a pH 7.4, TCA al 40%, TBA allo 0.67% e BHT al 2%.

DETERMINAZIONE DELLA MASSA PROTEICA MITOCONDRIALE

La massa proteica mitocondriale è stata valutata misurando l'attività dell'enzima marker mitocondriale citrato sintasi negli omogenati e nei mitocondri isolati, in accordo con Srere [Srere PA. (1969)].

La citrato sintasi è il primo enzima del ciclo di Krebs che catalizza la reazione:



La misura si realizza incubando, alla temperatura di 30°C, i mitocondri o l'omogenato, diluiti 1:10 in Triton 0,5%, in un buffer costituito da DTNB (1 mM), Acetil-CoA (10 mM), Ossalacetato (10 mM). Inoltre la misura è realizzata in presenza del Triton 0,5%, allo scopo di rompere la membrana mitocondriale e solubilizzare l'enzima per poterlo dosare.

La determinazione dell'attività della citrato sintasi è stata effettuata spettrofotometricamente monitorando l'assorbanza ad una lunghezza d'onda di 412 nm ogni 30 secondi per tre minuti, utilizzando il metodo descritto da Srere [Srere PA. (1969)].

L'attività della citrato sintasi è calcolata usando il coefficiente di estinzione molare $\varepsilon = 13600 \text{ M}^{-1}$. Quindi, dalla media dei $\Delta A \text{ min}^{-1}$ per ogni campione, si calcola la molarità del CoA formatosi al minuto,

corrispondente all'attività della citrato sintasi, per i mg di proteine mitocondriali o i g di tessuto incubati.

L'attività della citrato sintasi, misurata negli omogenati e espressa per g di fegato fresco, rispecchia il prodotto della massa proteica mitocondriale e della attività specifica dell'enzima citrato sintasi. Per determinare l'attività specifica della citrato sintasi, le misure sono state fatte anche nei mitocondri isolati, e i risultati sono espressi per milligrammo di proteine mitocondriali. Infine, la massa proteica mitocondriale espressa in milligrammi/grammo di fegato fresco, è stata calcolata come il rapporto tra l'attività della citrato sintasi negli omogenati e nei mitocondri isolati.

ANALISI STATISTICHE

I dati riportati sono le medie \pm SEM. Le analisi statistiche sono state compiute usando il test "t di Student." Valori di probabilità minori di 0.05 sono stati considerati statisticamente significativi, Tutte le analisi sono state effettuate usando il programma GraphPad Prism (Graphpad Software Inc., San Diego, CA, USA).

RISULTATI

RISULTATI 1° DISEGNO SPERIMENTALE

Nella Tabella 3 sono riportati i risultati relativi alle variazioni del peso corporeo, del contenuto energetico e della composizione corporea nei ratti alimentati per 7 settimane con la dieta iperlipidica, rispetto ai ratti alimentati con la dieta ipolipidica. I risultati ottenuti mostrano che, nei ratti alimentati con la dieta ricca in grassi, il peso corporeo è incrementato (circa 8%) senza però raggiungere la significatività statistica. Inoltre, i risultati mettono in evidenza che i ratti alimentati con la dieta iperlipidica presentano un contenuto di energia corporea e una percentuale di grasso corporeo significativamente più alti dei ratti alimentati con la dieta povera di grassi, mentre le percentuali di acqua corporea e di proteine sono significativamente più basse.

Nella Tabella 4 sono riportati i risultati relativi alle variazioni dell'energia metabolizzabile (ME) introdotta e dell'introito calorico lipidico, proteico e glicidico nei ratti alimentati per 7 settimane con la dieta iperlipidica, rispetto ai ratti alimentati con la dieta ipolipidica. I risultati ottenuti indicano che non vi sono variazioni significative tra la ME introdotta tra i due gruppi di ratti, anche se, a causa della composizione della dieta iperlipidica, i ratti alimentati con tale dieta presentano un introito di grassi più elevato ed un introito di carboidrati più basso, mentre resta abbastanza simile l'introito proteico.

Nella Tabella 5 sono riportati i dati relativi alle variazioni del guadagno energetico, lipidico e proteico corporeo nei ratti alimentati per 7 settimane con la dieta iperlipidica, rispetto ai ratti alimentati con la dieta povera di grassi. I risultati ottenuti mostrano un aumento significativo dell'energia corporea, quasi esclusivamente sotto forma di grasso, nel gruppo di ratti alimentati con la dieta iperlipidica. Infatti, il guadagno di energia corporea sotto forma di proteine è notevolmente diminuito.

Nella Tabella 6 sono riportati i risultati relativi alle variazioni della spesa energetica e della spesa energetica netta (NEE), del costo del deposito dell'energia corporea e dei parametri dell'efficienza metabolica. I dati evidenziano che non ci sono variazioni significative nei ratti alimentati con la dieta iperlipidica della spesa energetica e della NEE (valore ottenuto sottraendo alla spesa energetica il costo totale di deposito dell'energia corporea) anche se tali valori sono sempre leggermente più bassi dei valori trovati nei ratti alimentati con la dieta ipolipidica. La dieta iperlipidica è anche associata con una significativa diminuzione del costo totale di deposito dell'energia corporea dovuto ad una diminuzione del costo energetico di deposito sia delle proteine sia dei grassi. Per quanto concerne l'efficienza metabolica, questa aumenta significativamente nei ratti alimentati con

la dieta ricca in grassi rispetto a quelli alimentati con la dieta ipolipidica, evidenziando che i primi sono metabolicamente più efficienti dei ratti alimentati con la dieta povera di grassi. Tale risultato è confermato dalla diminuzione significativa del rapporto percentuale tra NEE/ME.

Nella Tabella 7 sono riportati i dati sulla caratterizzazione metabolica dei ratti alimentati con le due diete, ottenuta misurando le concentrazioni plasmatiche di insulina e di glucosio, nonché quelle degli acidi grassi non esterificati (NEFA) nello stato post-assorbitivo. Le concentrazioni plasmatiche di insulina e di glucosio non mostrano nessuna variazione significativa mentre le concentrazioni dei NEFA sono significativamente più alte nei ratti alimentati con la dieta iperlipidica rispetto ai ratti alimentati con la dieta ipolipidica.

Infine, la Figura 9 mostra i risultati del test di tolleranza al glucosio relativi ai due gruppi di ratti al termine del trattamento dietetico di 7 settimane. Da tali risultati si evince che i livelli plasmatici di glucosio, nelle due ore seguenti la somministrazione di un carico di glucosio, risultano perfettamente sovrapponibili, mentre i livelli plasmatici di insulina risultano significativamente più alti nei ratti alimentati con la dieta ricca in grassi rispetto a quelli alimentati con la dieta di controllo.

L'analisi statistica degli andamenti temporali dei livelli plasmatici di insulina e glucosio durante il carico di glucosio è stata compiuta calcolando l'area sotto la curva con il metodo trapezoidale.

Tabella 3: Composizione corporea e contenuto energetico in ratti alimentati con una dieta ipolipidica o iperlipidica

Valori di partenza		DIETA		% di variazione
		Ipolipidica	Iperlipidica	
Peso corporeo, g	440 ± 5	511.6 ± 11.0	550.8 ± 15.2	+7.7
Acqua corporea, %	68.9 ± 0.3	62.7 ± 0.6	57.4 ± 0.7*	-8.5
Lipidi corporei, %	7.5 ± 0.5	13.8 ± 1.0	20.0 ± 1.4*	+44.9
Proteine corporee, %	17.7 ± 0.6	17.3 ± 0.9	14.9 ± 0.6*	-13.9
Energia corporea, KJ/g	7.1 ± 0.3	9.5 ± 0.3	11.4 ± 0.2*	+20.0

I valori sono riportati come medie ± SEM di otto differenti esperimenti. I valori si riferiscono all'intero periodo di trattamento dietetico (7 settimane).

*P<0.05 rispetto alla dieta ipolipidica.

% di variazione riferite alla dieta iperlipidica rispetto alla dieta ipolipidica.

Tabella 4: *Introito calorico in ratti alimentati con una dieta ipolipidica o con una dieta iperlipidica*

	DIETA		% di variazione
	Ipolipidica	Iperlipidica	
Energia metabolizzabile introdotta, KJ	16577 ± 243	17438 ± 354	+5.2
Introito calorico lipidico, KJ	1757 ± 26	8719 ± 177*	+396
Introito calorico proteico, KJ	4807 ± 71	5057 ± 102	+5.2
Introito calorico glicidico, KJ	10013 ± 147	3662 ± 74*	-63

I valori sono riportati come medie ± SEM di otto differenti esperimenti. I valori si riferiscono all'intero periodo di trattamento dietetico (7 settimane).

*P<0,05 rispetto ai ratti alimentati con una dieta ipolipidica

% di variazione riferite alla dieta iperlipidica rispetto alla dieta ipolipidica.

Tabella 5: Guadagno di energia, di proteine e di lipidi in ratti alimentati con una dieta ipolipidica o con una dieta iperlipidica

	DIETA		% di variazione
	Ipolipidica	Iperlipidica	
Guadagno di energia corporea, KJ	1721 ± 150	3151 ± 203*	+83
Guadagno proteico, KJ	243 ± 37	86 ± 22*	-65
Guadagno lipidico, KJ	1546 ± 161	3066 ± 379*	+98

I valori sono riportati come medie ± SEM di otto differenti esperimenti. I valori si riferiscono all'intero periodo di trattamento dietetico (7 settimane).

*P<0,05 rispetto ai ratti alimentati con una dieta ipolipidica

% di variazione riferite alla dieta iperlipidica rispetto alla dieta ipolipidica.

Tabella 6: Spesa energetica ed efficienza in ratti alimentati con una dieta ipolipidica o con una dieta iperlipidica

	DIETA		% di variazione
	Ipolipidica	Iperlipidica	
Spesa energetica, KJ	14855 ± 230	14287 ± 204	-3.8
Costo energetico di deposito delle proteine, KJ	305 ± 68	107 ± 25*	-65
Costo energetico di deposito dei grassi, KJ	556 ± 25	490 ± 10*	-12
Costo totale di deposito, KJ	861 ± 98	597 ± 67*	-31
NEE, KJ	13994 ± 271	13690 ± 312	-2.2
NEE/ME, %	94.4 ± 1.1	78.1 ± 0.8*	-17.3
Efficienza metabolica, %	10.4 ± 0.9	18.1 ± 0.8*	+74

I valori sono riportati come medie ± SEM di otto differenti esperimenti. I valori si riferiscono all'intero periodo di trattamento dietetico (7 settimane).

*P<0,05 rispetto ai ratti alimentati con una dieta ipolipidica

% di variazione riferite alla dieta iperlipidica rispetto alla dieta ipolipidica.

NEE = spesa energetica netta (differenza tra spesa energetica e costo di deposito)

Tabella 7: Livelli plasmatici dell'ormone insulina, di glucosio e NEFA in ratti alimentati con una dieta ipolipidica o con una dieta iperlipidica

	DIETA		% di variazione
	Ipolipidica	Iperlipidica	
Insulina (ng/ml)	1.95 ± 0.14	2.19 ± 0.22	+12
Glucosio (mg/dl)	96.0 ± 4.0	96.0 ± 2.0	+0.0
NEFA (mmol/l)	0.111± 0.018	0.185 ± 0.028*	+67

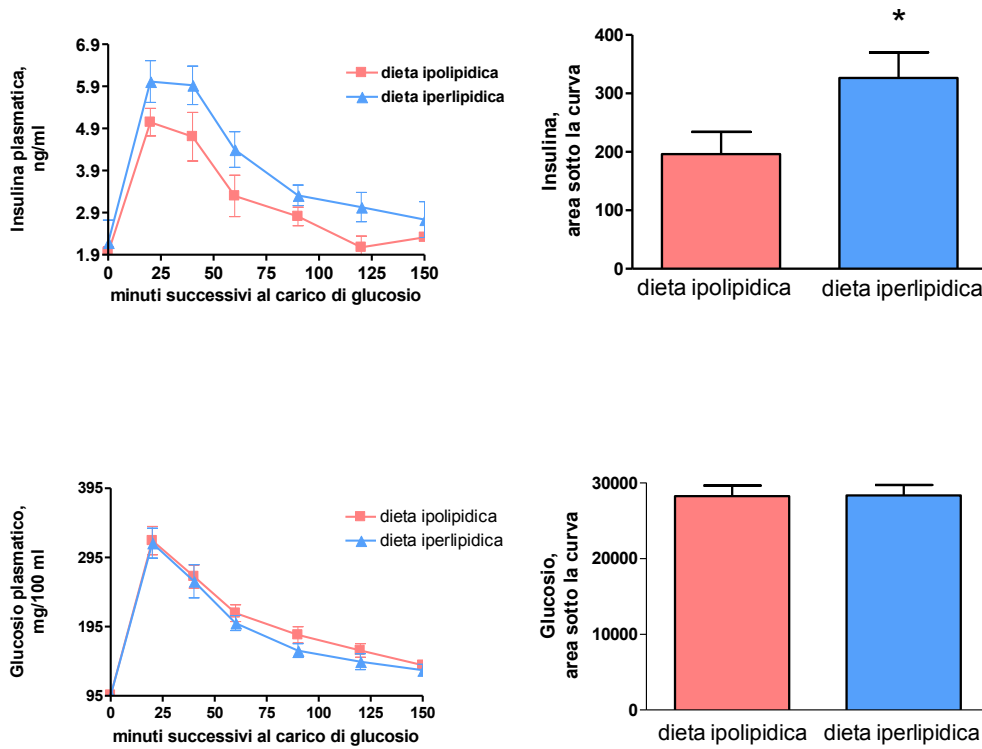
I valori sono riportati come medie ± SEM di otto differenti esperimenti. I valori si riferiscono all'intero periodo di trattamento dietetico (7 settimane).

*P<0,05 rispetto ai ratti alimentati con una dieta ipolipidica

% di variazione riferite alla dieta iperlipidica rispetto alla dieta ipolipidica.

NEFA = acidi grassi non esterificati

Figura 9: Livelli plasmatici di insulina e glucosio dopo un carico di glucosio e relativa area sotto la curva in ratti alimentati con una dieta ipolipidica o con una dieta iperlipidica



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

* $P < 0,05$ rispetto ai ratti alimentati con una dieta ipolipidica

RISULTATI 2° DISEGNO SPERIMENTALE

Nella Tabella 7 sono riportati i risultati riguardanti l'attività respiratoria dei mitocondri intermiofibrillari analizzata in presenza di tre substrati quali glutammato, succinato e palmitoil-CoA. Dai dati si evince che lo Stato 3 e lo Stato 4 della respirazione di questi mitocondri non variano significativamente tra i due gruppi di animali, con tutti e tre i substrati utilizzati.

Nella Tabella 8, invece, sono schematizzati i risultati riguardanti gli stessi parametri respiratori visti in precedenza, analizzati, però, nei mitocondri subsarcolemmatici. Così come visto per gli IMF, utilizzando glutammato e palmitoil-CoA come substrati, non si assiste ad una variazione significativa dello Stato 3 e dello Stato 4 della respirazione nei mitocondri SS dei ratti alimentati con la dieta ipolipidica e con la dieta iperlipidica. Utilizzando il succinato, invece, si assiste ad una diminuzione significativa dello Stato 3 e dello Stato 4 nei mitocondri dei ratti alimentati con la dieta ricca in grassi rispetto a quelli alimentati con la dieta a basso contenuto lipidico. Il valore RCR delle due popolazioni mitocondriali, riportato nelle Tabelle 7 e 8, è in accordo con quelli di mitocondri isolati, intatti e funzionanti.

L'efficienza della fosforilazione ossidativa è determinata soprattutto dal grado di permeabilità della membrana interna dei mitocondri agli

ioni H^+ . La dissipazione del gradiente protonico è stata determinata sia nello stato basale, cioè in assenza di acidi grassi contaminanti, sia in presenza di una quantità fisiologica di palmitato. In entrambe le condizioni, la cinetica della permeabilità protonica è stata valutata indirettamente dalla titolazione della respirazione allo stato stazionario in funzione del potenziale di membrana. Le curve di titolazione rappresentano una misura indiretta della permeabilità protonica, in quanto la velocità di ossigeno consumato allo stato stazionario, in mitocondri in cui non c'è fosforilazione, è equivalente alla quantità di protoni che entrano dissipando il gradiente.

Nella Figura 10 sono rappresentate le cinetiche della conduttanza protonica basale delle due popolazioni mitocondriali del muscolo scheletrico. Le misure evidenziano che, mentre non si assiste a nessuna variazione significativa tra i due gruppi di ratti nei mitocondri SS, per quanto concerne gli IMF la dissipazione del gradiente protonico basale è più alta nei ratti alimentati con la dieta iperlipidica. Infatti la curva del consumo di ossigeno in funzione del potenziale di membrana ottenuta dai mitocondri isolati dai ratti alimentati con la dieta ricca in grassi è posizionata, rispetto a quella ottenuta dai mitocondri isolati dai ratti alimentati con la dieta ipolipidica, in modo

tale che, per qualsiasi velocità del consumo di ossigeno, il potenziale di membrana risulta più basso.

Nella Figura 11 sono rappresentate le cinetiche della conduttanza protonica, indotta dal palmitato, delle due popolazioni mitocondriali del muscolo scheletrico. Le curve di titolazione ottenute per i mitocondri intermiofibrillari e subsarcolemmatici indicano che non vi è nessuna variazione dovuta al diverso trattamento dietetico.

Per ottenere informazioni riguardanti i danni causati dai ROS e le difese antiossidanti nei mitocondri muscolari, sono state misurate l'attività specifica dell'aconitasi e della SOD in entrambe le popolazioni mitocondriali. Dal momento che l'attività dell'aconitasi è particolarmente sensibile all'esposizione allo ione superossido, variazioni di tale attività possono essere utilizzate per valutare indirettamente la concentrazione dello ione superossido. Per tale motivo, è stata misurata l'attività mitocondriale dell'aconitasi per avere un indicatore dei danni da ROS in vivo. È stata determinata sia l'attività dell'enzima a livello basale sia l'attività totale (ottenuta dopo riattivazione della frazione inattiva dell'aconitasi), per evitare errori dovuti ad una diversa attività dell'enzima totale. Il rapporto tra l'attività basale e quella totale dell'aconitasi rappresenta, dunque, un importante marcatore del danno ossidativo. Il valore di tale

rapporto, come mostrato in Figura 12, è significativamente più alto nei mitocondri IMF e SS dei ratti alimentati con la dieta iperlipidica rispetto a quelli dei ratti alimentati con la dieta ipolipidica. Questo indica che entrambe le popolazioni mitocondriali, isolate nei ratti alimentati con la dieta ricca in grassi, presentano bassi livelli di stress ossidativo. Ciò è confermato anche dai risultati ottenuti dalla misura dell'attività della SOD che risulta significativamente più alta nei mitocondri subsarcolemmatici dei ratti alimentati con la dieta iperlipidica. Al contrario, i dati evidenziano una diminuzione significativa dell'attività dell'enzima nei mitocondri intermiofibrillari dei ratti alimentati con la dieta iperlipidica rispetto a quelli isolati dai ratti alimentati con la dieta ipolipidica (Figura 13).

Nella Figura 14 è riportata l'attività della citrato sintasi, un marker enzimatico mitocondriale, usato per la determinazione indiretta della massa proteica mitocondriale.

La misura della massa proteica mitocondriale si può ottenere dalla misura dell'attività di un enzima marker mitocondriale, come la citrato sintasi, determinata sia nell'omogenato sia nei mitocondri isolati. Infatti, l'attività della citrato sintasi misurata nell'omogenato ed espressa per g di muscolo riflette il prodotto della massa proteica mitocondriale e dell'attività specifica dell'enzima citrato sintasi,

ottenuta attraverso la misura dell'attività di tale enzima nei mitocondri SS ed IMF ed espressa per mg di proteine mitocondriali. Quindi, per determinare la massa proteica mitocondriale in ciascuna popolazione mitocondriale, l'attività della citrato sintasi misurata nei mitocondri SS ed IMF è espressa per g di tessuto iniziale.

Dai dati ottenuti (Figura 14) che mostrano nessuna variazione significativa per qualsiasi misura effettuata, si deduce che non vi è variazione della massa proteica mitocondriale per entrambe le popolazioni mitocondriali tra i due gruppi di animali.

Tabella 7: Parametri respiratoria dei mitocondri intermiofibrillari del muscolo scheletrico di ratti alimentati con una dieta ipolipidica o con una dieta iperlipidica

	Dieta ipolipidica	Dieta iperlipidica	% di Variazione
Glutammato			
Stato 3	746.9 ± 54.6	720.2 ± 52.9	-3.6
Stato 4	40.6 ± 1.3	39.8 ± 2.5	-2.0
RCR	18.4 ± 1.2	18.2 ± 0.9	-1.1
Succinato			
Stato 3	749.3 ± 18.2	703.7 ± 27.7	-6.09
Stato 4	146.5 ± 2.3	145.3 ± 7.4	-0.82
RCR	5.1 ± 0.1	4.9 ± 0.1	-3.9
Palmitoil CoA			
Stato 3	308.4 ± 24.1	332.9 ± 22.6	7.4
Stato 4	32.1 ± 0.6	32.7 ± 2.2	1.8
RCR	9.7 ± 0.8	10.2 ± 0.8	4.9

I valori sono riportati come medie ± SEM di otto differenti esperimenti e sono espressi come ng atomi O/ (min x mg proteine)

*P<0,05 rispetto ai ratti alimentati con una dieta ipolipidica

% di variazione riferite alla dieta iperlipidica rispetto alla dieta ipolipidica.

Tabella 8: Parametri respiratori dei mitocondri subsarcolemmatici del muscolo scheletrico di ratti alimentati con una dieta ipolipidica o con una dieta iperlipidica

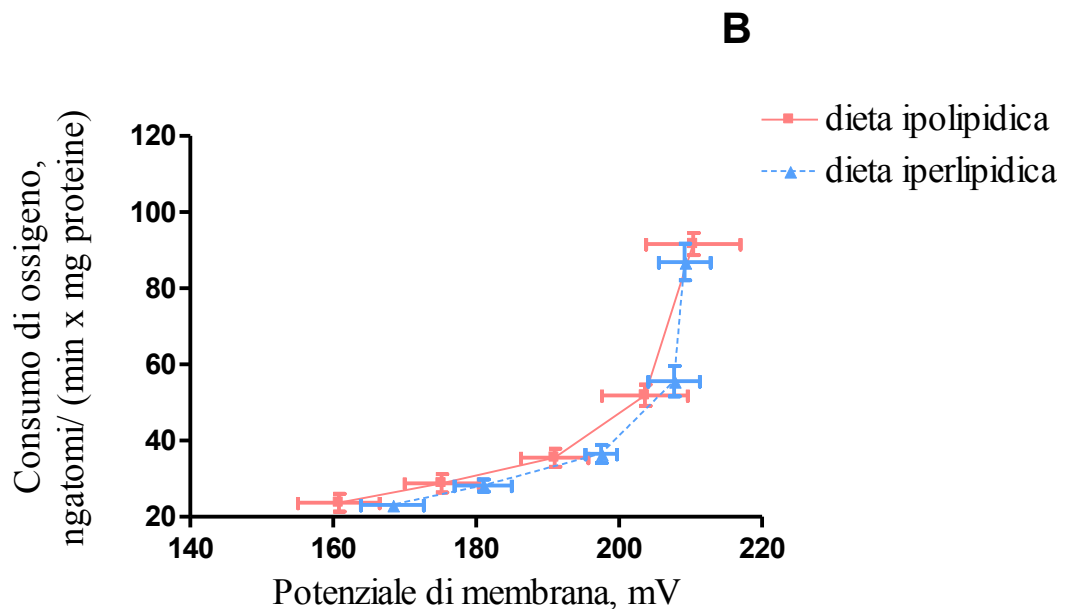
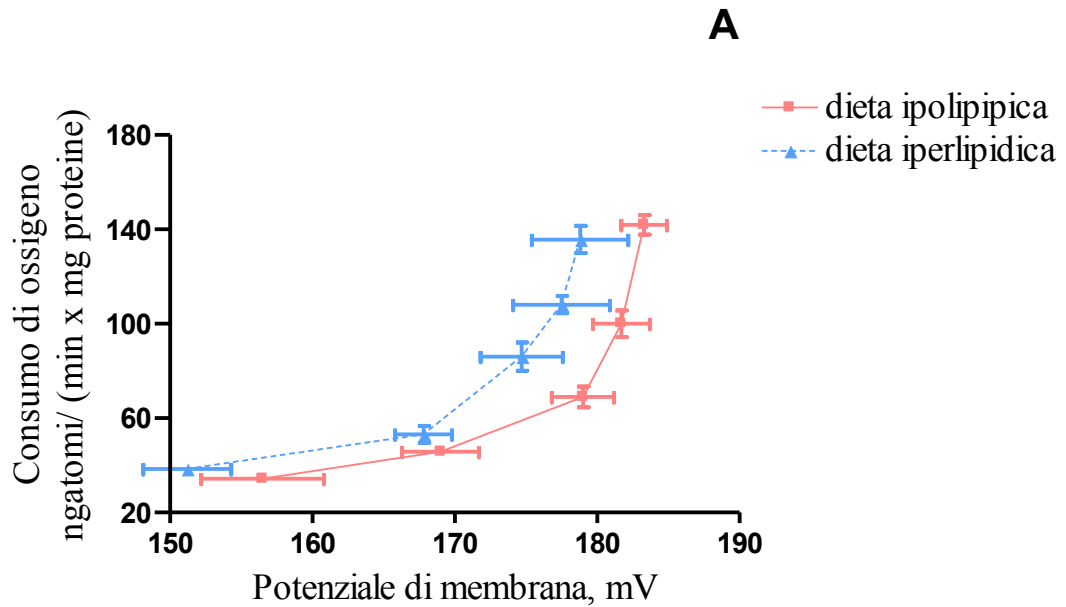
	Dieta ipolipidica	Dieta iperlipidica	% di Variazione
Glutammato			
Stato 3	427.5 ± 48.2	406.0 ± 43.8	-5.0
Stato 4	34.5 ± 2.1	36.4 ± 1.8	5.5
RCR	12.2 ± 0.8	11.1 ± 1.0	-9.0
Succinato			
Stato 3	544.8 ± 12.4	458.4 ± 13.0*	-15.8
Stato 4	107.5 ± 1.6	95.2 ± 0.6*	-11.4
RCR	5.0 ± 0.4	4.8 ± 0.1	-4.0
Palmitoil CoA			
Stato 3	203.3 ± 19.2	228.7 ± 17.4	12.5
Stato 4	31.1 ± 1.7	30.5 ± 1.3	-1.9
RCR	6.5 ± 0.3	7.5 ± 0.6	15.4

I valori sono riportati come medie ± SEM di otto differenti esperimenti e sono espressi come ng atomi O/ (min x mg proteine)

*P<0,05 rispetto ai ratti alimentati con una dieta ipolipidica

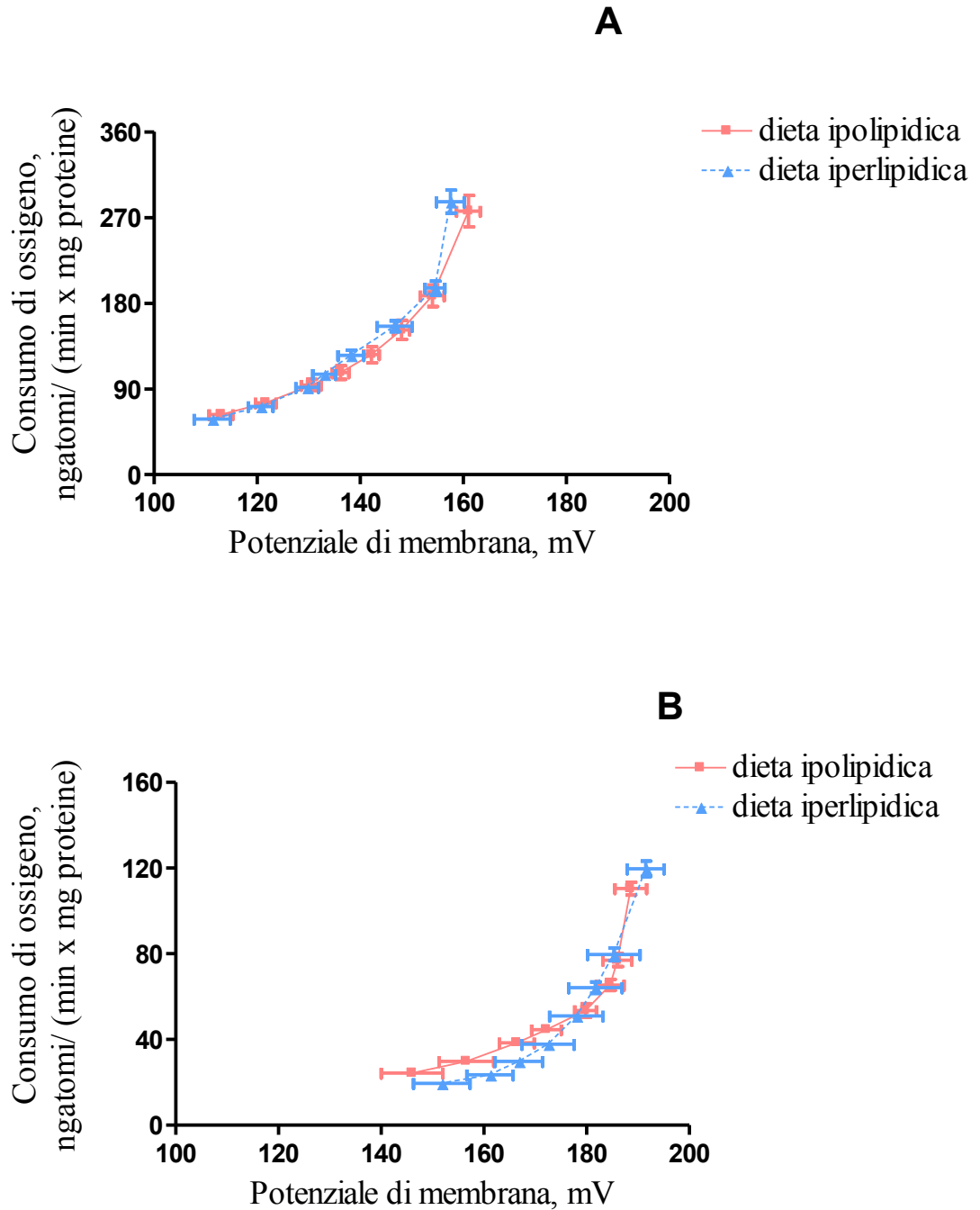
% di variazione riferite alla dieta iperlipidica rispetto alla dieta ipolipidica.

Figura 10: Cinetica della conduttanza protonica basale nei mitocondri intermiofibrillari (A) e subsarcolemmatici (B) in ratti alimentati con una dieta ipolipidica o iperlipidica



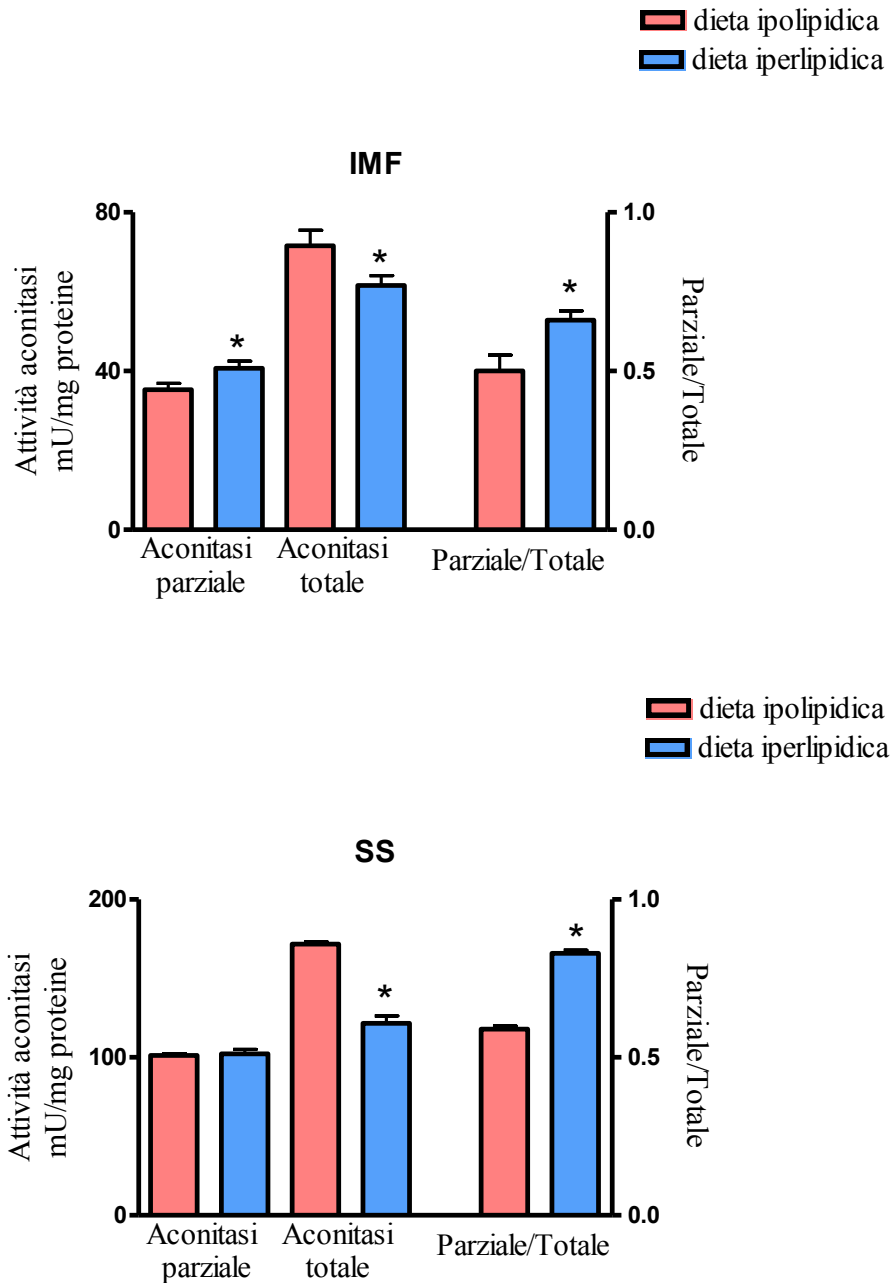
Ogni punto rappresenta la media \pm SEM di otto differenti esperimenti

Figura 11: Cinetica della conduttanza protonica indotta nei mitocondri intermiofibrillari (A) e subsarcolemmatici (B) in ratti alimentati con una dieta ipolipidica o iperlipidica



Ogni punto rappresenta la media \pm SEM di otto differenti esperimenti

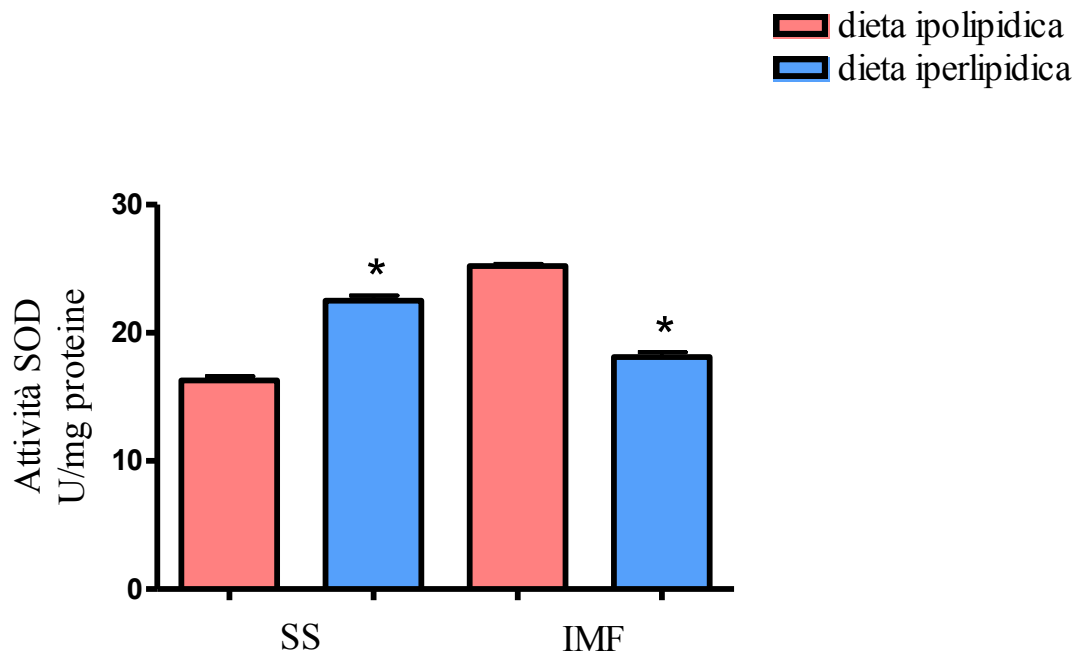
Figura 12: Attività dell'aconitasi nei mitocondri intermiofibrillari (IMF) e subsarcolemmatici (SS) in ratti alimentati con una dieta ipolipidica o iperlipidica



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

* $P < 0,05$ rispetto ai ratti alimentati con una dieta ipolipidica

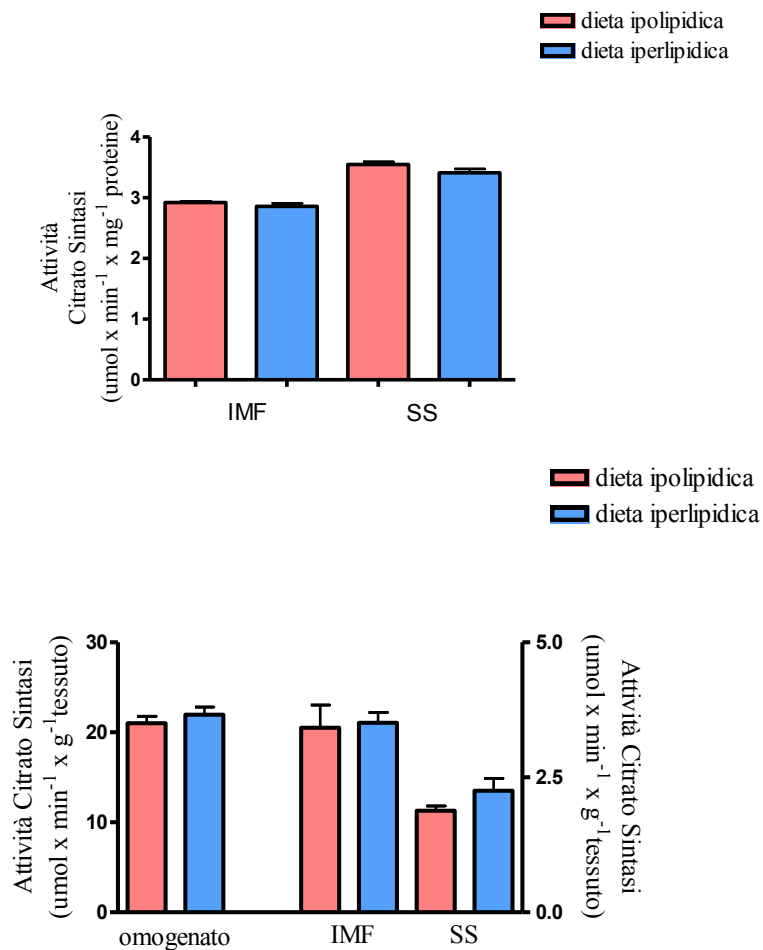
Figura 13: Attività della superossido dismutasi (SOD) nei mitocondri intermiotibrillari (IMF) e subsarcolemmatici (SS) in ratti alimentati con una dieta ipolipidica o iperlipidica



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

* $P < 0,05$ rispetto ai ratti alimentati con una dieta ipolipidica

Figura 14: Attività specifica della citrato sintasi nei mitocondri subsarcolemmatici (SS) ed intermiofibrillari (IMF) isolati dal muscolo scheletrico e attività della citrato sintasi nell'omogenato di ratti alimentati con una dieta ipolipidica o iperlipidica



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

*P<0,05 rispetto ai ratti alimentati con una dieta ipolipidica

RISULTATI 3° DISEGNO SPERIMENTALE

Nella Tabella 9 sono riportati i risultati relativi al consumo di ossigeno ottenuti negli omogenati di fegato in presenza di tre substrati quali glutammato, succinato e palmitoil-CoA. Tali misure permettono di avere informazioni sulle variazioni della massa proteica mitocondriale e della capacità respiratoria dell'intero tessuto in seguito alla somministrazione della dieta iperlipidica per 7 settimane.

La respirazione nell'omogenato è stata determinata in presenza di concentrazioni saturanti di ADP (Stato 3) o di oligomicina, un inibitore dell'ATP sintetasi, (Stato 4). I risultati ottenuti mostrano un aumento significativo dello Stato 3 della respirazione e dell'RCR (rapporto di controllo respiratorio), con qualsiasi substrato utilizzato nei ratti alimentati con la dieta iperlipidica rispetto ai ratti alimentati con la dieta ipolipidica. Al contrario, nessuna variazione significativa è ottenuta nello Stato 4 della respirazione con i vari substrati utilizzati, nei due gruppi di animali.

In Tabella 10 sono riportate le misure dello Stato 3 e dello Stato 4 della respirazione nei mitocondri isolati dal fegato. Tali misure sono state effettuate per valutare i cambiamenti nella capacità respiratoria specifica, dovuti all'alimentazione ad elevato contenuto di grassi. I

risultati mostrano che, in presenza di qualsiasi substrato, sia lo Stato 3 sia lo Stato 4 della respirazione diminuiscono significativamente nei ratti alimentati con la dieta iperlipidica.

Tenendo presente che la modificazione della conduttanza della membrana interna dei mitocondri agli ioni H^+ , è il più importante fattore che determina l'efficienza della fosforilazione ossidativa, è stata valutata la variazione della conduttanza protonica mitocondriale nei ratti alimentati con una dieta ad alto contenuto di grassi rispetto a quelli alimentati con una dieta a basso contenuto di grassi. Nella Figura 15 è rappresentata la cinetica della conduttanza protonica basale ed è mostrato che la dissipazione del gradiente protonico diminuisce nei ratti alimentati con la dieta ad alto contenuto di grassi rispetto a quelli di controllo. Infatti la curva del consumo di ossigeno in funzione del potenziale di membrana, ottenuta con i mitocondri isolati da ratti alimentati con la dieta iperlipidica è posizionata rispetto alla curva ottenuta con i mitocondri isolati da ratti alimentati con la dieta ipolipidica, in modo tale che, per qualsiasi velocità del consumo di ossigeno, il potenziale di membrana è più alto, come risultato della diminuzione della conduttanza protonica basale. Nella Figura 15 è rappresentata anche la cinetica della conduttanza protonica indotta dagli acidi grassi ottenuta con i mitocondri isolati da ratti alimentati

con la dieta iperlipidica ed ipolipidica. Le misure evidenziano che non si assiste a nessuna variazione significativa tra i due gruppi di ratti.

Per avere informazioni sui danni da ROS (specie reattive dell'ossigeno) e sulle difese antiossidanti nei mitocondri epatici di ratti alimentati con la dieta iperlipidica, è stata valutata, così come per i mitocondri muscolari, l'attività dell'aconitasi e della SOD (Superossido dismutasi). Nella Figura 16 sono mostrati i risultati relativi all'attività dell'aconitasi nei due gruppi di animali. Essendo il rapporto fra l'attività parziale e quella totale dell'enzima significativamente diminuito nei ratti alimentati con dieta ad alto contenuto lipidico rispetto a quelli alimentati con la dieta a basso contenuto lipidico, ciò indica che nei ratti alimentati con la dieta iperlipidica c'è un più alto livello di stress ossidativo. Nonostante il maggior livello di danno ossidativo in questi ratti, nessuna variazione significativa si verifica per quanto riguarda l'attività della SOD, che ha il compito di ripulire la cellula dai radicali liberi e mantenere bassa la loro concentrazione (Figura 16).

Per valutare ulteriormente i danni da ROS, soprattutto a carico dei lipidi, sono state effettuate misure riguardanti la perossidazione lipidica. I risultati ottenuti, e mostrati in Figura 17, indicano un aumento significativo del danno a carico di queste molecole nei

mitocondri dei ratti alimentati con la dieta iperlipidica rispetto a quelli isolati dai ratti alimentati con la dieta ipolipidica.

La misura dell'attività di un enzima marker mitocondriale come la Citrato sintasi negli omogenati di fegato e nei mitocondri isolati di entrambi i gruppi di animali, mi ha permesso di valutare la massa proteica mitocondriale. Infatti, la misura dell'attività della citrato sintasi nell'omogenato di fegato espressa per g di fegato riflette il prodotto della massa proteica mitocondriale e dell'attività specifica dell'enzima, che, a sua volta può essere misurata direttamente a livello dei mitocondri isolati. Il rapporto tra l'attività dell'enzima misurato nell'omogenato ed espressa per g di fegato e l'attività specifica dell'enzima misurato nei mitocondri isolati rappresenta una misura indiretta della massa proteica mitocondriale. Nella Figura 18 sono mostrati i risultati relativi all'attività dell'enzima misurata nell'omogenato e nei mitocondri. L'attività specifica dell'enzima marker misurato nella frazione mitocondriale è significativamente diminuita nei ratti alimentati con la dieta iperlipidica rispetto ai ratti alimentati con la dieta ipolipidica. Invece l'attività dell'enzima misurato nell'omogenato di fegato ed espresso per g di fegato non varia significativamente. Da ciò ne deriva un significativo aumento della massa proteica mitocondriale (Figura 18).

È stato valutato anche il contenuto lipidico a livello epatico nei due gruppi di animali e i risultati ottenuti (Figura 19) mostrano che vi è un aumento significativo di lipidi negli epatociti dei ratti alimentati con la dieta ricca in grassi.

Tabella 9: Parametri respiratori di omogenati di fegato in ratti alimentati con una dieta ipolipidica o con una dieta iperlipidica

	Dieta ipolipidica	Dieta iperlipidica	% di Variazione
Glutammato			
Stato 3	6134 ± 152	6928 ± 256*	12.9
Stato 4	585 ± 22	566 ± 33	-3.2
RCR	10.5 ± 0.2	12.5 ± 0.8*	19.0
Succinato			
Stato 3	8125 ± 285	9726 ± 310*	19.7
Stato 4	1459 ± 34	1363 ± 37	-6.6
RCR	5.6 ± 0.2	7.2 ± 0.3*	28.6
Palmitoil CoA			
Stato 3	4926 ± 166	5484 ± 167*	11.3
Stato 4	634 ± 37	613 ± 5.0	-3.3
RCR	7.9 ± 0.4	9.0 ± 0.3*	13.9

I valori sono riportati come medie ± SEM di otto differenti esperimenti e sono espressi come ng atomi O/ (min x g di tessuto)

*P<0,05 rispetto ai ratti alimentati con una dieta ipolipidica

% di variazione riferite alla dieta iperlipidica rispetto alla dieta ipolipidica.

Tabella 10: Parametri respiratori di mitocondri di fegato in ratti alimentati con una dieta ipolipidica o con una dieta iperlipidica

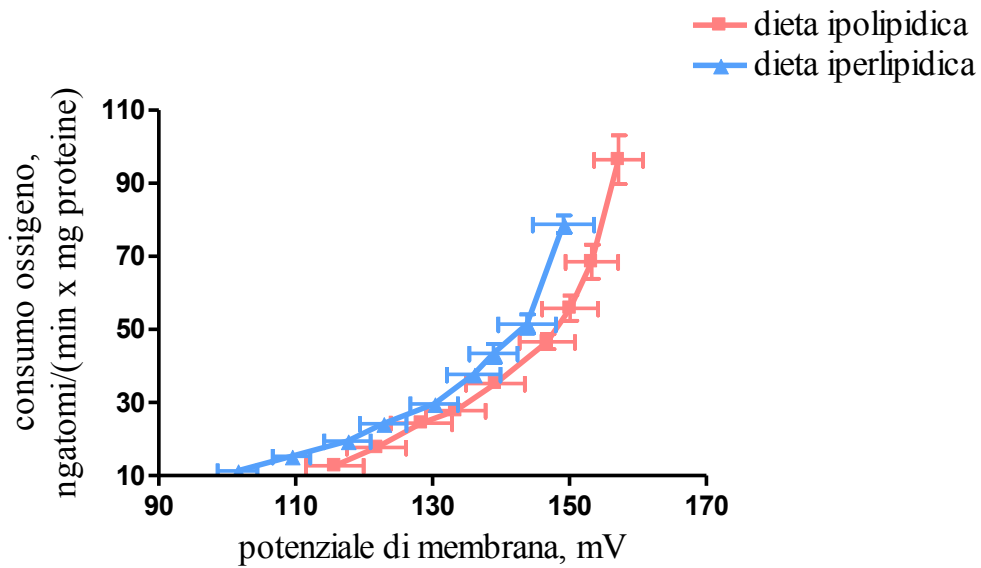
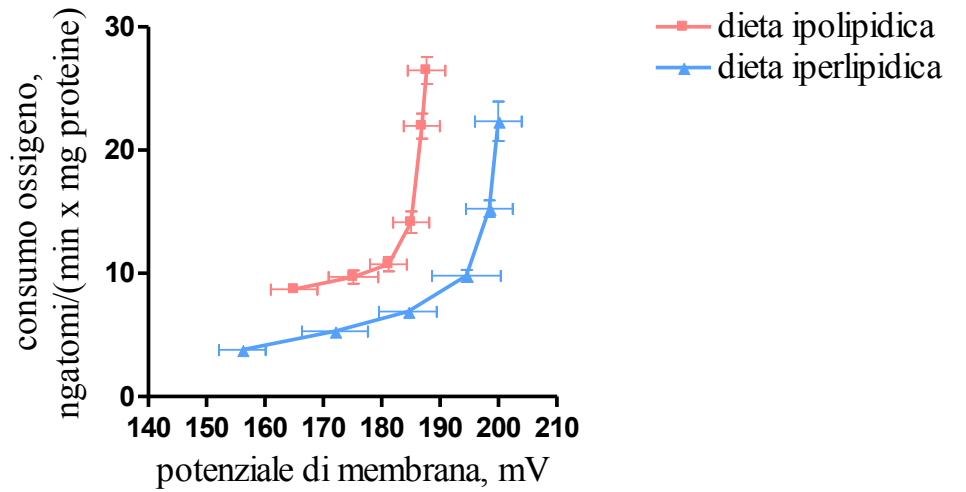
	Dieta ipolipidica	Dieta iperlipidica	% di Variazione
Glutammato			
Stato 3	91.1 ± 4.6	69.6 ± 4.0*	-23.6
Stato 4	10.6 ± 0.8	8.5 ± 0.4*	-19.8
RCR	8.9 ± 0.7	8.2 ± 0.5	-7.9
Succinato			
Stato 3	151.5 ± 7.6	114.4 ± 5.8*	-24.5
Stato 4	25.6 ± 1.5	18.5 ± 0.9*	-27.7
RCR	6.0 ± 0.3	6.2 ± 0.3	3.3
Palmitoil CoA			
Stato 3	82.3 ± 4.8	63.8 ± 3.5*	-22.5
Stato 4	13.9 ± 0.6	11.1 ± 0.7*	-20.1
RCR	5.9 ± 0.2	5.9 ± 0.4	0.0

I valori sono riportati come medie ± SEM di otto differenti esperimenti e sono espressi come ng atomi O/ (min x mg proteine)

*P<0,05 rispetto ai ratti alimentati con una dieta ipolipidica

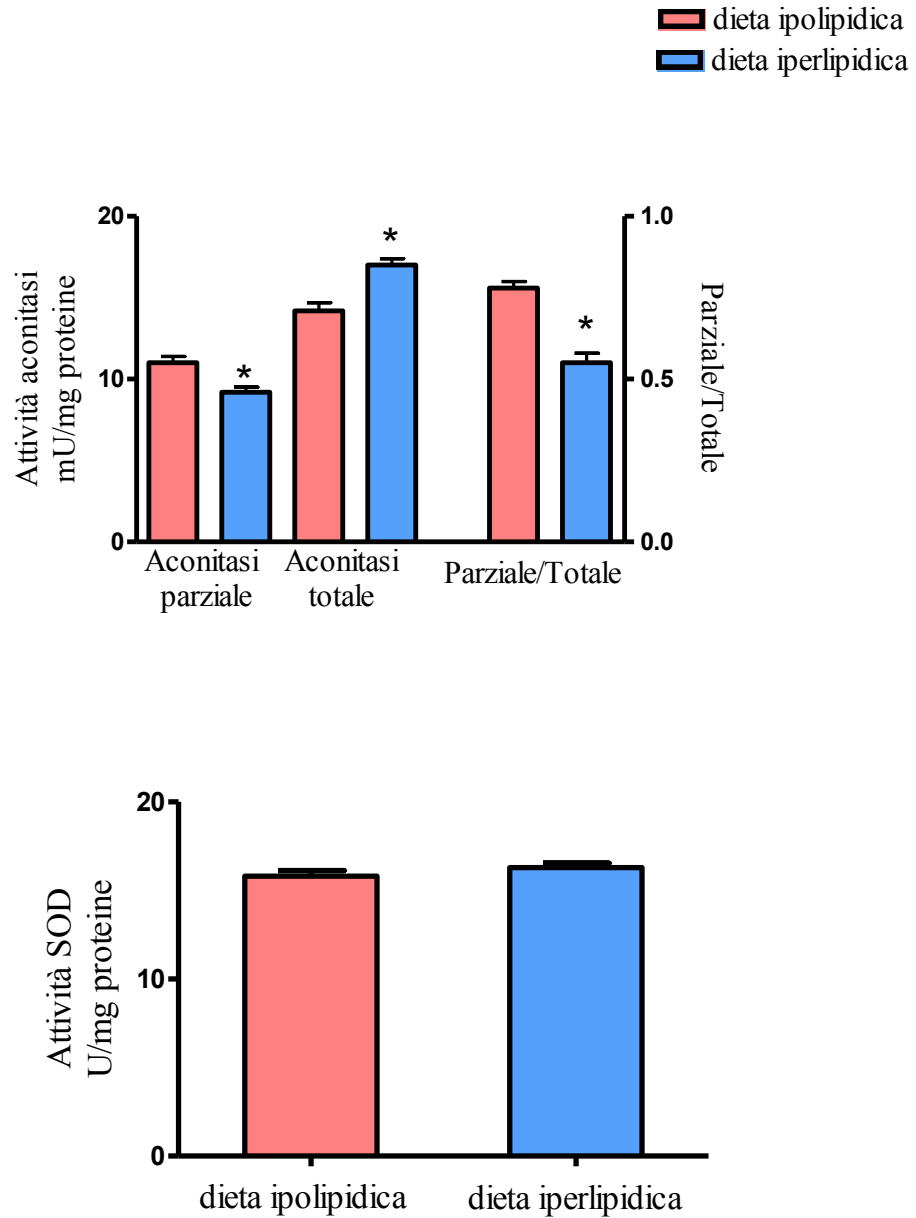
% di variazione riferite alla dieta iperlipidica rispetto alla dieta ipolipidica.

Figura 15: Cinetica della conduttanza protonica basale ed indotta dagli acidi grassi nei mitocondri di fegato in ratti alimentati con una dieta ipolipidica o iperlipidica



Ogni punto rappresenta la media \pm SEM di otto differenti esperimenti

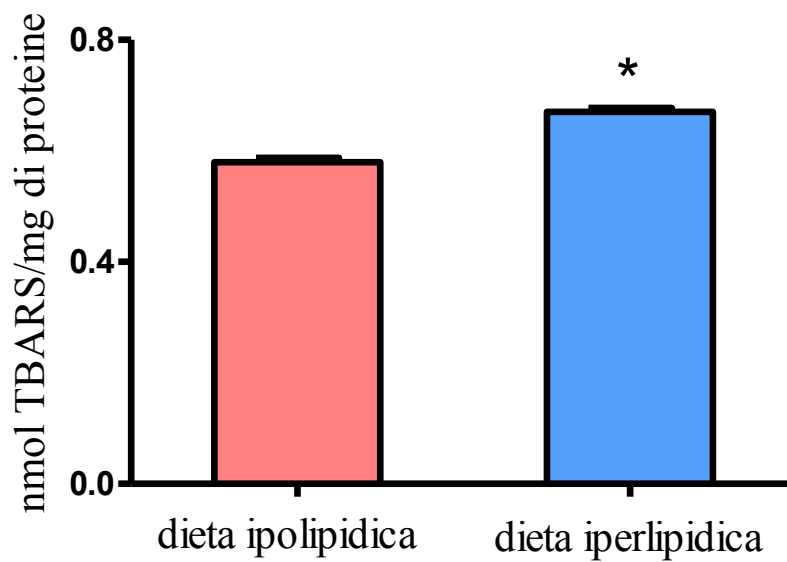
Figura 16: Attività dell'aconitasi e della superossido dismutasi (SOD) in mitocondri di fegato in ratti alimentati con una dieta ipolipidica o iperlipidica



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

*P<0,05 rispetto ai ratti alimentati con una dieta ipolipidica

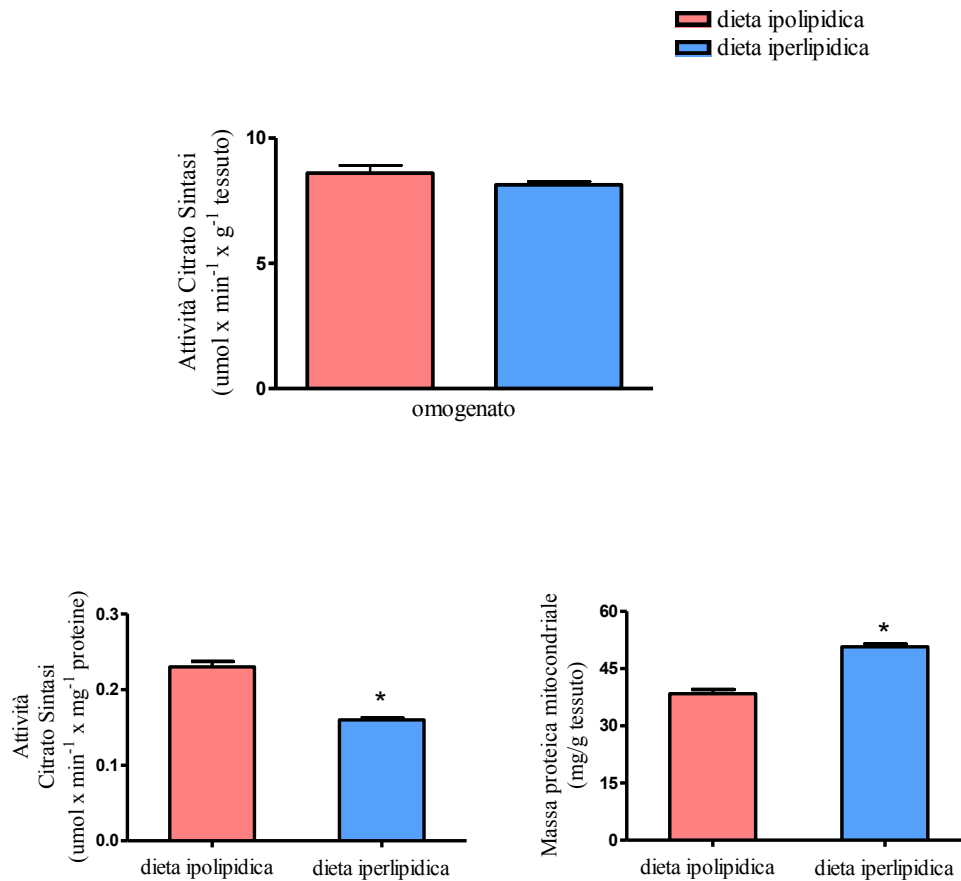
Figura 17: Perossidazione lipidica in mitocondri di fegato in ratti alimentati con una dieta ipolipidica o iperlipidica



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

* $P < 0,05$ rispetto ai ratti alimentati con una dieta ipolipidica

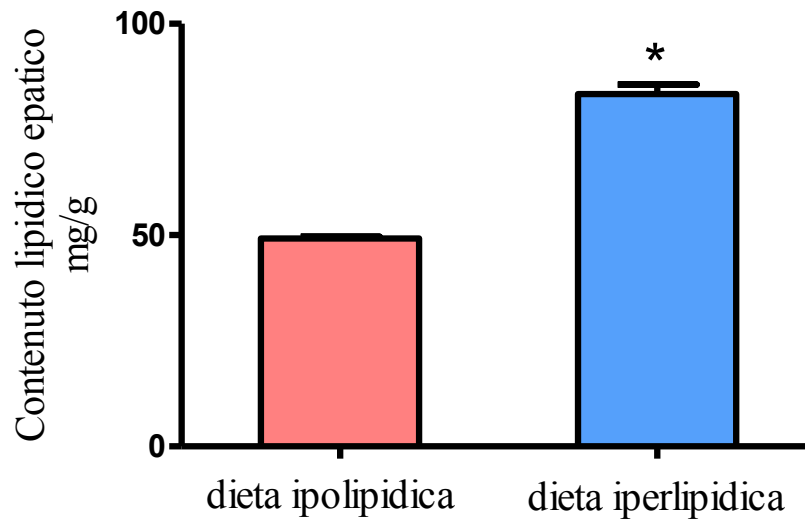
Figura 18: Attività della citrato sintasi per g di tessuto incubato, attività specifica per mg di proteine mitocondriali e massa proteica mitocondriale in ratti alimentati con una dieta ipolipidica o iperlipidica



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

* $P < 0,05$ rispetto ai ratti alimentati con una dieta ipolipidica

Figura 19: *Contenuto lipidico del fegato*



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

* $P < 0,05$ rispetto ai ratti alimentati con una dieta ipolipidica

DISCUSSIONE

DISCUSSIONE 1° DISEGNO SPERIMENTALE

Dai risultati ottenuti in questo disegno sperimentale emerge che ratti adulti, sedentari per le condizioni di stabulazione e sottoposti ad una dieta iperlipidica a lungo termine (7 settimane), diventano obesi e lo sviluppo dell'obesità è associato con elevati livelli di NEFA circolanti e con insulino-resistenza; è quindi presumibile che il rifornimento di acidi grassi alle cellule eccede la loro utilizzazione causando un deposito ectopico di grasso, tutte condizioni che preludono al diabete. E' da notare che tali condizioni predisponenti allo sviluppo del diabete sono presenti nonostante il basso livello di carboidrati nella dieta, quindi, l'elevato livello di grassi nella dieta sarebbe responsabile dello stato di insulino-resistenza presente in questi ratti. Un altro dato interessante ottenuto in questo disegno sperimentale è la mancanza di iperfagia nei ratti alimentati per sette settimane con la dieta iperlipidica. Infatti, in questi ratti l'energia metabolizzabile introdotta non è significativamente aumentata rispetto ai ratti alimentati con la dieta ipolipidica, ma nonostante ciò depositano una maggiore quantità di energia nel tessuto adiposo. Quindi un'alimentazione ricca di grassi è di per sé capace di indurre l'obesità.

E' da notare che la mancanza di iperfagia nei ratti alimentati con la dieta iperlipidica per sette settimane contrasta con risultati precedenti

ottenuti nel laboratorio dove ho svolto il dottorato. Infatti, ratti adulti alimentati con la stessa dieta iperlipidica ma per un breve periodo (due settimane) sono iperfagici e presentano un aumento dei depositi di grasso, ma non presentano variazioni nei livelli di NEFA, né sono resistenti all'insulina [Iossa S. & coll. (2003)]. Ciò può suggerire che la durata del trattamento con la dieta iperlipidica è un fattore molto importante per lo sviluppo dell'insulino-resistenza nei ratti adulti. Un'alimentazione a lungo termine costantemente ricca di grasso è diabetogena nonostante avvenga una riduzione dell'energia metabolizzabile introdotta. Infatti, unendo risultati precedenti ottenuti nel laboratorio dove ho svolto il dottorato e quelli presenti, potremo dire che ratti adulti alimentati con una dieta iperlipidica sono sicuramente iperfagici nelle prime due settimane di trattamento dietetico e sviluppano obesità; successivamente diventano normofagici ma continuano ad essere obesi, sviluppando insulino-resistenza. Inoltre, vari studi [Caggiula AW. & Mustak VA. (1997)], hanno dimostrato come diete con alti livelli di colesterolo e ricche di acidi grassi saturi accrescano il rischio del processo aterosclerotico, processo degenerativo che porta alla formazione di depositi ricchi di materiale lipidico (placche) sul rivestimento interno delle arterie medie e più grandi riducendone il calibro fino ad ostruirle

completamente. Alla luce di queste considerazioni, per uno stato di buona salute, sarebbe necessario limitare il livello dei lipidi nella dieta attraverso una dieta corretta per quanto riguarda i macronutrienti.

Le misure del bilancio energetico chiaramente mostrano come i ratti alimentati con la dieta iperlipidica, nonostante non siano iperfagici diventano obesi rispetto ai ratti alimentati con una dieta povera di grassi, poiché i primi presentano un aumento dei lipidi corporei e del contenuto energetico corporeo. Nei ratti alimentati con la dieta iperlipidica è stato trovato anche un guadagno corporeo di proteine più basso rispetto ai ratti di controllo, nonostante un introito di proteine simile per i due gruppi di ratti. Questo risultato probabilmente è dovuto al fatto che nei ratti alimentati con la dieta ricca di grassi vi è un più basso introito di carboidrati e quindi, aumentando la gluconeogenesi epatica, vengono utilizzati maggiormente gli amminoacidi gluconeogenici. E' da notare, quindi, che una non ottimale distribuzione dei macronutrienti nella dieta, cioè l'elevato livello di grassi a sfavore dei carboidrati, non solo aumenta la massa grassa corporea, ma è anche in grado di diminuire la massa proteica corporea, aumentando ulteriormente la percentuale di massa grassa, e così, il grado di obesità.

L'aumentata energia corporea trovata nei ratti alimentati con la dieta iperlipidica si realizza soprattutto come guadagno lipidico e deve, comunque derivare da uno sbilancio positivo dei flussi di energia in entrata e in uscita. I due gruppi di ratti, però, non presentano differenze significative nei valori della spesa energetica e della spesa energetica netta (NEE) anche se esse sono sempre leggermente più basse nei ratti alimentati con la dieta iperlipidica. In effetti si assiste ad una diminuzione del costo totale del deposito dell'energia corporea, sia a livello del costo del deposito delle proteine, che è diminuito nei ratti alimentati con la dieta iperlipidica, sia nel costo del deposito dei grassi. Infatti, i grassi sono, tra i macronutrienti, quelli più efficienti, e quindi c'è bisogno di poca energia per depositarli. E' noto che per depositare 1 KJ di lipidi si consumano 0.36 KJ rispetto alle 1.25 KJ che si consumano per depositare 1 KJ di proteine. Inoltre, poiché nelle diete iperlipidiche è inibita la "lipogenesi de novo", una via metabolica che trasforma i carboidrati in grassi, il costo di deposito dei grassi si riduce ulteriormente passando da 0.36 KJ a 0.16 KJ [Pullar JD. & Webster AJF. (1977); Rothwell NJ. & coll. (1985)], quindi l'organismo tende a spendere ancora meno energia per accumulare grassi, partendo dai grassi stessi. In accordo con quanto detto, i ratti alimentati con la dieta iperlipidica esibiscono un aumento

significativo dell'efficienza metabolica per cui anche in assenza di iperfagia più energia è disponibile per il deposito di grasso nel tessuto adiposo.

In conclusione, i risultati ottenuti in questo disegno sperimentale dimostrano che un elevato introito cronico di grassi in animali adulti sedentari, anche se non provoca iperfagia, è causa di obesità, insulino-resistenza ed elevati livelli plasmatici di NEFA sia a causa dell'alta percentuale di grasso nella composizione della dieta sia a causa della durata del trattamento con la dieta iperlipidica. Inoltre, gli elevati livelli plasmatici di NEFA essendo strettamente correlati con i livelli di acidi grassi presenti nelle cellule, devono essere considerati predittivi di rischio di insorgenza di patologie cardiovascolari, in particolare se sommati ad altri fattori di rischio come il fumo, l'inattività fisica, e l'ipertensione [Caggiula AW. & Mustak VA. (1997)].

DISCUSSIONE 2° DISEGNO SPERIMENTALE

I risultati ottenuti in questo disegno sperimentale hanno mostrato che nei ratti adulti, nei quali l'obesità e l'insulino-resistenza sono state indotte da un trattamento a lungo termine con una dieta ad alto contenuto di grassi, vi è una minore capacità ossidativa solo nei mitocondri subsarcolemmatici del muscolo scheletrico ed un basso livello di danno ossidativo in entrambe le popolazioni mitocondriali.

Il compartimento mitocondriale è stato indicato come un sito cellulare coinvolto nella patogenesi della resistenza all'insulina. Disfunzioni mitocondriali sono state trovate in uomini anziani [Petersen KF. & coll. (2003)] e in soggetti giovani con insulino-resistenza [Petersen KF. & coll. (2004)]. Inoltre è stata trovata un'elevata correlazione tra la capacità ossidativa del muscolo scheletrico e la sensibilità all'insulina [Bruce CR. & coll. (2003)]. Sulla base di questi dati, la diminuzione della capacità ossidativa dei mitocondri subsarcolemmatici, isolati da ratti alimentati con una dieta ad elevato contenuto di grassi, suggerisce un possibile ruolo di questa popolazione di mitocondri del muscolo scheletrico nello sviluppo di resistenza all'insulina collegata con un'alimentazione ad elevato contenuto di grassi. Ciò, sarebbe possibile, in quanto, il muscolo scheletrico è uno dei siti primari di azione dell'insulina ed è quindi

collegato con lo sviluppo di resistenza all'insulina a livello dell'intero organismo [Stannard SR. & Johnson NA. (2003)].

Una conseguenza deleteria della ridotta capacità ossidativa dei mitocondri subsarcolemmatici in ratti alimentati con una dieta iperlipidica, potrebbe essere una minore ossidazione dei substrati energetici. Bisogna, infatti, considerare che in questi ratti vi è anche un aumento degli acidi grassi circolanti (NEFA), con un conseguenziale incremento del flusso degli acidi grassi nel muscolo, per cui una riduzione della capacità ossidativa dei mitocondri subsarcolemmatici muscolari avrebbe importanti conseguenze metaboliche. Tenendo presente che i mitocondri subsarcolemmatici sono localizzati immediatamente sotto la membrana plasmatica, sono questi mitocondri che dovrebbero ossidare per primi gli acidi grassi, infatti, poi si diluiscono nel citoplasma. Ma, a causa della ridotta capacità ossidativa di questi mitocondri, si avrebbe un accumulo di acidi grassi che verrebbero convogliati nella via sintetica dell'esterificazione con formazione di trigliceridi intracellulari e, conseguente lipotossicità. L'accumulo di trigliceridi intramuscolari è stato collegato con una diminuzione della sensibilità all'insulina del muscolo scheletrico, e successiva insulino-resistenza a livello dell'intero organismo [Stannard SR. & Johnson NA. (2003); Weiss R.

& coll. (2003)]. Nelle reazioni chimiche che portano alla formazione dei trigliceridi, si determina un aumento del diacilglicerolo, che attiva una cascata di serina/treonina chinasi (probabilmente iniziate dalla proteina chinasi C θ), che determina la fosforilazione dei siti di treonina e serina sui substarti dei recettori insulinici (IRS 1-2) riducendone la capacità di attivare il fosfatidilinositolo-3-chinasi (PI-3-chinasi). Come conseguenza diminuisce il segnale del recettore dell'insulina e si ha un minore spostamento dei trasportatori del glucosio (GluT 4) sulla membrana; per cui entrerà meno glucosio anche se i livelli di insulina circolanti sono elevati [Boden G. & Shulman GI. (2002); Shulman GI. (2000)].

In un lavoro precedente svolto nel laboratorio dove ho svolto il dottorato, è stato suggerito un possibile collegamento tra la funzionalità mitocondriale del muscolo scheletrico e la resistenza all'insulina in un altro modello di obesità: l'invecchiamento [Iossa S. & coll. (2004)]. Ciò potrebbe suggerire che l'alterazione della funzionalità mitocondriale del muscolo scheletrico sia una causa comune di sviluppo della resistenza all'insulina in diversi modelli di obesità. In realtà, l'alterazione della funzionalità dei mitocondri del muscolo scheletrico può essere diversa, in differenti condizioni. Infatti, ho riscontrato una riduzione della capacità ossidativa dei

mitocondri, senza variazioni dell'efficienza energetica mitocondriale, mentre nel lavoro precedente sull'invecchiamento, i ratti riducono l'utilizzo dei substrati energetici non per un danno alla capacità ossidativa mitocondriale, ma come risultato di una maggiore efficienza energetica mitocondriale [Nedergard J. (1983)]. Infatti, una maggiore efficienza energetica mitocondriale, aumentando il rapporto di accoppiamento della fosforilazione ossidativa, provoca un risparmio dei substrati energetici. Possiamo, quindi, affermare che per la funzionalità mitocondriale una diminuzione della capacità ossidativa o una maggiore efficienza mitocondriale hanno lo stesso effetto: diminuire l'ossidazione dei substrati che possono così essere utilizzati attraverso vie sintetiche.

Alcuni risultati precedenti [Iossa S. & coll. (2003)], e quelli presenti, dimostrano che la capacità ossidativa del muscolo scheletrico è danneggiata in ratti alimentati con una dieta ad alto contenuto di grassi prima dell'insorgenza della resistenza all'insulina. Infatti, ratti alimentati con la dieta iperlipidica solo per 2 settimane esibiscono una disfunzione mitocondriale, ma non insulino-resistenza. D'altra parte, ratti alimentati per 7 settimane con una dieta ad elevato contenuto di grasso esibiscono sia disfunzione della funzione ossidativa sia insulino-resistenza. Una situazione simile si verifica in soggetti con

una storia familiare di diabete, in cui la percentuale di ATP sintetizzata diminuisce prima che compaia la ridotta tolleranza al glucosio [Petersen KF. & coll. (2004)]. Per questo, il primo effetto di un'alimentazione ad alto contenuto di grassi in ratti adulti potrebbe essere una riduzione dell'attività mitocondriale del muscolo scheletrico. Questa possibilità è in accordo con un recente studio, che dimostra che c'è una minore trascrizione di geni coinvolti nella fosforilazione ossidativa sia in uomini sia in topi alimentati con una dieta ricca in grassi [Sparks LM. & coll. (2005)]. Sembra quindi che l'elevato livello di grasso, presente nella dieta, debba essere considerato come una causa potenziale di disfunzione mitocondriale e di susseguente resistenza all'insulina. Il problema da chiarire è perché l'aumento del flusso di acidi grassi attraverso il muscolo scheletrico, indotto da un eccesso di acidi grassi nella dieta, diminuisce la capacità mitocondriale di ossidare substrati energetici.

Tenendo presente che il digiuno, è anch'esso una situazione in cui il flusso di acidi grassi aumenta attraverso il muscolo scheletrico e vi sono cambiamenti nell'espressione genica simili a quelli indotti da elevati livelli di grassi presenti nella dieta [Jagoe RT. & coll. (2002)], la disfunzione mitocondriale potrebbe essere una strategia da parte dell'organismo per limitare la dissipazione dell'energia. Questo

meccanismo di risparmio probabilmente si è evoluto in un periodo ancestrale caratterizzato da scarsa disponibilità di cibo, con frequenti periodi di digiuno. Comunque, lo stile di vita attuale, insieme ad una costante disponibilità di cibi ricchi di grassi, fa sì che questo meccanismo, utile in passato, sia attualmente svantaggioso a tal punto da contribuire all'instaurarsi della resistenza all'insulina.

Per quanto riguarda l'effetto di una dieta iperlipidica sul danno ossidativo a carico dei mitocondri del muscolo scheletrico, i risultati ottenuti mostrano una riduzione del danno ossidativo nei mitocondri subsarcolemmatici ed intermiofibrillari, come indicato dalla determinazione del rapporto dell'attività aconitica basale/totale. Nei mitocondri subsarcolemmatici, tale risultato può essere spiegato da un aumento dell'attività antiossidante della SOD. D'altra parte, nei mitocondri intermiofibrillari, il ridotto danno ossidativo può dipendere da un aumento della dissipazione del gradiente protonico basale in ratti alimentati con una dieta ad alto contenuto di grassi, visto che l'attività antiossidante della SOD è diminuita in questi ratti rispetto a ratti alimentati con una dieta a basso contenuto di grassi. Infatti, uno dei ruoli postulati del disaccoppiamento della fosforilazione ossidativa è quello di mantenere il potenziale della membrana mitocondriale al di sotto della soglia critica per la produzione dei ROS [Korshunov SS. &

coll. (1997)]. Anche se le due popolazioni di mitocondri del muscolo scheletrico utilizzano due meccanismi diversi, hanno entrambe la capacità di ridurre i danni ossidativi in presenza di un aumento del flusso di acidi grassi attraverso il muscolo scheletrico, dovuto all'eccesso di grasso presente nella dieta. Questo risultato è di rilevanza fisiologica, perché il muscolo scheletrico è l'organo che è maggiormente coinvolto nell'ossidazione degli acidi grassi in circolo ed è un potenziale sito di danni da ROS. Infine è interessante notare che in un lavoro svolto in precedenza nel laboratorio in cui ho svolto il dottorato, è stato trovato un aumento della resistenza all'insulina e dei danni da ROS nel muscolo scheletrico di ratti durante la fase dinamica di deposito di grassi, che segue un periodo di restrizione alimentare [Crescenzo R. & coll. (2006)]. Poiché, la resistenza all'insulina, ma non i danni da ROS, avviene in ratti alimentati con una dieta iperlipidica, sembra che la fase di recupero di grasso, dopo un periodo di restrizione calorica, sia più pericolosa dell'obesità suscitata da una dieta ad alto contenuto di grassi.

In conclusione, i risultati indicano che la stretta associazione tra l'alimentazione ad alto contenuto di grassi e l'insorgere di resistenza all'insulina sia in parte dovuta ad un danneggiamento della funzionalità mitocondriale muscolare, rivelando un possibile ruolo dei

mitocondri subsarcolemmatici. Per quanto riguarda, invece, il danno da radicali liberi, che potrebbe essere causato dall'elevato flusso di acidi grassi nel muscolo, come conseguenza di una dieta ad elevato contenuto di grassi, entrambe le frazioni mitocondriali muscolari innescano meccanismi, anche se diversi, di protezione dal danno ossidativo. Infine, un'interessante osservazione che può essere fatta riguarda il diverso comportamento dei mitocondri subsarcolemmatici e intermiofibrillari in ratti alimentati con una dieta iperlipidica sia nel coinvolgimento nell'insorgenza dell'insulino-resistenza sia nella prevenzione del danno ossidativo, confermando che il muscolo scheletrico ha due popolazioni di mitocondri non solo con caratteristiche biochimiche differenti, ma anche in grado di effettuare differenti risposte a stimoli ambientali.

DISCUSSIONE 3° DISEGNO SPERIMENTALE

I risultati ottenuti in questo disegno sperimentale hanno mostrato che in un modello di obesità e di insulino resistenza rappresentato da ratti adulti alimentati per sette settimane con una dieta iperlipidica vi sono importanti variazioni della funzionalità mitocondriale epatica associate con un alto livello di stress ossidativo.

Il modello animale utilizzato in questo studio è stato realizzato utilizzando ratti maschi adulti sedentari per le condizioni di stabulazione, e alimentati per sette settimane, un periodo che corrisponde ad una alimentazione cronica, con una dieta ad elevato contenuto di grassi prevalentemente saturi. Queste condizioni hanno reso gli animali obesi e resistenti all'insulina, ed è stata, anche, evidenziato, negli animali suddetti, lo stato di steatosi epatica, che è caratterizzata dall'accumulo di goccioline di grasso nel citoplasma degli epatociti. Questo modello animale è particolarmente interessante in quanto una situazione simile si verifica nella società occidentale, dove lo stile di vita caratterizzato da sedentarietà e diete iperlipidiche ha notevolmente incrementato l'incidenza dell'obesità e dell'insulino-resistenza [Kopelman PG. (2000)]. In questi soggetti obesi si verifica un'alta incidenza di steatosi epatica, che a volte rimane isolata, senza

ulteriori danni al fegato, ma può anche evolvere, innescando stati patologici denominati steatoepatiti.

Un altro dato interessante che caratterizza il modello animale utilizzato in questo studio è che lo sviluppo dell'obesità nei ratti adulti alimentati con la dieta iperlipidica per sette settimane è associato ad alti livelli plasmatici di NEFA (acidi grassi non esterificati).

Si configura una situazione in cui lo stato metabolico corporeo degli animali alimentati cronicamente con la dieta iperlipidica induce un eccessivo rifornimento di acidi grassi alle cellule epatiche dove questi non riescono ad essere smaltiti dando origine al deposito ectopico di trigliceridi. Il sito cellulare principale in cui avviene l'ossidazione degli acidi grassi è il mitocondrio, la cui funzione in parte determina il destino degli acidi grassi che, provenendo dal sangue, sono assorbiti dal fegato. È quindi possibile che l'eccesso di deposito di grassi nel fegato degli animali alimentati cronicamente con la dieta iperlipidica sia dovuto all'alterazione delle funzioni mitocondriali. I risultati ottenuti sui mitocondri isolati mostrano che lo Stato 3 e lo Stato 4 della respirazione sono drasticamente ridotti nei ratti alimentati con la dieta iperlipidica. Il decremento della capacità respiratoria dello Stato 3 è evidente con tutti i substrati utilizzati ed è inoltre in accordo con il dato riportato in letteratura secondo cui c'è meno ATP sintetasi nei

mitocondri isolati dal fegato grasso [Vendemiale G. & coll. (2001)]. D'altro canto, la diminuzione della capacità respiratoria dello Stato 4 è il risultato di un significativo decremento della conduttanza protonica basale mostrato dai mitocondri dei ratti alimentati con la dieta iperlipidica e suggerisce un incremento dell'efficienza mitocondriale in queste condizioni. La conduttanza protonica basale più bassa potrebbe essere dovuta all'alta percentuale di acidi grassi saturi presenti nella dieta iperlipidica, da noi utilizzata, la quale potrebbe causare cambiamenti nella composizione lipidica della membrana mitocondriale interna così come riportato in un recente lavoro di Hulbert et al. [Hulbert AJ. & coll. (2005)].

Una conseguenza dell'aumento dell'efficienza mitocondriale, è una minore ossidazione dei substrati energetici per ottenere una certa quantità di ATP, con conseguente diminuzione nel fegato dei ratti alimentati con la dieta iperlipidica dell'abilità di ossidare gli acidi grassi che provengono dal sangue, che rappresentano in queste condizioni il substrato energetico più abbondante. In contrasto con questi risultati, è stato precedentemente trovato che quando una dieta iperlipidica è somministrata a ratti molto giovani, essa non induce una diminuzione della capacità respiratoria mitocondriale epatica [Iossa

S.& coll. (2000)], e neanche un evidente deposito di trigliceridi nelle cellule epatiche [Romestaing C. & coll. (2007)].

Se ne deduce, quindi, che l'età alla quale si inizia una dieta iperlipidica è un importante fattore nel determinare il danneggiamento mitocondriale e l'accumulo di grassi in sede ectopica.

Le succitate modifiche del compartimento mitocondriale epatico trovate nei ratti alimentati con la dieta ad elevato contenuto di grassi potrebbero anche implicare un incremento nella produzione dei ROS da parte della catena respiratoria. Infatti uno dei ruoli principali della conduttanza protonica mitocondriale è di mantenere il potenziale di membrana al di sotto della soglia critica di produzione dei ROS [Korshunov SS. & coll. (1997)].

E' interessante notare che la produzione dei ROS è indicata come una delle potenziali cause che portano all'insulino-resistenza e alle malattie epatiche [Houstis N. & coll. (2006)]. Per questo motivo ho anche saggiato lo stato ossidativo dei mitocondri epatici dopo 7 settimane di dieta ad elevato contenuto lipidico, con la misura dell'attività dell' aconitasi e della SOD. Il rapporto più basso fra aconitasi attiva e totale trovato nei ratti alimentati con la dieta iperlipidica indica un incremento del danno ossidativo in queste condizioni, che non è compensato da un incremento delle difese

antiossidanti, siccome non sono state trovate variazioni nell'attività della SOD. L'incremento dei ROS nel fegato grasso è stato già dimostrato in precedenti lavori, ed è stato indicato come una delle cause che rendono le cellule del fegato più vulnerabili a danni ulteriori [Yang SQ. & coll. (2000); Hensley K. & coll. (2000)]. Tenendo presente il risultato differente ottenuto nel muscolo scheletrico, nel quale dopo sette settimane di dieta ad elevato contenuto lipidico era evidente una diminuzione del danno ossidativo mitocondriale sembrerebbe, quindi, che il fegato sia più vulnerabile allo stress ossidativo dovuto alla dieta iperlipidica, probabilmente perchè i meccanismi adattativi che difendono il muscolo scheletrico dal danno ossidativo, cioè l'incremento della conduttanza protonica basale e dell'attività della SOD, non si realizzano nel fegato.

In alternativa, un'altra possibilità è che l'incremento della produzione dei ROS epatici trovato nei ratti alimentati con dieta iperlipidica potrebbe essere coinvolto nella riduzione della capacità respiratoria mitocondriale, in quanto l'eccesso di acidi grassi che arriva alle cellule è molto suscettibile alla perossidazione da parte dei ROS, e i risultanti perossidi possono danneggiare le strutture mitocondriali [Schrauwen P. & coll. (2007)].

Quando il consumo di ossigeno mitocondriale è stato misurato nell'omogenato del tessuto epatico (in queste condizioni si tiene conto sia della massa proteica sia della capacità ossidativa del compartimento mitocondriale) nei ratti alimentati con la dieta iperlipidica, è stata trovata una capacità respiratoria dello Stato 3 significativamente più alta. Inoltre, il significativo incremento dei valori del rapporto del controllo respiratorio (RCR) ancora suggerisce che vi è una più alta efficienza mitocondriale. L'elevata capacità respiratoria ottenuta negli omogenati è indicativa esclusivamente di un incremento della massa proteica mitocondriale in quanto la capacità ossidativa è diminuita, come è evidente dai risultati ottenuti sui mitocondri isolati. L'aumento della massa mitocondriale proteica è stato confermato dalle misure basate sull'attività della citrato sintasi (CS). Osservazioni ultrastrutturali condotte nel laboratorio dove ho svolto il dottorato hanno rivelato un incremento del volume mitocondriale, senza variazioni del numero dei mitocondri. Queste modifiche del compartimento mitocondriale sono considerate indicative di un danneggiamento della divisione mitocondriale [Lenaz G. (1998)] e sono simili a quelle trovate in risposta all'invecchiamento [Lee HC. & Wei YH. (2005)] e allo stress ossidativo [Marchesini G. & coll. (2001)]. Dunque, possiamo ipotizzare che l'incremento della

massa proteica mitocondriale trovata nel fegato dei ratti alimentati con dieta ad elevato contenuto lipidico potrebbe essere in relazione con lo stress ossidativo di questo tessuto. E' presumibile, quindi, che nelle condizioni attuali l'aumento della massa proteica mitocondriale svolga un ruolo compensatorio della diminuita capacità respiratoria mitocondriale, con un aumento complessivo del consumo di ossigeno del fegato, ma col procedere della somministrazione della dieta iperlipidica e dell'aumento dell'età del ratto, danni successivi ai mitocondri cioè, un ulteriore declino della capacità ossidativa mitocondriale e un abnorme incremento del volume mitocondriale, porteranno ad una minore produzione di ATP con gravi conseguenze per le cellule epatiche.

In conclusione, i risultati indicano che alterazioni sia strutturali sia funzionali del compartimento mitocondriale epatico sono indotte dalla somministrazione cronica della dieta ad elevato contenuto lipidico e sono, quindi, associate con lo sviluppo dell'insulino resistenza e dell'immagazzinamento ectopico dei grassi nel fegato.

Complessivamente i risultati ottenuti sia sul muscolo sia sul fegato supportano l'idea emergente che le disfunzioni mitocondriali possano giocare un ruolo importante nelle patologie collegate con l'obesità come la resistenza all'insulina, l'ipertensione, il diabete di tipo 2 e le

malattie epatiche collegate con la steatosi epatica. D'altra parte, i suddetti stati patologici, sono strettamente associati all'assunzione a lungo termine di diete iperlipidiche, anche in assenza di iperfagia. Infatti, un ruolo importante sembra essere svolto dagli acidi grassi circolanti (NEFA), che in condizioni normali sono importanti substrati energetici per il cuore ed il muscolo scheletrico, ed anche importanti molecole-segnale, ma un loro aumento sia in circolo, sia nelle cellule può determinare una disfunzione del normale funzionamento delle cellule, strettamente collegato con l'obesità e le patologie suddette.

BIBLIOGRAFIA CITATA

- ❖ Allard M, Le Blanc J *Int J Obesity* **12**, pp. 169-178 (1988)
- ❖ Alpi A, Pupillo P, Rigano *Fisiologia delle piante (Fds) Napoli*, pp. 298-304 (2000)
- ❖ Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM *Biochem Biophys Acta* **1271**, pp. 165-170 (1995)
- ❖ Barr HG, McCracken KJ *Brit J Nutr* **51**, pp. 379-387 (1984)
- ❖ Barzilai N, Rossetti L *Am J Physiol* **269**, pp. 591-597 (1995)
- ❖ Bernestein RS, Marshall MC, Caney AL *Diabetes* **26**, pp. 770-779 (1977)
- ❖ Boden G, Shulman GI *Eur J Clin Invest* **32**, pp. 14-23 (2002)
- ❖ Bouchard C *Int J Obesity* **56**, pp. 12-205 (1994)
- ❖ Brand MD *Arch Biochem Biophys* **1018**, pp. 128-133 (1990)
- ❖ Brand MD, Chien LF, Ainscow EK, Rolfe DFS, Porter RK *Arch Biochem Biophys* **1187**, pp. 132-139 (1994)
- ❖ Bray GA, Paeratakul S, Popkin BM *Physiol Behav* **83**, pp. 549-555 (2004)
- ❖ Brown JL, Spicer MT, Spicer LJ *Endocrine* **19**, pp. 327-332 (2002)

- ❖ Bruce CR, Anderson MJ, Carey AL, Newmann DG, Bonen A, Kriketos AD, Cooney GJ, Hawley JA *J Clin Endocrinol Metab* **88**, pp. 5444-5451 (2003)
- ❖ Bugianesi E *Diabetologia* **48**, pp. 634-642 (2005)
- ❖ Caggiula AW, Mustak VA *Am J Clin Nutr* **65**, pp. 1590-1597 (1997)
- ❖ Campfield LA, Smith FJ, Burn P *Endocrinol Metab* **4**, pp. 81-102 (1997)
- ❖ Carmiel-Haggai MM, Cederbaum A, Nieto N *FASEB J* **19**, pp. 136-138 (2004)
- ❖ Crescenzo R, Lionetti L, Mollica MP, Ferraro M, D'Andrea E, Mainieri D, Dulloo AG, Liverini G, Iossa S *Diabetes* **55**, pp. 2286-2293 (2006)
- ❖ Dedukhova VI, Mokova EN, Skulachev VP, Starkon AA, Arigoni-Martelli E, Bobyleva VA *FEBS Lett* **295**, pp. 51-54 (1991)
- ❖ Drapier JC, Hibbs JB *J Meth Enzymol* **269**, p. 26 (1996)
- ❖ Farrell GC, Larter CZ *Hepatology* **43**, pp. 99-112 (2006)
- ❖ Flatt JP *Am J Clin Nutr* **45**, pp. 296-306 (1987)
- ❖ Flint DH, Allen RM *Chem Rev* **96**, p. 2315 (1993)
- ❖ Flohè L, Otting F *J Meth Enzymol* **105**, pp. 93-104 (1984)

- ❖ Folch J, Lees M, Stanley GHS *J Biol Chem* **226**, pp. 497-510 (1957)
- ❖ Fridovich I *Ann Rev Biochem* **64**, p. 97 (1995)
- ❖ Fromenty B, Robin MA, Igovaljil A, Mansouri A, Pessayre D *Diabets Metab* **30**, pp. 121-138 (2004)
- ❖ Furler SM, Oakes ND, Watkinson AL, Kraegen EW *Metab* **46**, pp. 1101-1106 (1997)
- ❖ Gardner PR *J Meth Enzymol* **349**, pp. 9-16 (2002)
- ❖ Gardner PR, Costantino G, Szabò C, Salzman AL *J Biol Chem* **272**, p. 25071 (1997)
- ❖ Gastaldelli A *Gastroenterology* **133**, pp. 496-506 (2007)
- ❖ Hamilton CL *J Comp Physiol Psychol* **58**, pp. 459-460 (1964)
- ❖ Hansford RG *Biochem Biophys Acta* **726**, pp. 41-80 (1983)
- ❖ Hartree EF *Anal Biochem* **48**, pp. 422-427 (1972)
- ❖ Hensley K, Kotake Y, Sang H *Carcinogenesis* **21**, pp. 983-989 (2000)
- ❖ Houstis N, Rosen ED, Landen ES *Nature* **440**, pp. 944-948 (2006)
- ❖ Hulbert AJ, Turner N, Storlien LH, Else PL *Biol Rev Camb Philos Soc* **80**, pp. 155-169 (2005)

- ❖ Hulsmann WC, Elliot WB, Slater EC *Arch Biochem Biophys* **39**, pp. 267-279 (1960)
- ❖ Ikemoto S, Thompson KS, Takahashi M, Hakura H, Lane MD, Ezaki O *Proc Natl Acad USA* **92**, pp. 3096-3099 (1995)
- ❖ Imlay JA, Fridovich I *J Biol Chem* **266**, p. 6957 (1991)
- ❖ Iossa S, Lionetti L, Mollica MP, Barletta A, Liverini G *Int J Obesity* **23**, pp. 1122-1128 (1999)
- ❖ Iossa S, Lionetti L, Mollica MP, Crescenzo R, Barletta A, Liverini G *Brith Journ of Nutrition* **84**, pp. 377-385 (2000)
- ❖ Iossa S, Lionetti L, Mollica MP, Crescenzo R, Botta M, Barletta A, Liverini G *Br J Nutr* **90**, pp.953-960 (2003)
- ❖ Iossa S, Mollica MP, Lionetti L, Crescenzo R, Tasso R, Liverini G *Diabetes* **53**, pp. 2861-2866 (2004)
- ❖ Jackson AA *Nutr Adapt in Man* **13**, pp. 111-126 (1984)
- ❖ Jagoe RT, Lecker SH, Gomes M, Goldberg AL *FASEB J* **16**, pp. 1697-1712 (2002)
- ❖ Kelley DE, Goodpaster BH, Storlien L *Ann Rev Nutr* **22**, pp. 325-346 (2002)
- ❖ Kelley DE, Mintun MA, Watkins SC, Simoneau JA, Jadili F, Frederickson A, Beattie J, Theriault R *J Clin Invest* **97**, pp. 2705-2713 (1996)

- ❖ Kopelman PG *Nature* **404**, pp. 635-643 (2000)
- ❖ Korshunov SS, Skulachev VP Starkov AA *FEBS Lett* **416**, pp. 15-18 (1997)
- ❖ Kraegen EW, Clark PW, Jenkins AB, Daley E, Chisholm DJ, Storlien LH *Diabetes* **40**, pp. 1397-1403 (1991)
- ❖ Lawton C, Burley V, Wales JK, Blundell JE *Int J Obesity* **17**, pp. 409-413 (1993)
- ❖ Lee HC, Wei YH *Int J Biochem Cell Biol* **37**, pp. 822-834 (2005)
- ❖ Lee YP, Lardy HA *J Biol Chem* **240**, pp. 1427-1436 (1965)
- ❖ Lenaz G *Biochem Biophys Acta* **1366**, pp. 53-67 (1998)
- ❖ Lissner L, Heithmann B *Eur J Nutr* **49**, 79-90 (1985)
- ❖ Liverini G, Iossa S, Mollica MP, Lionetti L, Barletta A *Cell Biochem and Function* **14**, pp. 283-289 (1996)
- ❖ Longo VD, Viola KL, Klein WL, Finch CE *J Neurochem* **75**, pp. 1977-1985 (2000)
- ❖ Maklashina E, Kotlyar AB, Karlien JS, Cecchini G *FEBS Lett* **556**, pp. 64-68 (2004)
- ❖ Marchesini G, Brizi M, Bianchi G *Diabetes* **50**, pp. 1844-1850 (2001)

- ❖ Mecocci P, MacGarvey U, Kaufman AE, Koontz D, Shoffner JM, Wallace DC, Beal MF *Ann Neurol* **34**, pp. 609-616 (1993)
- ❖ Musso G, Gambino R, Bo S *Diabetes Care* **31**, pp. 562-568 (2008)
- ❖ Musso G, Gambino R, De Michieli F *Hepatology* **37**, pp. 909-916 (2003)
- ❖ Naim M, Brand JC, Care MR *J Nutr* **155**, pp. 1447-1458 (1985)
- ❖ Nedergaard J *J Eur J Biochem* **133**, pp. 185-191 (1983)
- ❖ Nysembaum A, Smart J *Early Hum De* **6**, pp. 205-213 (1982)
- ❖ Oscai LB, Brown MM, Miller WC *Growth* **48**, pp. 415-424 (1984)
- ❖ Palmer JW, Tandler B, Hoppel CL *J Biol Chem* **252**, pp. 8731-8739 (1997)
- ❖ Petersen KF, Befroy D, Dofour S, Dziura J Arijan C Rothman DL, Di Pietro L, Cline GW, Shulman GI *Science* **300**, pp. 1140-1142 (2003)
- ❖ Petersen KF, Dufour S, Befroy D, Garcia R, Shulman GI *N Engl J Med* **350**, pp. 664-671 (2004)
- ❖ Polčić P, Šabova L, Kolarov J *FEBS Lett* **412**, pp. 207-210 (1997)
- ❖ Pullar JD, Webstrer JF *Brit J Nutr* **37**, pp. 355-366 (1977)

- ❖ Quant P, Robin D, Ferre P, Brand MD, Girard G *J Eur J Biochem* **195**, pp. 449-454 (1991)
- ❖ Ritov VB, Menshitova EV, He J, Ferrell RE, Goodpaster BH, Kelley DE *Diabetes* **54**, pp. 8-14 (2005)
- ❖ Rolfe DFS, Brand MD *Am J Physiol* **271**, pp. C1380- C1389 (1996)
- ❖ Rolfe DFS, Brown GC *Physiol Rev* **77**, pp. 731-758 (1997)
- ❖ Rolls BJ, Slide DJ *Nutr Rev* **50**, pp. 283-290 (1992)
- ❖ Romestaing C, Piquet MA, Bedu E *Nutr Metab* **4**, p. 4 (2007)
- ❖ Rothwell NJ, Stock MJ *J Physiol* **382**, pp. 371-377 (1982)
- ❖ Rothwell NJ, Stock MJ, Warwick BP *Metabolism* **34**, pp. 474-480 (1985)
- ❖ Sanyal AJ *Gastroenterology* **120**, pp. 1183-1192 (2001)
- ❖ Scalfani A *Obesity* pp. 125-139 (1993)
- ❖ Schönfel P *FEBS Lett* **264**, pp. 246-248 (1980)
- ❖ Schönfel P, Bohnensack R *FEBS Lett* **412**, pp. 167-170 (1997)
- ❖ Schrauwen P *Proc Nutr Soc* **66**, pp. 33-41 (2007)
- ❖ Seppale-Lindroos A *Clin Endocrinol Metab* **87**, pp. 3023-3028 (2002)
- ❖ Shulman GI *Eur J Clin Invest* **106**, pp. 171-176 (2000)

- ❖ Silverthon DU, Johnson BR *Fisiologia un approccio integrato, Austin USA*, pp. 59-60 (2005)
- ❖ Skulachev VP *Arch Biochem Biophys* **1363**, pp. 100-124 (1998)
- ❖ Soboll S, Grundel S, Schwabe U, Scholz R *Eur J Biochem* **141**, pp. 231-236 (1984)
- ❖ Sparks LM, Xie H, Koza RA, Mynatt R, Hulver MW, Bray GA, Smith SR *Diabetes* **54**, pp. 1953-1963 (2005)
- ❖ Srere PA *J Meth Enzymol* **13**, pp. 3 5 (1969)
- ❖ Stannard SR, Johnson NA *J Physiol* **554**, pp. 595-607 (2003)
- ❖ Stuart JA, Harper JA, Brindle KM, Brand MD *Arch Biochem Biophys* **1413**, pp. 50-54 (1999)
- ❖ Thomson C, Peters J, Reed G *Am J Clin Nutr* **55**, pp. 934-942 (1992)
- ❖ Vasquez-Vivar J, Kalyanaram B, Kennedy MC *J Biol Chem* **275**, pp. 14064-14069 (2000)
- ❖ Vendemiale G, Grattagliano I, Caraceni P *Hepatology* **33**, pp. 808-815 (2001)
- ❖ Vianna CR, Huntgeburth M, Coppari R *Cell Metab* **4**, pp. 453-464 (2006)
- ❖ Wallace DC *Science* **256**, pp. 628-632 (1992)

- ❖ Warwich Z, Schiffman S *Neurosc Biobehav Rev* **16**, pp. 585-596 (1992)
- ❖ Weiss R, Dofour S, Taksali SE, Tamborlane WV, Petersen KF, Bonadonna RC, Boselli L, Babetta G, Allen K, Rife F, Savaye M, Dziura J, Sherwin R, Shulman GI, Caprio S *Lancet* **362**, pp. 951-957 (2003)
- ❖ Wojtczak L *J Bioenerg Biomembr* **8**, pp. 293-311 (1976)
- ❖ Wojtczak L, Schönfel P *Arch Biochem Biophys* **1183**, pp. 41-57 (1993)
- ❖ Woods SC, Seeley RJ, Rushing PA, D'Alessio D, Tso P *J Nutr* **133**, pp.1081-1087 (2003)
- ❖ Wrigglesworth JM, Sharpe MA, Cooper CE *Biochem Soc Trans* **21**, pp. 781-784 (1993)
- ❖ Yang SQ, Zhu H, Li Y *Arch Biochem Biophys* **378**, pp. 259-268 (2000)
- ❖ Zborowski J, Wojtczak L *Arch Biochem Biophys* **70**, pp. 596-598 (1963)
- ❖ Zhou YP, Grill VE *Clin Invest* **93**, pp. 870-876 (1994)

BIBLIOGRAFIA CONSULTATA

1. Barzilai N, Rossetti L: "Relationship between changes in body composition and insulin responsiveness in models of the aging rats" *Am J Physiol* **269**, pp. 591-597 (1995)
2. Boden G, Shulman GI: "Free fatty acids in obesity and type 2 diabetes: defining their role in the development of insulin resistance and beta-cell dysfunction" *Eur J Clin Invest* **32**, pp. 14-23 (2002)
3. Brand MD: "The proton leak across the mitochondrial inner membrane" *Arch Biochem Biophys* **1018**, pp. 128-133 (1990)
4. Bruce CR, Anderson MJ, Carey AL, Newmann DG, Bonen A, Kriketos AD, Cooney GJ, Hawley JA: "Muscle oxidative capacity is a better predictor of insulin sensitivity than lipid status" *J Clin Endocrinol Metab* **88**, pp. 5444-5451 (2003)
5. Crescenzo R, Lionetti L, Mollica MP, Ferraro M, D'Andrea E, Mainieri D, Dulloo AG, Liverini G, Iossa S: "Altered skeletal muscle subsarcolemmal mitochondrial compartment during catch-up fat after caloric restriction" *Diabetes* **55**, pp. 2286-2293 (2006)
6. Drapier JC, Hibbs JB: "Aconitases: a class of metalloproteins highly sensitive to nitric oxide synthesis" *J Meth Enzymol* **269**, p. 26 (1996)

7. Flohè L, Otting F: "Superoxide dismutase assay" *J Meth Enzymol* **105**, pp. 93-104 (1984)
8. Folch J, Lees M, Stanley GHS: "A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue" *J Biol Chem* **226**, pp. 497-510 (1957)
9. Fridovich I: "Superoxide radical and superoxide dismutases" *Ann Rev Biochem* **64**, p. 97 (1995)
10. Gardner PR, Costantino G, Szabò C, Salzman AL: "Nitric oxide sensitivity of the aconitases" *J Biol Chem* **272**, p. 25071 (1997)
11. Gardner PR: "Aconitase: sensitive target and measure of superoxide" *J Meth Enzymol* **349**, pp. 9-16 (2002)
12. Hartree EF: "Determination of protein: a modification of Lowry method that gives a linear photometric response" *Anal Biochem* **48**, pp. 422-427 (1972)
13. Imlay JA, Fridovich I: "Assay of metabolic superoxide production in *Escherichia coli*" *J Biol Chem* **266**, p. 6957 (1991)
14. Iossa S, Lionetti L, Mollica MP, Barletta A, Liverini G: "Fat balance and hepatic mitochondrial function in response to fat feeding in mature rats" *Int J Obesity* **23**, pp. 1122-1128 (1999)
15. Iossa S, Lionetti L, Mollica MP, Crescenzo R, Barletta A, Liverini G: "Effect of long-term high-fat feeding on energy balance and

- liver oxidative activity in rats” *Brith Journ of Nutrition* **84**, pp. 377-385 (2000)
16. Iossa S, Lionetti L, Mollica MP, Crescenzo R, Botta M, Barletta A, Liverini G: “Effect of high fat feeding on metabolic efficiency and mitochondrial oxidative capacity in adult rats” *Br J Nutr* **90**, pp. 953-960 (2003)
17. Iossa S, Mollica MP, Lionetti L, Crescenzo R, Tasso R, Liverini G: “A possible link between skeletal muscle mitochondrial efficiency and age-induced insulin resistance” *Diabetes* **53**, pp. 2861-2866 (2004)
18. Jagoe RT, Lecker SH, Gomes M, Goldberg AL: “Patterns of gene expression in atrophying skeletal muscles: response to food deprivation” *FASEB J* **16**, pp. 1697-1712 (2002)
19. Korshunov SS, Skulachev VP Starkov AA: “High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria” *FEBS Lett* **416**, pp. 15-18 (1997)
20. Liverini G, Iossa S, Mollica MP, Lionetti L, Barletta A: “Hepatic fatty acid-supported respiration in rats fed on Energy-dense diet” *Cell Biochem and Function* **14**, pp. 283-289 (1996)
21. Nedergaard J: “The relationship between extramitochondrial Ca²⁺ concentration, respiratory rate, and membrane potential in

- mitochondria from brown adipose tissue of the rat” *J Eur J Biochem* **133**, pp. 185-191 (1983)
22. Petersen KF, Dufour S, Befroy D, Garcia R, Shulman GI: “Impaired mitochondrial activity in the insulin-resistant offspring of patient with type 2 diabetes” *N Engl J Med* **350**, pp. 664-671 (2004)
23. Petersen KF, Dufour S, Befroy D, Garcia R, Shulman GI: “Mitochondrial dysfunction in the elderly: possible role in insulin resistance” *N Engl J Med* **350**, pp. 664-671 (2004)
24. Rothwell NJ, Stock MJ: “Energy expenditure of “cafeteria-fed” rats determined from measurements of energy balance and indirect calorimetry” *J Physiol* **382**, pp. 371-377 (1982)
25. Sparks LM, Xie H, Koza RA, Mynatt R, Hulver MW, Bray GA, Smith SR: “A high-fat diet coordinately downregulates genes required for mitochondrial oxidative phosphorylation in skeletal muscle” *Diabetes* **54**, pp. 1953-1963 (2005)
26. Srere PA: “Citrate synthase” *J Meth Enzymol* **13**, pp. 3-5 (1969)
27. Stannard SR, Johnson NA: “Insulin resistance and elevated triglyceride in muscle: more important for survival than thrifty genes?” *J Physiol* **554**, pp. 595-607 (2003)

28. Weiss R, Dofour S, Taksali SE, Tamborlane WV, Petersen KF, Bonadonna RC, Boselli L, Babetta G, Allen K, Rife F, Savaye M, Dziura J, Sherwin R, Shulman GI, Caprio S: "Prediabetes in obese youth: a syndrome of impaired glucose tolerance, severe insulin, and altered myocellular and abdominal fat partitioning" *Lancet* **362**, pp. 951-957 (2003)