



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO

DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE

**CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN CHIMICA E
TECNOLOGIA FARMACEUTICHE**

TESI DI LAUREA

*Turnover dell'acido docosaesaenoico (DHA): studio su pazienti adulti
basato sulla variazione dell'abbondanza naturale di ¹³C.*

Relatore: Prof. Valerio di Marco

Correlatore: Dott.ssa Manuela Simonato

Laureanda: Chiara Righetti

Anno Accademico: 2021/2022

*A Sofia,
che non vedo l'ora di conoscere.*

Sommario

SIGLE	1
RIASSUNTO	3
ABSTRACT	5
1. INTRODUZIONE	7
1.1 L'acido docosaesaenoico	7
1.1.1 Fonti, intake e metabolismo	7
1.1.2 Proprietà antinfiammatorie del DHA.....	9
1.1.3 Potere antiossidante del DHA	11
1.1.4 Gli n-3 PUFAs e la loro azione cardio- e vasoprotettiva	13
1.1.5 Importanza del DHA nei deficit cognitivi legati all'età.....	16
1.1.6 DHA e funzionalità visiva	18
1.1.7 DHA e gravidanza.....	20
1.2 La gas cromatografia.....	22
1.2.1 Tecniche cromatografiche.....	22
1.2.2 Applicazioni della cromatografia.....	23
1.2.3 Gas cromatografia.....	23
1.3 La spettrometria di massa	26
1.3.1 Tecniche di ionizzazione.....	27
1.3.2 Analizzatori di massa	32
1.4 <i>Isotope Ratio Mass Spectrometry</i>	35
1.4.1 Gli isotopi.....	35
1.4.2 Utilizzo degli isotopi come traccianti	35
1.4.3 Abbondanza isotopica naturale	36
1.4.4 <i>Isotope Ratio Mass Spectrometry</i>	38
2. OBIETTIVI DELLA TESI	41
3. STRUMENTAZIONE	43
3.1 <i>Gas-chromatography-Flame Ionization Detector</i>	43
3.1.1 Iniettore <i>on-column</i>	43
3.1.2 Colonna <i>Omegawax™</i>	43
3.2 <i>Gas-chromatography-Combustion-Isotope Ratio Mass Spectrometry</i>	44
3.2.1 Colonna DB-225	44
3.2.2 DELTA V™ <i>Isotope Ratio Mass Spectrometer</i>	44
3.2.3 Calibrazione dello strumento	47

3.2.4 Software Isodat 3.0	48
4. Materiali e metodi.....	49
4.1 Descrizione della popolazione	49
4.2 Raccolta dei campioni.....	51
4.3 Preparazione dei campioni.....	52
4.4 Analisi qualitativa e quantitativa	53
4.5 Determinazione dell'arricchimento isotopico.....	54
4.6 Calcolo della cinetica di eliminazione	55
4.7 Analisi statistica.....	56
4.8 Solventi, composti e lipidi utilizzati	57
5. Risultati	59
5.1 Descrizione dei pazienti.....	59
5.2 Adesione al protocollo dello studio	59
5.3 Caratterizzazione del supplemento	61
5.3.1 Composizione	61
5.3.2 Caratterizzazione isotopica	61
5.4 Analisi quantitativa dei lipidi plasmatici	63
5.4.1 Fosfolipidi.....	63
5.4.2 Analisi quantitativa del DHA nei trigliceridi plasmatici	69
5.4.3 Variazione temporale del DHA nei fosfolipidi plasmatici	69
5.5 Analisi isotopica del DHA nei fosfolipidi plasmatici	71
6. Discussione	77
6.1 Analisi del profilo quantitativo	79
6.2 Analisi del profilo isotopico	80
6.2.1 Periodo di <i>washin</i>	80
6.2.2 Periodo di <i>washout</i>	81
7. Conclusione	83
Riferimenti	85

SIGLE

ALA	Acido α -linolenico
ARA	Acido arachidonico
BSO	<i>Buthionine Sulfoximine</i>
CAT	Catalasi
CE	Estere del colesterolo
CHD	<i>Coronary heart disease</i>
CO	Colesterolo libero
CO ₂	Anidride carbonica
COX	Ciclossigenasi
CVD	<i>Cardiovascular disease</i>
DHA	Acido docosaesaenoico
ECD	<i>Detector a cattura di elettroni</i>
EDTA	Acido etilendiamminotetracetico
eNOS	Enzima Ossido Nitrico Sintasi endoteliale
EPA	Acido eicosapentaenoico
ESI	<i>Electron spray ionization</i>
FFA	Acidi grassi liberi
FID	<i>Detector a ionizzazione di fiamma</i>
GC	Gas cromatografo
GC-C-IRMS	<i>Gas Chromatography-Combustion-Isotope Ratio Mass Spectrometry</i>
GC-IRMS	<i>Gas Chromatography-Isotope Ratio Mass Spectrometry</i>
GISSI	Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto
GL	Gas-liquido
GS	Gas-solido
GSH	Glutatione
GSSG	Glutatione ossidato
HSP90	<i>Heat shock protein 90</i>
HWD	<i>Detector a termoconducibilità</i>
IL-1	Interleuchina-1
IL-1 β	Interleuchina-1 β
IL-6	Interleuchina-6

IRMS	<i>Isotope ratio mass spectrometry</i>
ISS	Istituto Superiore di Sanità
JAK/STAT	<i>Janus Kinase/signal transducer and activator of transcription</i>
LA	Acido linoleico
LDL	<i>Low density lipoprotein</i>
LOX	Lipossigenasi
m/z	Rapporto massa su carica
MALDI	<i>Matrix assisted laser desorption ionization</i>
MAPK	<i>Mitogen activated protein kinase</i>
Mn-SOD	Superossido dismutasi-manganese dipendente
n-3	LC-PUFA Acido grasso polinsaturo omega-3 a lunga catena
NFκB	<i>Nuclear factor-kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NO	Ossido nitrico
O ²⁻	Ione superossido
PDB	Pee Dee Belemnite
PKB/Akt	Protein chinasi B
PL	Fosfolipide
ROP	Retinopatia del prematuro
ROS	Specie radicalica dell'ossigeno
RvD1	Resolvina D1
SOD	Superossido dismutasi
SOD1	Superossido dismutasi di tipo 1
SOD2	Superossido dismutasi di tipo 2
SOD3	Superossido dismutase di tipo 3
TG	Trigliceride
TLC	<i>Thin layer chromatography</i>
TNF	Fattore di necrosi tumorale
TNF-α	Fattore di necrosi tumorale di tipo α
UV	Ultravioletto
VCAM	Molecola vascolare di adesione cellulare
VCAM-1	Molecola vascolare di adesione cellulare di tipo 1
V-PDB	Vienna Pee Dee Belemnite

RIASSUNTO

Introduzione L'acido docosaesaenoico (DHA, C22:6n-3) è un acido grasso appartenente alla famiglia degli n-3 LC-PUFA la cui fonte principale è la dieta, in particolare attraverso l'assunzione di pesce ed oli di pesce. In piccola parte esso deriva anche dalla sintesi endogena a partire dall'acido linolenico (ALA). Infine, il DHA si trova nelle alghe, particolarmente adatte quindi all'integrazione in persone a dieta vegana o vegetariana.

Al DHA vengono attribuiti diversi effetti positivi per l'organismo umano: ha dimostrato di avere proprietà antinfiammatorie, antiossidanti, cardio e vasoprotettive e neuroprotettive; inoltre, essendo l'acido grasso più abbondante nella retina, è essenziale per il corretto sviluppo ed il mantenimento della funzionalità visiva. Per questo motivo, vi è sempre un maggior interesse nello studio del suo metabolismo.

Obiettivo L'obiettivo dello studio è quello di determinare la variazione quantitativa di DHA nei fosfolipidi plasmatici ed il suo *turnover*, ovvero la cinetica di incorporazione ed eliminazione, in questo *pool* lipidico.

Materiali e metodi Sono stati reclutati sette pazienti adulti, sani e a dieta onnivora. Essi hanno assunto quotidianamente per tre mesi un integratore contenente 250 mg di DHA proveniente da alghe. Durante i tre mesi di integrazione e i successivi tre mesi di *washout* sono stati prelevati campioni ematici a diversi tempi. Dai campioni sono stati isolati i fosfolipidi plasmatici, i quali sono stati analizzati mediante gas cromatografia allo scopo di determinare la variazione quantitativa di DHA nel tempo.

L'analisi del *turnover* è stata invece eseguita mediante GC-IRMS sfruttando il metodo dell'abbondanza naturale: il DHA all'interno dell'integratore contiene un quantitativo di ^{13}C naturalmente diverso rispetto al DHA da pesce e a quello prodotto endogenamente a partire da ALA. È quindi possibile, ai vari tempi, determinare la percentuale di DHA proveniente dall'integratore che viene incorporata nei fosfolipidi plasmatici misurando l'arricchimento isotopico espresso come $\delta(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})$.

Risultati L'analisi dell'arricchimento isotopico del DHA nei fosfolipidi plasmatici ha mostrato nella prima settimana un iniziale rapido aumento del valore di $\delta(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})$ rispetto al valore basale. A partire dalla seconda settimana

di supplementazione fino al termine dei tre mesi si è invece riscontrato un aumento più lento.

Dopo tre mesi di *washout*, si è poi visto che la quasi totalità del DHA proveniente dal supplemento è stata eliminata dai fosfolipidi plasmatici.

Discussione Dopo l'inizio della supplementazione, il DHA si distribuisce rapidamente nei fosfolipidi plasmatici, i quali possono essere considerati come indicatori a breve termine dell'*intake* dietetico di lipidi. Dopo una prima rapida incorporazione, l'aumento del $\delta(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})$ risulta meno marcato, questo perché i fosfolipidi plasmatici iniziano ad equilibrarsi con il DHA del supplemento.

Dopo l'interruzione della supplementazione, sono sufficienti tre mesi affinché il DHA proveniente dall'integratore venga quasi completamente eliminato da tale *pool*, ad indicare come tre soli mesi di supplementazione non siano sufficienti a garantire effetti a lungo termine nel soggetto adulto.

ABSTRACT

Introduction Docosahexaenoic acid (DHA, C₂₂:6n-3) is a fatty acid of the n-3 LC-PUFA family. The main source of DHA is the diet, in particular through the intake of fish and fish oil. A little amount is also endogenously synthesized from ALA. Finally, DHA is also found in algae which are therefore particularly suitable for supplementation in people adopting a vegetarian or vegan diet.

Several positive effects in the human body are attributed to DHA. It has been shown to have anti-inflammatory, antioxidant, cardio and vasoprotective and neuroprotective properties. Furthermore, being the most abundant fatty acid in the retina, it is essential for the development and maintenance of visual function. For these reasons, there is always a great interest in the study of its metabolism.

Aim of this study The aim of this study is to determine the quantitative variation of DHA in plasma phospholipids and its turnover, the kinetics of incorporation and elimination, in this lipid pool.

Materials and methods Seven healthy, omnivorous adult patients were enrolled. They took a supplement containing 250 mg of DHA from algae daily for three months. During the supplementation and the subsequent other three months of washout, blood samples have been collected at different time-points.

Plasma phospholipids have been isolated and analyzed by gas-chromatography to determine the quantitative variation of DHA over time.

The turnover analysis has been performed through GC-IRMS using the natural abundance technique: the DHA inside the supplement contains a naturally different amount of ¹³C with respect to the DHA from fish and that produced endogenously from ALA. It is therefore possible, at different times, to determine the percentage of DHA from the supplement that is incorporated into plasma phospholipids by measuring the isotopic enrichment expressed as $\delta(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})$.

Results The analysis of the isotopic enrichment of DHA in the plasma phospholipids shows a rapid increase in the $\delta(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})$ in the first week compared to the basal value. From the second week to the end of supplementation the increase was slower.

After three months of washout, almost all the DHA from the supplement was eliminated from the plasma phospholipids.

Discussion After the beginning of the supplementation, the DHA distributes into the plasma phospholipids, which can be considered as short-term markers of dietetic lipid intake. After a first rapid incorporation, the increase of the $\delta(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})$ is slower because the phospholipids start to equilibrate with the supplement.

When the supplementation is interrupted, the supplemented DHA is eliminated from this pool in three months, thus the administration of three months is not enough to ensure long-term effects in the adults.

1

INTRODUZIONE

1.1 L'Acido docosaesaenoico

1.1.1 Fonti, intake e metabolismo

L'acido docosaesaenoico (DHA) è un acido grasso omega-3 a lunga catena, esso appartiene quindi a quelli che vengono definiti *long chain polyunsaturated fatty acids* - LC-PUFAs. Il DHA è costituito da 22 atomi di C e presenta 6 insaturazioni, la prima delle quali si trova sul terzo atomo di carbonio a partire dall'estremità metilica; pertanto, viene indicato con la sigla C22:6n-3.

Il DHA è un acido grasso estremamente importante per l'organismo umano, sia per il bambino che per l'adulto che per il soggetto anziano; infatti, ad esso vengono attribuiti molti benefici, tra cui un'attività antinfiammatoria, antiossidante, cardioprotettiva, e neuroprotettiva; nel soggetto anziano è in grado di migliorare le capacità intellettive; inoltre, il DHA è un componente essenziale delle cellule neuronali della sostanza grigia e della retina (Innis, 2008) e pertanto è indispensabile per il corretto sviluppo cerebrale e della vista nel feto e nel neonato.

Per tutti questi motivi, secondo dati risalenti all'inizio degli anni 2000, la quantità di DHA+EPA¹ raccomandata dall'*American Heart Association* è di almeno 500 mg/giorno (Richter et al., 2017), mentre il *Department of Health and Human Services* consiglia che le donne in gravidanza o in allattamento consumino dai 300 ai 900 mg/giorno di EPA+DHA (Swanson et al., 2012). Per quanto riguarda soggetti adulti, invece, essi dovrebbero assumere un quantitativo giornaliero di DHA pari allo 0.5-2.0% dell'apporto energetico totale, mentre un bambino fino

¹ L'EPA è l'acido eicosapentaenoico C20:5n-3 e appartiene anch'esso alla famiglia degli n-3 LC-PUFAs; come il DHA, anche l'EPA ricopre un importante ruolo antinfiammatorio per l'organismo umano.

ai 6 mesi d'età dovrebbe assumere 10-12 mg/DHA/kg di peso corporeo ogni giorno (Denis et al., 2013).

Tuttavia, in Europa solo le popolazioni settentrionali soddisfano tali raccomandazioni, come evidente dai dati riportati in Tabella 1 (Ian Givens & Gibbs, 2008). Al contrario, in Regno Unito, Belgio, e Francia, e anche in Nord-America e Australia, la popolazione assume mediamente solo circa 200 mg/giorno di DHA+EPA. Pertanto, il DHA e gli omega-3 in generale sono spesso consigliati sotto forma di integratore alimentare.

Tabella 1 Valori di assunzione media giornaliera di DHA+EPA in vari Paesi (Ian Givens & Gibbs, 2008).

Country	Details	Intake of EPA + DHA (mg/d)	Reference
UK	Adults, 19–64 years, mean	244	Givens & Gibbs ⁽²³⁾
UK	Females, 19–24 years, mean	109	Gibbs <i>et al.</i> ⁽²⁹⁾
Belgium	Females, 18–39 years, mean	209	Sioen <i>et al.</i> ⁽²⁷⁾
Belgium	Females, 18–39 years, median	50	Sioen <i>et al.</i> ⁽²⁷⁾
Belgium	Children, 4–6.5 years, mean	75	Sioen <i>et al.</i> ⁽³⁰⁾
France	Women, 45–63 years	344	Astorg <i>et al.</i> ⁽³¹⁾
Australia	Adults	143	Howe <i>et al.</i> ⁽²⁶⁾
North America	Adults	200	Vermunt & Zock ⁽⁶⁰⁾
Mid-Europe	Adults	250	Vermunt & Zock ⁽⁶⁰⁾
Northern Europe	Adults	590	Vermunt & Zock ⁽⁶⁰⁾
Japan	Adults	950	Vermunt & Zock ⁽⁶⁰⁾

La principale fonte di DHA è la dieta ed in particolare gli n-3 LC-PUFAs si trovano nel pesce e negli oli di pesce (salmone, sardine, merluzzo, aringhe), nelle carni di manzo ed in quelle di agnello.

Per quanto riguarda le fonti marine, il DHA è più abbondante nei pesci selvatici rispetto a quelli di allevamento, poiché essi si nutrono di plankton a loro volta ricchi di DHA, ed in quelli che vivono in acque fredde i quali accumulano maggiormente LC-PUFAs per proteggersi dalle basse temperature.

Una ridotta quantità di DHA viene anche prodotta dall'organismo a partire dal precursore a catena corta acido α -linolenico (ALA – C18:3-3), il quale si trova principalmente in oli vegetali come l'olio di semi di lino, l'olio di semi di chia, nell'olio di semi di soia e anche in verdure a foglia verde (Saini & Keum, 2018). L'ALA viene considerato un acido grasso essenziale poiché l'organismo umano non possiede gli enzimi necessari alla sua biosintesi e di conseguenza esso deve essere necessariamente assunto tramite la dieta. Una volta assunto, l'ALA può essere biotrasformato in DHA mediante reazioni di desaturazione, elongazione ed infine β -ossidazione; la Figura 1 mostra la sequenza di reazioni che, a partire da ALA, portano alla sintesi di DHA (Saini & Keum, 2018). Tuttavia, meno

dell'1% di ALA viene effettivamente convertito in DHA (Goyens et al., 2005) e per questo il DHA deve essere introdotto tramite una dieta equilibrata.

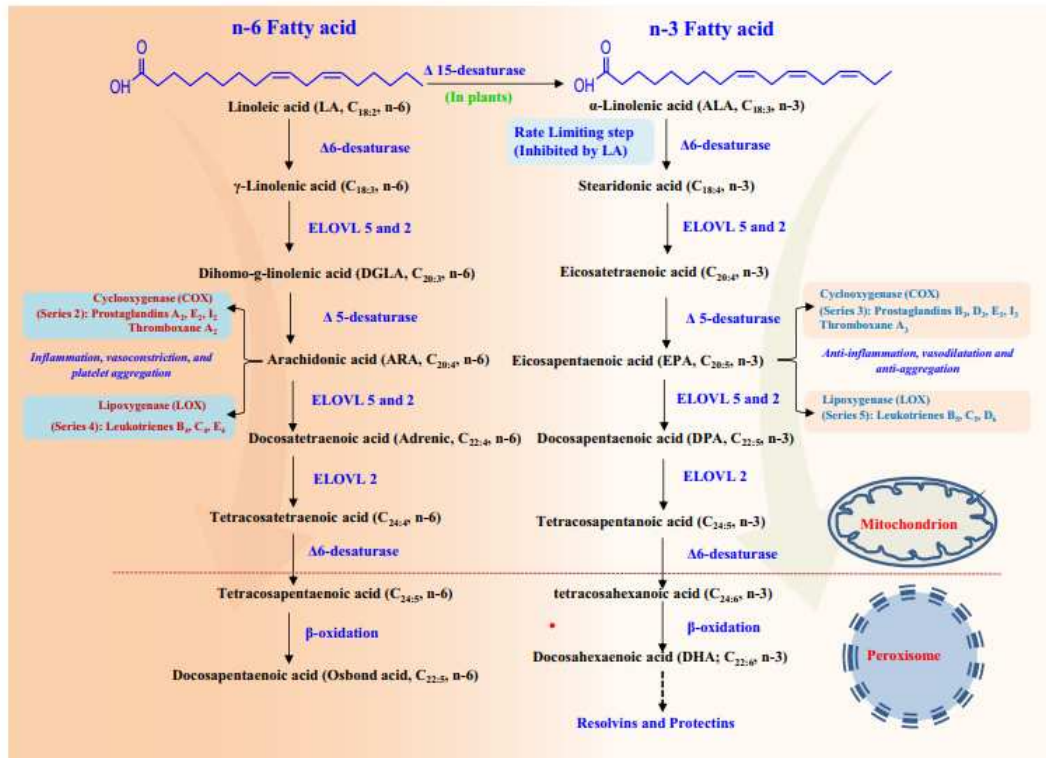


Figura 1 pathway biosintetico del DHA a partire da acido α-linolenico e di altri acidi grassi (Saini & Keum, 2018)

1.1.2 Proprietà antinfiammatorie del DHA

Al DHA vengono attribuite molte proprietà, tra cui quella antinfiammatoria alla cui base vi sono diversi meccanismi.

Secondo la definizione dell'ISS, il processo infiammatorio è un meccanismo di difesa fisiologico che l'organismo mette in atto quando riceve un insulto di varia natura; lo scopo dell'infiammazione è quello di neutralizzare l'agente che ha causato il danno, riparare tale danno ed infine ripristinare la corretta funzionalità tissutale.

Per espletare tutte queste funzioni vengono messi in gioco mediatori di tipo chimico (es. citochine), fisico (es. edema) e cellulare (es. linfociti). Quando però il processo infiammatorio non si risolve nei tempi e nei modi corretti può risultare a sua volta dannoso per l'organismo umano.

Il DHA e gli n-3 LC-PUFAs esplicano un ruolo antinfiammatorio agendo a vari livelli: secondo quanto affermato da Philip C. Calder, essi inibiscono l'espressione di mediatori chimici dell'infiammazione e l'attivazione dei *pathways* in cui questi mediatori sono coinvolti, alterano la stabilità della membrana plasmatica delle cellule immunitarie, e competono con l'acido arachidonico (ARA) per la sintesi di eicosanoidi (Calder, 2013). Diversi studi dimostrano come il DHA inibisca la sintesi di interleuchine pro-infiammatorie tra cui IL-1 ed IL-6 (Oppedisano et al., 2020; Swanson et al., 2012; Tan et al., 2018); sebbene i meccanismi tramite cui tali interleuchine mediano la risposta infiammatoria siano molti e complessi, è noto che IL-1 determina ad esempio l'attivazione di fattori di trascrizione come NFκB (Mantovani et al., 2019), mentre IL-6 porta all'attivazione del *pathway* di JAK/STAT e delle cascate delle MAPK (Heinrich et al., 2003) i quali sono rispettivamente coinvolti nell'attivazione dell'immunità innata (Xin et al., 2020) e nel processo infiammatorio che sta alla base di molte malattie infiammatorie di tipo cronico (Coulthard et al., 2009). Poiché il DHA inibisce l'espressione di tali interleuchine, è chiaro come anche tutti i processi attivati dalle interleuchine stesse vengano inibiti.

Oltre a ciò, gli n-3 LC-PUFAs sono in grado di contrastare l'infiammazione inibendo il *pathway* di TNF-α ed in maniera diretta quello di NFκB il quale risulta essere un fattore di trascrizione chiave per l'espressione di geni che codificano per enzimi e proteine coinvolti nella risposta infiammatoria (Oppedisano et al., 2020).

Oltre che sui mediatori chimici dell'infiammazione, il DHA è in grado anche di agire sulle cellule coinvolte in tale processo. Infatti, è stato dimostrato come il DHA, quando viene incorporato nelle membrane plasmatiche di tali cellule, sia in grado di alterarne la corretta organizzazione e di conseguenza la corretta funzionalità cellulare grazie al suo elevato grado di insaturazione (Calder, 2013). Inoltre, la sua presenza nelle membrane plasmatiche riduce la quantità di ARA presente e disponibile per la produzione di eicosanoidi pro-infiammatori da parte di ciclossigenasi (COX) e lipossigenasi (LOX), i quali portano rispettivamente alla produzione di prostaglandine e trombossani della serie 2 ed a leucotrieni della serie 4. Al contrario, il DHA, che è a sua volta un substrato di COX e LOX, porta alla sintesi di mediatori che favoriscono la risoluzione del processo infiammatorio: si tratta delle resolvine e delle protectine appartenenti alla serie

D (Figura 2) (Alzoubi and Aldomi AL-Domi 2017), le quali riducono, ad esempio, la tras migrazione e la diapedesi dei neutrofilii e l'espressione di IL-1 β e TNF (Calder, 2013).

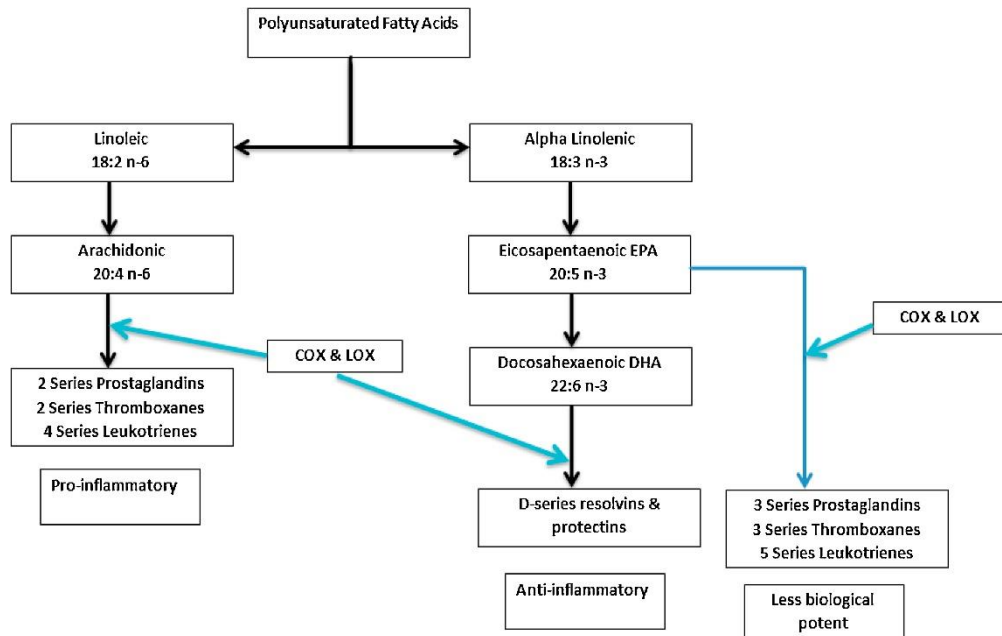


Figura 2 Metabolismo di ARA e DHA mediato da COX e LOX: metaboliti prodotti e loro ruolo nel processo infiammatorio (Alzoubi & Aldomi AL-Domi, 2017).

1.1.3 Potere antiossidante del DHA

Il mantenimento del corretto equilibrio ossidoriduttivo è sotto controllo omeostatico ed esso è particolarmente importante poiché lo stress ossidativo, caratterizzato da un eccesso di specie radicaliche dell'ossigeno (ROS), risulta essere la concausa di diversi fenomeni avversi come ad esempio invecchiamento cutaneo, infiammazione cronica, disturbi metabolici fino ad arrivare a disturbi cardiovascolari ed anche all'insorgenza neoplastica. Per questo motivo l'utilizzo di antiossidanti come *scavenger* per prevenire almeno in parte questi eventi può risultare utile.

L'organismo umano possiede già da sé dei sistemi antiossidanti, tra cui il Glutathione GSH, la Superossido dismutasi SOD e la Catalasi CAT. Il GSH è un tripeptide costituito da Glicina, Cisteina ed Acido glutammico; esso esplica la

sua azione antiossidante tramite la porzione tiolica della Cisteina ed in particolare risulta essere un agente riducente quando questa è nella sua forma ridotta -SH. In seguito alla neutralizzazione di molecole ossidanti come l'idrogeno perossido (H_2O_2), il GSH esiste nella forma ossidata GSSG; quindi, due molecole di GSH ossidate si trovano legate da un ponte disolfuro. A questo punto, il ponte disolfuro deve essere ridotto così da ripristinare il corretto contenuto di GSH.

La SOD è invece un enzima che esiste in tre isoforme: SOD1 citosolica, SOD2 mitocondriale e SOD3 extracellulare. Essa sfrutta diversi cofattori metallici: la SOD1 e la SOD3 dipendono da Cu e Zn mentre la SOD2 è dipendente dal Mn. L'azione antiossidante della SOD consiste nel catalizzare la reazione di dismutazione dell'anione superossido O_2^- portando alla produzione di O_2 ed H_2O_2 .

La catalasi, infine, sfruttando uno ione ferrico (Fe^{3+}), concorre allo smaltimento di H_2O_2 trasformandolo in O_2 ed H_2O .

Per quanto riguarda l'azione antiossidante del DHA, studi *in vitro* hanno dimostrato che esso è in grado di aumentare i livelli di GSH agendo sull'attività degli enzimi predisposti al ripristino della forma ridotta (Arab et al., 2006). Il DHA è inoltre presente in grande quantità nelle membrane mitocondriali ed esercita un'azione antiossidante anche a questo livello. Studi su modelli animali alimentati con oli di pesce, ricchi di DHA, o con un integratore alimentare a base di LC-PUFAs, hanno infatti dimostrato un'aumentata espressione ed attività dell'enzima superossido dismutasi SOD2 (Abdukeyum et al., 2016; Herrera et al., 2015) e della CAT (Wall et al., 2010).

Il DHA è quindi utile per il mantenimento di un buono stato di salute nell'organismo umano e, come vedremo, l'effetto antiossidante, assieme a quello antinfiammatorio, sono coinvolti in quelle che sono le sue proprietà cardioprotettive.

1.1.4 Gli n-3 PUFAs e la loro azione cardio- e vasoprotettiva

Sono molte le evidenze che attribuiscono agli n-3 PUFAs il ruolo di protettori cardiovascolari ed è per questo motivo che l'*American Heart Association* consiglia un'ingestione di almeno 500 mg/giorno di DHA+EPA allo scopo di prevenire malattie cardio coronariche; inoltre sarebbe opportuno che soggetti già colpiti da CHD (*Coronary Heart Disease*) raddoppiassero tale dose (Mori, 2018). A sostegno di tali proprietà, in una metanalisi del 2002, Bucher et al. hanno dimostrato come una dieta ricca in n-3 PUFAs riduca in maniera significativa, rispetto ad un gruppo di controllo, il rischio di infarto fatale del miocardio (Bucher et al., 2002). Analogamente, Whelton et al. hanno dimostrato una riduzione del rischio di CHD fatale e totale (Whelton et al., 2004). Infine, studi randomizzati condotti dal GISSI (Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto) hanno dimostrato come l'assunzione di n-3 PUFAs riduca la mortalità associata ad eventi cardiovascolari, la morte improvvisa per cause cardiache ed anche l'ospedalizzazione per malattie cardiovascolari (Mori, 2018).

Anche in questo caso vi sono numerosi meccanismi tramite cui gli n-3 PUFAs esplicherebbero un'azione cardio- e vasoprotettiva: di seguito ne vengono descritti alcuni.

A livello vasale vi è un effetto vasodilatatorio dovuto ad un aumento dei livelli di ossido nitrico (NO). Questa molecola è infatti nota per le sue proprietà vasodilatatorie, le quali risultano utili nel momento in cui un vaso, ad esempio una coronaria, è eccessivamente costretto poiché ciò determina un ridotto afflusso sanguigno al cuore con rischio di infarto miocardico. Condizioni di stress ossidativo determinano un aumento di ROS accompagnato da una diminuzione di NO. Gli n-3 PUFAs sarebbero invece in grado di stimolare la sua sintesi ed il DHA, in particolare, stimola il legame tra eNOS, enzima endoteliale deputato alla sintesi di NO, ed HSP90 con conseguente attivazione del *pathway* PKB/Akt il quale determina l'attivazione di eNOS stesso (Figura 3) (Oppedisano et al., 2020).

Sempre a livello vasale, un altro effetto che il DHA ha dimostrato di avere è quello anti-aterosclerotico. L'aterosclerosi è una patologia infiammatoria caratterizzata dalla formazione di placche aterosclerotiche a livello della tonaca intima di vasi arteriosi; queste sono costituite da lipoproteine ossidate, tessuto

connettivo e sono caratterizzate dalla presenza di cellule infiammatorie come macrofagi. La loro presenza riduce il calibro del vaso e di conseguenza l'afflusso sanguigno ad organi come il cuore, il cervello, gli arti; inoltre, può determinarsi un flusso sanguigno turbolento che può portare alla rottura della placca ed alla formazione di emboli che, viaggiando nel torrente sanguigno, possono raggiungere un vaso coronarico, cerebrale, periferico ed occluderlo, causando così l'ischemia di tutto il tessuto a valle. Gli n-3 PUFAs sarebbero in grado di contrastare il fenomeno aterogenico; infatti, studi animali dimostrano che essi sono associati ad una riduzione della sintesi di LDL, ad una riduzione della loro ossidazione e ad un aumento della loro rimozione dal vaso (Oppedisano et al., 2020). Poiché le LDL ossidate sono una componente della placca aterosclerotica, in ultima analisi gli n-3 PUFAs ne contrasta la formazione.

Inoltre, come precedentemente accennato, l'aterosclerosi è caratterizzata anche dal reclutamento di cellule infiammatorie e questo si verifica tramite l'intervento di proteine appartenenti alla famiglia delle VCAM (*Vascular Cellular Adhesion Molecules*). Studi su modelli cellulari trattati con fattori pro-aterogenici hanno dimostrato che il DHA è in grado di ridurre i livelli di VCAM-1 (Figura 4) (Massaro et al., 2010), la quale opera a livello endoteliale, e questo potrebbe concorrere a ridurre il processo infiammatorio a livello locale. Oltre a ciò, un effetto antinfiammatorio locale potrebbe essere attribuito alla produzione di mediatori "pro-risoluzione" derivanti dal DHA, come la RvD1 (Oppedisano et al., 2020). Infine, un effetto anti-aterosclerotico è dovuto all'aumento dei livelli di NO, poiché esso riduce la proliferazione delle cellule muscolari lisce, l'aggregazione piastrinica e l'adesione leucocitaria, tutti fenomeni coinvolti nella formazione delle placche (Versari et al., 2009).

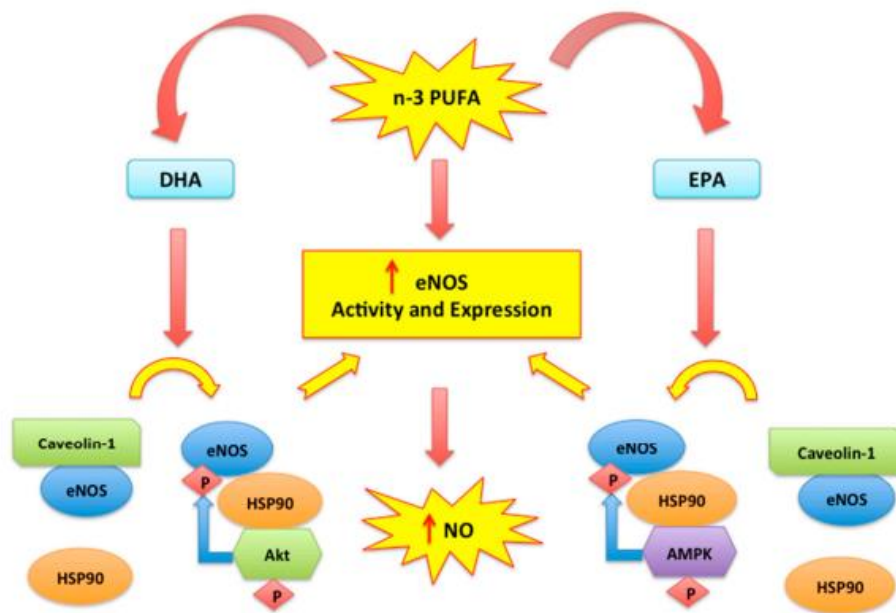


Figura 3 Attivazione dell'enzima eNOS tramite stimolazione del *pathway* PKB/Akt da parte del DHA (Oppedisano et al., 2020).

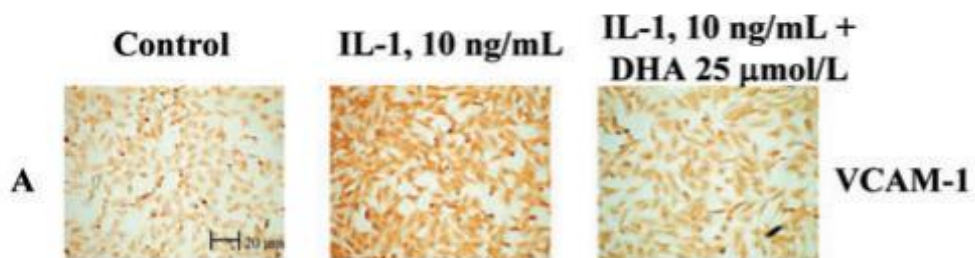


Figura 4 Riduzione dell'espressione della VCAM-1 endoteliale in cellule trattate con IL-1 e con DHA (Massaro et al., 2010).

Guardando invece alle proprietà antiossidanti degli n-3 PUFAs, queste risultano utili nel contrastare il cosiddetto danno da ischemia e riperfusione. Esso si verifica quando un tessuto rimane a lungo in una condizione di ischemia, ovvero non riceve ossigeno e nutrienti; quando poi il corretto afflusso sanguigno si ristabilisce in maniera improvvisa, questo determina l'insorgenza di uno stato infiammatorio ed un aumento delle ROS, le quali causano un danno a livello tissutale. Quando questo si verifica a livello cardiaco, gli n-3 PUFAs possono però contrastare tali fenomeni riducendo la sensibilità dei cardiomiociti verso i ROS; inoltre, l'azione antiossidante del DHA, in particolare quella mitocondriale

caratterizzata da un aumento di Mn-SOD, è utile nel ridurre il contenuto di ROS (Oppedisano et al., 2020).

In conclusione, è evidente come tutti gli studi attribuiscono agli n-3 PUFAs importanti proprietà vaso- e cardioprotettive e questo giustifica il desiderio di approfondire la conoscenza nei confronti di specifici acidi grassi quali il DHA ed il suo metabolismo.

1.1.5 Importanza del DHA nei deficit cognitivi legati all'età

È evidente come le aspettative di vita in Paesi sviluppati sia sempre più in aumento e con esse anche la percentuale di popolazione anziana; a questo però si vanno ad affiancare anche tutti i disturbi e le patologie tipiche del soggetto anziano, tra cui il declino cognitivo correlato all'età, la demenza senile o patologie neurodegenerative come il morbo di Alzheimer.

Questo ha per forza di cose un impatto non indifferente sulle spese che il Paese deve affrontare in termini di sanità pubblica ed assistenza verso il soggetto anziano e per questo motivo vi è una grande necessità di trovare non solo terapie efficaci nel contrastare tali condizioni ma anche strategie che consentano di prevenirne l'insorgenza. Tra le abitudini alimentari della popolazione, uno dei parametri da valutare è l'ingestione del DHA; esso, infatti, è l'acido grasso più abbondante nel cervello dei mammiferi (Innis 2007; Mallick et al. 2019), compreso quindi l'uomo, e per questo risulta essere essenziale per il suo corretto sviluppo e per il mantenimento della sua corretta integrità e funzionalità.

Diversi studi su modelli animali e sull'uomo sono stati condotti allo scopo di valutare l'effetto che il DHA potesse avere sul declino cognitivo; tuttavia, i risultati non sono chiari, probabilmente perché non è così facile isolare il ruolo di un singolo nutriente su un processo complesso come la funzionalità cerebrale, la quale è senz'altro influenzata da numerosi fattori oltre alla dieta, come ad esempio il patrimonio genetico, il contesto socioeconomico ecc. Tuttavia, a sostegno del ruolo positivo del DHA, dati di letteratura associano un elevato consumo di pesce, notoriamente ricco di tale n-3 LC-PUFAs, ad un minor rischio di sviluppare demenza correlata all'età, ed Alzheimer. Inoltre, il DHA potrebbe essere protettivo anche nei confronti dei fattori di rischio correlati all'insorgenza di tali condizioni (es. traumi, diabete, CVD) (Cole et al., 2009). Studi animali hanno anche confermato che la perdita della memoria, soprattutto a breve

termine, viene compromessa da una carenza di n-3 PUFAs (Denis et al., 2013) suggerendo come invece una loro integrazione potrebbe contrastare tale fenomeno.

D'altro canto, però, vi sono anche studi che non mostrano differenze nelle prestazioni cognitive di soggetti anziani e sani prima e dopo il trattamento con n-3 PUFAs, o in cui queste differenze sono lievi (Sydenham et al., 2012). Altri studi invece mostrerebbero un ruolo protettivo quando le condizioni cognitive non sono più del tutto ottimali e quando la dose di n-3 PUFAs assunta giornalmente è elevata (900-1000 mg/giorno) (Lauritzen et al., 2016).

Nonostante le evidenze in merito al ruolo protettivo del DHA nei confronti del declino cognitivo legato all'età non siano del tutto chiare né del tutto concordi, rimane indubbio come esso sia una componente essenziale del sistema nervoso e pertanto si è voluto comunque indagare i meccanismi implicati nel mantenimento della corretta funzionalità cerebrale. A livello cerebrale, è stato ipotizzato che il DHA agisca in maniera differente quando si trova all'interno delle membrane delle cellule neuronali e quando invece agisce come acido grasso libero: nel primo caso esso influenzerebbe la velocità di trasduzione del segnale e la velocità della neurotrasmissione, mentre nel secondo caso regolerebbe l'attività di canali ionici ed avrebbe un ruolo neuroprotettivo grazie ai metaboliti, come la neuroprotectina D1, che derivano da esso (Innis 2007). A livello di membrana plasmatica, grazie alla sua lunga catena carboniosa ed al suo elevato grado di insaturazione, il DHA è inoltre fondamentale per mantenere le corrette condizioni di fluidità, le quali sono necessarie per il mantenimento della trasmissione assonale, per la regolazione di enzimi di membrana, per il controllo di canali ioni e di recettori di membrana (Yehuda et al., 2002). Per quanto riguarda l'effetto positivo sulla memoria, questo sarebbe da attribuirsi al ruolo del DHA nei confronti della sinapsi glutamatergica; questa, particolarmente abbondante a livello di ippocampo, presiede appunto alla formazione della memoria ed il DHA si è dimostrato in grado di implementarne la funzionalità e di mantenerla anche durante l'invecchiamento (Denis et al., 2013).

Infine, guardando nello specifico al morbo di Alzheimer, il DHA si è dimostrato essere in grado di ridurre la formazione delle placche β -amiloidi le quali sono implicate nella patogenesi della malattia; inoltre, il DHA è associato ad un aumento dei livelli di fattori neurotrofici e neuroprotettivi ed al contempo ad una

riduzione delle prostaglandine derivanti da ARA che invece promuoverebbero l'insorgenza del morbo (Sydenham et al., 2012).

1.1.6 DHA e funzionalità visiva

Il DHA è l'acido grasso più abbondante nelle membrane plasmatiche delle cellule che costituiscono la retina (Innis, 2008) dove rappresenta circa il 40% degli acidi grassi totali (Mallick et al., 2019). La componente retinica più ricca di DHA sono i segmenti esterni dei fotorecettori a bastoncello (Lafuente et al., 2021). Il DHA è quindi essenziale per il corretto sviluppo dell'acuità visiva ed il mantenimento della funzionalità della retina.

L'evento biologico alla base della capacità di vedere prende il nome di fototrasduzione ed è il meccanismo tramite cui la luce viene convertita in impulsi nervosi. Questo avviene grazie ai fotorecettori, coni e bastoncelli, che si trovano nella parte posteriore della retina. Le molecole che nei fotorecettori consentono il processo di fototrasduzione sono i fotopigmenti. A livello dei bastoncelli il fotopigmento è la rodopsina, una proteina integrale di membrana costituita da una porzione proteica (opsina) e da una porzione organica (*cis*-retinale); la rodopsina è accoppiata ad una proteina G che prende il nome di trasducina.

Il processo di fototrasduzione si basa su una serie di modifiche conformazionali della rodopsina, indotte dall'assorbimento di fotoni ed atte ad attivare la trasducina, e della trasducina stessa. L'importanza del DHA nello sviluppo dell'acuità visiva e nel mantenimento della corretta funzionalità della retina è confermata da diversi studi animali che hanno dimostrato come una carenza di ALA e LA sia associata ad una carenza di DHA a livello retinico e, da un punto di vista funzionale, questa è associata ad una ridotta sensibilità della retina nei confronti della luce; inoltre, si è visto che la rodopsina ha una minor capacità di assorbire fotoni (Sinclair, 2019).

Questi dati possono essere giustificati dal fatto che la presenza del DHA nelle membrane plasmatiche delle cellule del bastoncello conferisce loro un elevato grado di fluidità; come spiegato, il processo di fototrasduzione mediato dai bastoncelli si basa su una serie di modifiche conformazionali di rodopsina e trasducina, ma se la membrana plasmatica fosse troppo rigida, queste modificazioni conformazionali non avverrebbero in maniera agevole. Data

tuttavia la fluidità conferita dal DHA, queste possono avvenire in maniera efficiente (Sinclair, 2019).

Il DHA contribuisce a mantenere la corretta funzionalità delle cellule della retina grazie anche al suo effetto antiossidante; infatti, studi condotti su modelli cellulari di cellule epiteliali pigmentate della retina sottoposte a condizioni di stress ossidativo mediante l'aggiunta di H₂O₂ o di BSO (*Buthionine Sulfoximine*) hanno dimostrato una riduzione dei livelli di ROS se vi è la presenza di DHA (Lafuente et al., 2021).

Particolare interesse è inoltre rivolto all'importanza del DHA per il feto e per il neonato. Durante la gravidanza è la madre a fornire DHA al feto poiché questo non è in grado di produrlo da sé a sufficienza; dopo la nascita, invece, il DHA deriva essenzialmente dal latte materno. Molti studi sono stati condotti sia su neonati a termine che pretermine ed in entrambi i casi è stato osservato un effetto positivo del DHA sulla funzionalità visiva. Negli studi sui neonati a termine è stato valutato l'effetto che la supplementazione di DHA ha sull'acuità visiva rispetto all'assunzione di latti artificiali che non ne contengono. Birch et al. hanno dimostrato che a 12 mesi l'acuità visiva, misurata tramite *Visual Evoked Potential*, di neonati che hanno assunto una integrazione di DHA è significativamente migliore rispetto a quella di un gruppo di controllo che non ha assunto DHA (Birch et al., 2010); analogamente Carlson et al. hanno dimostrato che l'acuità visiva valutata a due mesi è migliore in neonati che hanno assunto un supplemento di DHA ed ARA rispetto al gruppo che non ha ricevuto il supplemento (Carlson et al., 1996); infine Birch et al. hanno dimostrato che l'assunzione di DHA o di DHA ed ARA migliora l'acuità visiva a 6, 17 e 52 settimane rispetto ad un gruppo di controllo che ha assunto lo stesso latte artificiale ma non arricchito di DHA e/o ARA (Birch et al., 1998).

L'accumulo a livello cerebrale e retinico di DHA è prevalente durante l'ultimo trimestre di gravidanza e per questo motivo bambini nati pretermine sono spesso associati a livelli più bassi di DHA ed a patologie della vista come la Retinopatia del Prematuro – ROP. Smithers et al. hanno confrontato l'acuità visiva a 4 mesi *corrected age* di pretermine che hanno assunto una supplementazione di DHA pari all'1% dei lipidi totali contenuti nel latte artificiale in confronto ad un gruppo che ha assunto solo lo 0.3% di DHA: il gruppo ad alto dosaggio ha mostrato una acuità visiva significativamente migliore (Smithers et al., 2008). Risultati positivi sono stati ottenuti anche da Faldella et al., i quali hanno confrontato un

gruppo che ha ricevuto latte materno ed uno che ha ricevuto un latte artificiale arricchito di LC-PUFAs con uno che ha ricevuto un latte artificiale standard per neonati pretermine (Faldella et al., 1996).

1.1.7 DHA e gravidanza

Il DHA ha un effetto positivo e riconosciuto sul corretto neurosviluppo fetale e neonatale e sul mantenimento di un buono stato di benessere della madre. Il DHA, infatti, è particolarmente abbondante anche a livello della corteccia frontale, dove rappresenta il 15% degli acidi grassi totali (Malcolm et al. 2003). Studi su bambini, le cui madri hanno assunto un supplemento di DHA durante la gravidanza, hanno dimostrato una aumentata coordinazione ed un migliorato sviluppo cognitivo fino ai 5.5-6.5 anni di vita (Malcolm et al. 2003). Anche l'assunzione di un supplemento da parte del neonato porta ad effetti positivi sul suo sviluppo cognitivo: molti studi, infatti, dimostrano capacità di *problem-solving*, capacità comunicative ed una memoria migliori in bambini che hanno assunto DHA sotto forma di integratore rispetto a coloro che non lo hanno assunto (Malcolm et al. 2003).

Studi *in vivo* e su modelli animali sono stati condotti allo scopo di comprendere i meccanismi tramite cui il DHA partecipi al neurosviluppo del feto e del neonato. È stato dimostrato il suo ruolo sulla rigenerazione delle cellule neuronali e sulla sinaptogenesi non solo durante il periodo fetale, ma fino anche ai primi due anni di vita. Inoltre, è emerso che in animali carenti di DHA, a livello di corteccia cerebrale, vi è una ridotta espressione di fattori che promuovono la plasticità neuronale affiancata ad un aumento di *markers* infiammatori. Si è anche visto che, se i corretti contenuti di DHA sono ristabiliti, l'espressione di tali molecole ritorna ad uno stato fisiologico, confermando il ruolo del DHA nella neuroinfiammazione e nella plasticità sinaptica (Malcolm et al. 2003).

Infine, come riportato da alcuni studi *in vivo*, il DHA facilita la neurogenesi aumentando la fluidità di membrana in particolari regioni dell'ippocampo, della corteccia prefrontale e dell'ipotalamo. Questo stabilizza i circuiti di neurosviluppo necessari per l'apprendimento e la memoria (Malcolm et al. 2003).

Vi sono molti dati a sostegno del fatto che l'assunzione di DHA durante la gravidanza ha effetti positivi sugli esiti della gravidanza stessa: è ampiamente

dimostrata la correlazione tra tale assunzione ed una ridotta incidenza di parto pretermine (Abdelrahman et al., 2022), e anche qualora la nascita avvenisse prima delle 34 settimane di gestazione, è stata osservata una ospedalizzazione più breve se durante la gravidanza era stato assunto un supplemento di DHA (Carlson et al., 2013).

Oltre che sul neonato, l'assunzione di DHA concorre al mantenimento del benessere anche della madre; un esempio è l'associazione tra DHA e depressione postparto. Secondo l'Istituto Superiore di Sanità, si tratta di un disturbo che colpisce l'8-12% delle neomamme e che inizia a manifestarsi attorno alla sesto-dodicesima settimana dopo il parto. Diversi studi hanno dimostrato una correlazione tra ridotti livelli di DHA e l'incidenza di depressione postparto ed è anche stato osservato come i livelli plasmatici di DHA dopo il parto siano inferiori in madri che sviluppano sintomi depressivi rispetto a chi non li sviluppa. Infine, in uno studio pilota, l'assunzione per 8 settimane di diversi dosaggi di DHA ed EPA in un rapporto 1.5:1 ha dimostrato una riduzione dose-dipendente dei sintomi depressivi in casi di depressione postparto (Levant, 2011).

1.2 La gas cromatografia

1.2.1 Tecniche cromatografiche

La cromatografia è una tecnica che consente la separazione dei componenti di una miscela sulla base delle loro differenti caratteristiche chimico-fisiche. La cromatografia utilizza due fasi: la fase stazionaria che riveste la superficie del letto cromatografico e la fase mobile che si muove in una direzione definita lungo il letto cromatografico. I composti interagiscono diversamente con le due fasi e questo ne determina la separazione.

Le diverse tecniche cromatografiche vengono classificate in base alla forma del letto cromatografico (cromatografia su colonna; cromatografia su strato sottile), in base allo stato fisico della fase mobile (cromatografia liquida; gas cromatografia; cromatografia fluida supercritica), e in base al meccanismo di separazione (adsorbimento; ripartizione; scambio ionico; affinità; esclusione dimensionale). La tecnica cromatografica più adatta viene scelta sulla base delle caratteristiche del campione.

Nel caso di una cromatografia su colonna, le componenti principali dello strumento sono l'iniettore (inietta il campione all'interno della colonna), la colonna (separa gli analiti), e il rivelatore, o *detector* (rivela gli analiti). Dopo che gli analiti hanno raggiunto il *detector*, un *software* elabora il segnale fornendo il cromatogramma (Figura 5), ovvero un grafico sul cui asse delle ascisse è riportato il tempo di ritenzione² e sul cui asse delle ordinate è riportata l'intensità di ciascun picco cromatografico. Gli strumenti più moderni sono dotati anche di un sistema di integrazione automatica che fornisce le aree sottese da ciascun picco.

Nel caso della cromatografia su strato sottile, invece, il letto cromatografico consiste in una lastra di silice sulla quale vengono seminati i campioni. La fase mobile è data dai vapori di eluente che si formano all'interno della camera cromatografica. In questo caso non è presente un *detector*, ma gli analiti appaiono come macchie che possono essere visibili ad occhio nudo oppure visualizzate mediante l'utilizzo di una radiazione UV oppure tecniche di *staining*. Lo *staining*

² Il tempo di ritenzione è il tempo che intercorre tra l'iniezione di un composto all'interno della colonna cromatografica ed il momento in cui questo esce dalla colonna stessa. In particolari condizioni di analisi, esso è caratteristico di un determinato composto.

consiste nel far reagire i gruppi funzionali caratteristici degli analiti (es. doppio legame, gruppo aldeidico, ecc.) con l'agente di *staining* così da ottenere un derivato visibile ad occhio nudo.

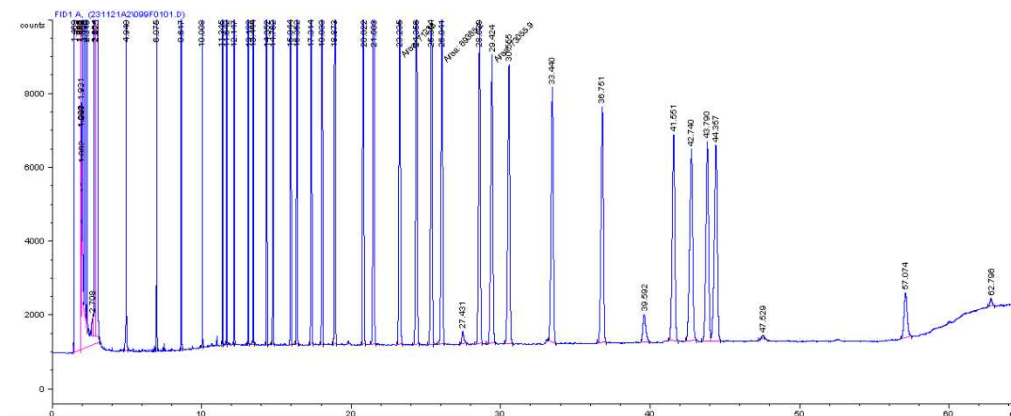


Figura 5 Esempio di cromatogramma.

1.2.2 Applicazioni della cromatografia

La cromatografia può essere utilizzata per una analisi qualitativa, cioè per identificare, sulla base del tempo di ritenzione, i composti presenti nel campione; oppure, mediante l'utilizzo di *standard* a concentrazione nota, è possibile eseguire una analisi quantitativa; infine, essendo in grado di separare i diversi analiti presenti in un campione, essa può essere utilizzata a fini preparativi per isolare un composto che deve essere ulteriormente analizzato. Un esempio di cromatografia preparativa è dato dall'accoppiamento di un cromatografo ad uno spettrometro di massa: in questo modo gli analiti raggiungono lo spettrometro in base al loro tempo di ritenzione e vengono analizzati singolarmente.

1.2.3 Gas cromatografia

La gas cromatografia (GC) è una particolare tecnica cromatografica in cui la fase mobile è gassosa; la fase stazionaria, invece, può essere solida (cromatografia gas-solido, GS) o liquida (cromatografia gas-liquida, GL).

I campioni analizzati vengono a loro volta volatilizzati e, all'interno della colonna, vengono trasportati dalla fase mobile gassosa (*gas carrier*). Il *gas*

carrier è un gas inerte, poco viscoso, puro e poco costoso come, ad esempio, azoto (N₂), idrogeno (H₂) o elio (He).

I meccanismi di separazione sfruttati nella GC sono principalmente adsorbimento nel caso di GS, e ripartizione nel caso di GL. L'adsorbimento prevede la formazione di legami deboli e reversibili, come interazioni di Van der Waals o legami idrogeno, tra le molecole di analita e la fase stazionaria; la ripartizione consiste invece nella distribuzione degli analiti tra la fase mobile gassosa e la fase stazionaria liquida, a sua volta definita dalla temperatura di ebollizione degli analiti stessi.

Al termine della corsa cromatografica gli analiti vengono rilevati dal *detector*; in gas cromatografia i più diffusi sono il *detector* a ionizzazione di fiamma (FID), il *detector* a cattura di elettroni (ECD) ed il *detector* a termocoducibilità (HWD).

Il FID è un rivelatore universale, cioè individua tutti i componenti di una miscela, ma distruttivo; gli analiti, infatti, vengono bruciati da una fiammella per ottenere ioni allo stato gassoso. La fiammella è circondata da un elettrodo cilindrico caricato positivamente mentre l'ugello da cui ha origine la fiammella è l'elettrodo negativo. In assenza di analita, la fiammella genera una debole corrente che viene raccolta e trasformata in tensione: questa rappresenta il rumore di fondo; quando un analita raggiunge la fiammella, viene bruciato e ionizzato; quindi, determina un aumento della corrente che viene registrato come segnale più intenso.

L'ECD è un *detector* selettivo, quindi è in grado di rilevare solo certi composti, e non distruttivo. È costituito da una sorgente radioattiva che emette elettroni primari; questi si vengono a trovare all'interno di un campo elettrico generato da un catodo, che è la sorgente stessa, e da un anodo. Quando gli elettroni primari colpiscono il gas *carrier* si formano ioni positivi ed elettroni secondari; queste cariche generano una corrente che rappresenta il rumore di fondo. Quando il *detector* viene raggiunto da un composto elettroaffine, questo cattura gli elettroni secondari con conseguente diminuzione del rumore di fondo.

L'HWD è un rivelatore universale non distruttivo che si basa su due sensori ciascuno dei quali contenente un filamento. La resistenza elettrica del filamento varia con la temperatura, la quale dipende dalla conducibilità termica del gas con cui il filamento è in contatto. Un sensore è in contatto solo con il gas *carrier*,

mentre l'altro si trova all'uscita della colonna: un sistema elettrico rileva la differenza dei due segnali.

1.3 La spettrometria di massa

La spettrometria di massa è una tecnica analitica che consente la separazione di specie ioniche a seconda del loro diverso rapporto massa su carica (m/z). A seguire, le molecole sono identificate e quantificate.

Uno spettrometro di massa può essere schematizzato nelle seguenti componenti (Figura 6): sorgente di ioni, analizzatore di massa e *detector*.

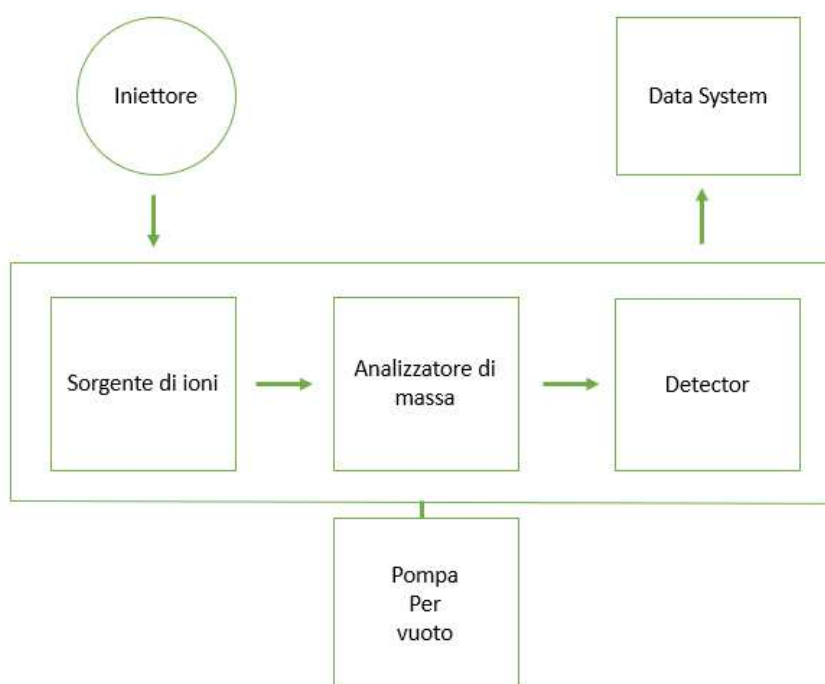


Figura 6 Schematizzazione di uno spettrometro di massa.

Questa tecnica si basa sulla ionizzazione delle molecole iniettate; esistono diverse tecniche di ionizzazione, le quali si differenziano per lo stato fisico del campione e per la quantità di energia utilizzata. Alcune vengono definite *hard* e sono quelle che operano ad elevata energia e che portano ad una frammentazione spinta del campione; altre, al contrario, vengono dette *soft* perché utilizzano un quantitativo energetico inferiore e frammentano meno il campione. Le principali modalità di ionizzazione sono la ionizzazione ad impatto elettronico, la ionizzazione chimica, la ionizzazione a bombardamento atomico, l'*electron spray* (ESI), e il *matrix-Assisted Laser Desorption Ionization* (MALDI).

L'analizzatore di massa è la parte dello strumento che separa tra di loro gli ioni aventi diverso rapporto m/z ; i più comuni sono l'analizzatore a tempo di volo, il

quadrupolo e il settore magnetico. Questi si differenziano tra di loro per il principio fisico che consente la separazione degli ioni.

Il *detector*, infine, rivela gli ioni che lo raggiungono, ed un *software* elabora il segnale fornendo uno spettro di massa (Figura 7) in cui sull'asse delle ascisse è rappresentato il valore m/z di ciascuna specie ionica mentre sull'asse delle ordinate è riportata l'abbondanza percentuale rispetto al picco base. Il picco base è quello dello ione più abbondante al quale viene assegnato un valore di abbondanza pari al 100%.

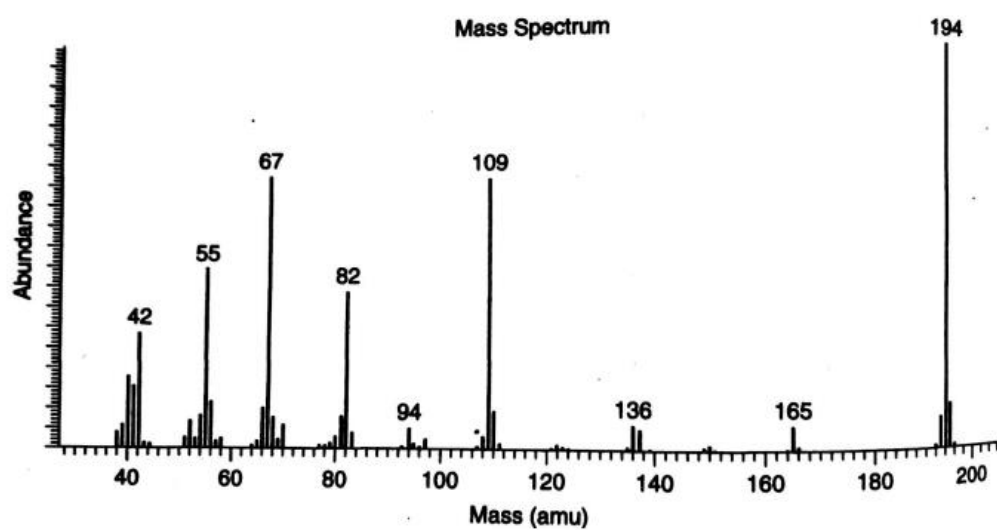


Figura 7 Esempio di uno di massa (modificata da Robert R. Wolfe, 2004).

Durante la fase di ionizzazione, è possibile che l'analita subisca anche un processo di frammentazione; anche tali frammenti sono a loro volta ionizzati ed analizzati con l'analizzatore sulla base del rapporto m/z . Le frammentazioni sono caratteristiche di una particolare molecola.

La quantificazione avviene invece mediante l'utilizzo di *standard* interni a concentrazione nota.

1.3.1 Tecniche di ionizzazione

Indipendentemente dal tipo di sorgente, il sistema di ionizzazione produce la forma ionica dell'analita, in genere la forma cationica, che prende il nome di ione molecolare. La specie ionica che si forma di solito in maggior quantità è quella

monocarica; tuttavia, è possibile anche la formazione di ioni multi-carica, anche se questi saranno presenti in quantità molto inferiore.

a) Ionizzazione ad impatto elettronico

La sorgente ad impatto elettronico è costituita da un filamento ad incandescenza sulla cui superficie si formano degli elettroni; questi vengono attratti da una placca di carica positiva in modo tale da generare un flusso che collide con le molecole presenti nel campione; tale collisione libera energia a causa la ionizzazione dell'analita, producendo un radicale cationico:



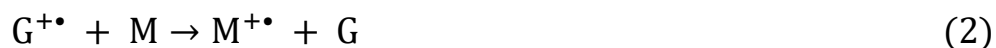
In questo tipo di sorgente, la camera di ionizzazione si trova sottovuoto, di conseguenza il campione è introdotto sotto forma di gas o vapore; questa è una limitazione poiché non tutte le sostanze passano facilmente allo stato gassoso. La ionizzazione ad impatto elettronico è pertanto limitata a molecole piccole con una elevata tensione di vapore.

Questo tipo di ionizzazione viene definito *hard* poiché coinvolge un elevato quantitativo di energia e per questo motivo è associato anche ad una frammentazione più estesa del campione.

b) Ionizzazione chimica

Nella ionizzazione chimica, all'interno di una camera ad alta pressione viene inserita una molecola gassosa (G), ad esempio metano, presente in concentrazione maggiore rispetto all'analita (M). G è trasformata in radicale cationico con un processo analogo a quello della ionizzazione elettronica, e a questo punto funge essa stessa da specie ionizzante. Infatti, poiché $[G] > [M]$, statisticamente è più probabile che gli elettroni colpiscano G piuttosto che M. Una volta formatosi, il radicale cationico di G può reagire con M trasferendo la ionizzazione all'analita. Affinché ciò avvenga, l'energia di ionizzazione di G

deve essere maggiore di quella di M, così che sia energeticamente più favorevole la formazione di radicali cationici della specie M piuttosto che di G.



Anche in questo caso è necessario che il campione venga trasformato in gas o in vapore. Diversamente dalla ionizzazione elettronica, però, l'energia implicata è inferiore e questo si traduce in una minor frammentazione del campione.

c) Ionizzazione a bombardamento atomico

Questa tecnica di ionizzazione risolve il problema legato alla vaporizzazione dei campioni in quanto è adatta anche a composti non volatili. Il campione viene disciolto o sospeso all'interno di una matrice polare e successivamente distribuito su una superficie. Ioni di un gas inerte, come ad esempio Argon (Ar) o Xenon (Xe), vengono accelerati verso la cosiddetta *charge exchange chamber* dove si forma una corrente di atomi dotata di una elevata energia cinetica. Questi atomi vengono indirizzati verso la camera di ionizzazione dove trovano il campione; la collisione degli atomi ad elevata velocità sulla superficie del campione determina la ionizzazione e lo *sputtering* del campione stesso (Pokrovskii & Mosln, 1987).

d) *Electron Spray Ionization*

L'*electron spray ionization* (ESI) è una tecnica di ionizzazione definita *soft* adatta a campioni in fase liquida (Figura 8).

La sorgente è costituita da un ago di acciaio all'interno del quale viene iniettata una soluzione di campione. La punta del capillare è sottoposta ad una tensione molto elevata, la quale genera un campo elettrico che disperde il campione in un aerosol di goccioline dotate di carica. Esternamente al capillare viene fatto fluire il gas di nebulizzazione, come ad esempio azoto. Man mano che il solvente evapora, il diametro delle goccioline diminuisce mentre aumenta la densità di carica; il gas di nebulizzazione aiuta sia il direccionamento dell'analita verso l'analizzatore di massa sia l'evaporazione del solvente. Quando il diametro delle goccioline raggiunge un valore soglia, si verifica la cosiddetta esplosione elettrostatica e l'analita carico viene rilasciato in fase aeriforme. Alcuni ioni di analita riescono a passare attraverso un capillare riscaldato ed a raggiungere l'analizzatore di massa, il quale è mantenuto sotto alto vuoto (Banerjee & Mazumdar, 2012).

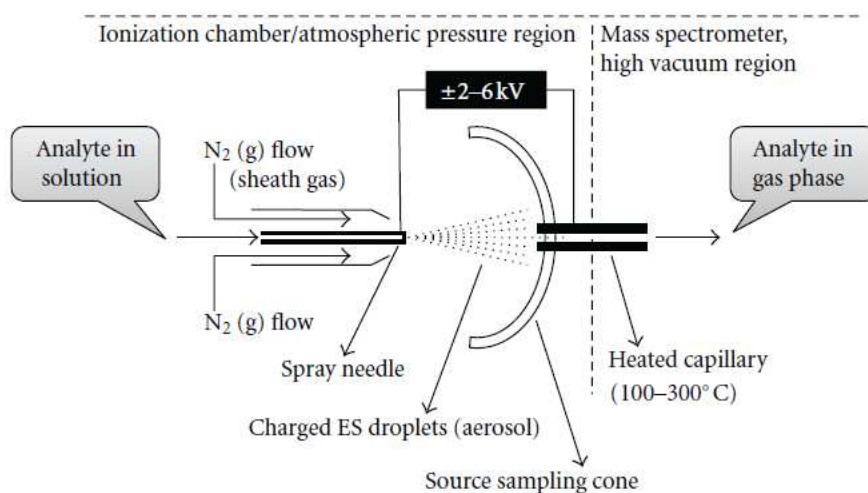


Figura 8 Rappresentazione schematica di una sorgente ESI (Banerjee & Mazumdar, 2012).

e) *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*

La sorgente utilizzata nella *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization* (MALDI) consiste in un supporto di acciaio sul quale viene depositato l'analita il quale, in questo caso, può essere in fase liquida. La fase liquida è miscelata ad una soluzione satura di matrice, che è un composto di natura acido-organica (Figura 9), solitamente un acido carbossilico aromatico o alfa-beta insaturo in grado di assorbire la radiazione UV.

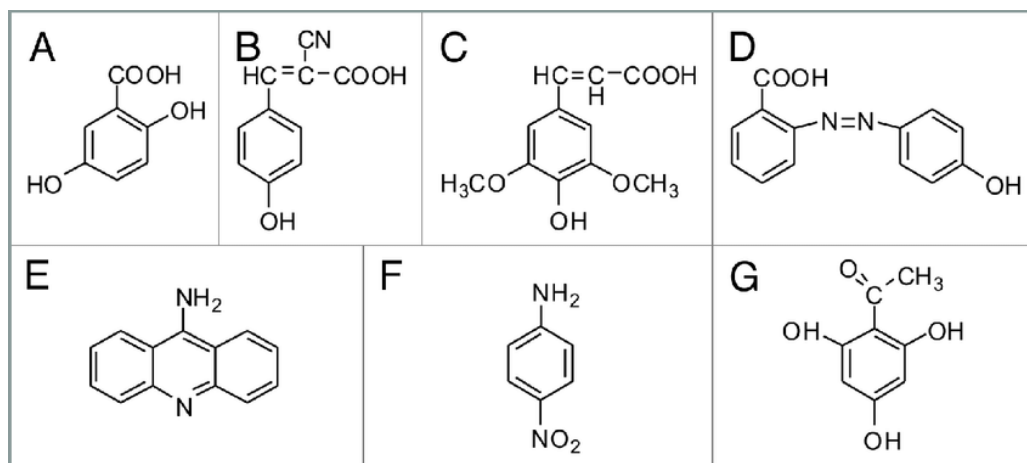


Figura 9 Struttura chimica delle matrici MALDI più frequentemente usate (Schiller & Huster, 2012).

La miscela tra la soluzione di analita e la soluzione di matrice viene caricata sul supporto di acciaio. L'acqua ed il solvente utilizzato per preparare la soluzione di matrice evaporano, mentre le molecole di matrice cristallizzano intrappolando anche le molecole di analita in forma non cristallina. A questo punto, sugli *spot* amorfi di analita viene fatta incidere una radiazione di lunghezza d'onda scelta sulla base delle proprietà spettroscopiche della matrice.

La radiazione che viene inviata proviene da una sorgente laser. La matrice assorbe la radiazione al punto che un elettrone passa dallo stato elettronico fondamentale ad uno stato elettronico eccitato.

Inoltre, la sorgente laser utilizzata non è una sorgente continua, ma pulsata; la matrice, quindi, riceve l'impulso e si eccita, e successivamente decade. Il decadimento è in questo caso non radiante, quindi avviene senza emissione di luce, bensì si verifica una dissipazione interna che si accompagna ad un aumento dell'energia cinetica della molecola di matrice. L'energia cinetica viene trasferita per prossimità fisica alle molecole di analita che sono presenti nella matrice stessa. Le molecole di analita in fase solida acquistano una quantità di energia cinetica compatibile con l'energia cinetica delle molecole di analita nella fase aeriforme, che è maggiore, e passano quindi effettivamente nella fase aeriforme. Inoltre, durante questo processo, le molecole di analita vengono ionizzate mediante protonazione da parte della matrice.

1.3.2 Analizzatori di massa

L'analizzatore di massa ha lo scopo di separare gli ioni con diverso rapporto m/z . I principi fisici utilizzati a tale scopo sono diversi a seconda dell'analizzatore utilizzato.

a) Analizzatore a tempo di volo

L'analizzatore a tempo di volo prevede di sottoporre gli ioni ad un campo elettrico facendo sì che questi assumano tutti la stessa energia cinetica K . L'energia cinetica è funzione della massa e della velocità dello ione (3), ma è anche uguale al prodotto tra la carica dello ione e la differenza di potenziale a cui viene sottoposto (4). La velocità può poi essere espressa come il rapporto tra la distanza che lo ione percorre ed il tempo (5).

Sostituendo l'equazione (5) nell'equazione (3) e uguagliando l'equazione (3) all'equazione (4), è possibile estrapolare il valore di m/z . Si può così osservare come al variare di m/z solo il valore del tempo cambi, poiché sia la distanza tra la sorgente ed il *detector* che la differenza di potenziale vengono mantenuti costanti.

Di conseguenza, ioni con m/z differente raggiungono il *detector* in momenti diversi; in particolare, ioni più leggeri sono rivelati prima.

$$K = \frac{1}{2}mv^2 \quad (3)$$

$$K = zV \quad (4)$$

$$v = \frac{s}{t} \quad (5)$$

$$2zV = m \frac{s^2}{t^2} \quad (6)$$

$$\frac{m}{z} = 2V \frac{t^2}{s^2} \quad (7)$$

b) Analizzatore a quadrupolo

L'analizzatore a quadrupolo consiste in quattro barre (elettrodi) la cui polarità è invertita a coppie alterne (Figura 10). Il fascio di ioni è indirizzato all'interno dello spazio delimitato dai quattro elettrodi e procede con una traiettoria a spirale il cui raggio dipende dal valore di m/z e dalla frequenza con cui viene invertita la polarità degli elettrodi.

Per una certa frequenza, solo gli ioni con un preciso m/z raggiungono il rivelatore, mentre gli altri sono esclusi.

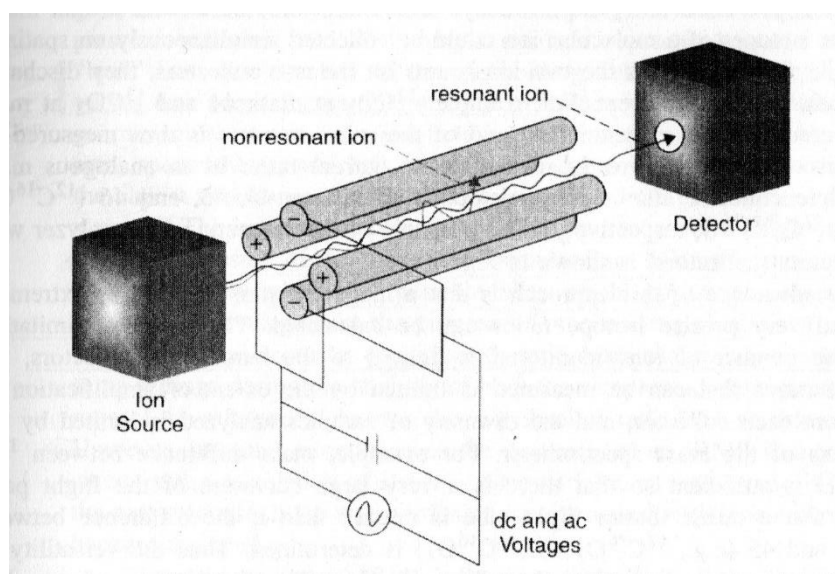


Figura 10 Rappresentazione schematica di un analizzatore di massa a quadrupolo (Robert R. Wolfe, 2004).

c) Analizzatore a settore magnetico

L'analizzatore a settore magnetico (Figura 11) consiste in un magnete da cui origina un campo magnetico di intensità nota. Quando gli ioni (prodotti dalla sorgente) entrano nell'analizzatore, la loro traiettoria viene deviata; il raggio di curvatura dipende dal campo magnetico e dalla velocità, massa e carica degli ioni. L'equazione (8) correla l'energia cinetica dello ione all'energia del campo di accelerazione. Da qui è possibile esplicitare v^2 (9). Il raggio di curvatura è descritto dall'equazione (10), da cui si può calcolare $\frac{m}{z}$. Infine, sostituendo in (10) l'equazione (9), si vede come, a parità di campo magnetico e differenza di potenziale, il raggio di curvatura dipenda solo dal valore di m/z (11).

Ioni con m/z diverso seguono quindi traiettorie differenti ed in questo modo vengono separati tra loro.

$$\frac{1}{2}mv^2 = zV \quad (8)$$

$$v^2 = \frac{2zV}{m} \quad (9)$$

$$r = \frac{mv}{zB} \quad (10)$$

$$\frac{m}{z} = \frac{r^2B^2}{2V} \quad (11)$$

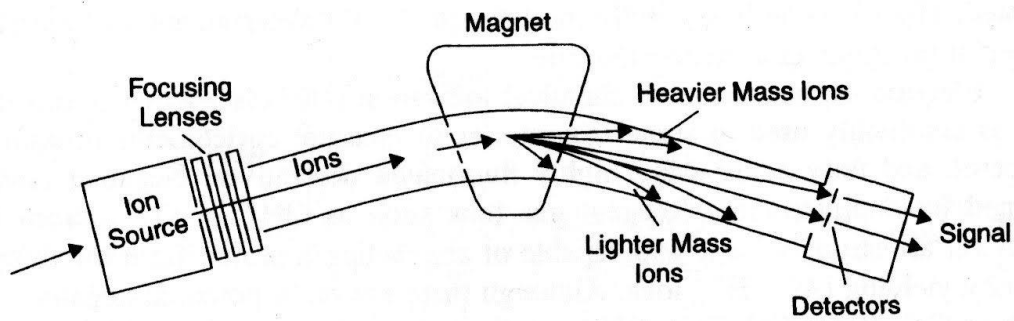


Figura 11 Rappresentazione schematica di un analizzatore di massa a settore magnetico (Robert R. Wolfe, 2004).

1.4 *Isotope Ratio Mass Spectrometry*

1.4.1 **Gli isotopi**

Gli isotopi sono atomi chimicamente identici che differiscono per il numero di neutroni presenti a livello del nucleo; essi hanno pertanto lo stesso numero atomico, che corrisponde al numero di elettroni o di protoni, ma presentano un diverso numero di massa che è dato invece dalla somma del numero di protoni e di neutroni.

Sulla base della stabilità nucleare, gli isotopi possono essere distinti in due classi: stabili ed instabili. Gli isotopi instabili si disintegrano in maniera spontanea a formare atomi di un altro elemento tramite il fenomeno del decadimento radioattivo; durante questo processo avviene l'emissione di una radiazione di tipo α , β o γ , e per questo gli isotopi instabili sono radioattivi e sono anche chiamati radioisotopi.

Un elemento in natura può essere presente sia sotto forma di isotopi stabili che di isotopi radioattivi; il carbonio, ad esempio, presenta due isotopi stabili (^{12}C e ^{13}C), ed uno instabile (^{14}C).

1.4.2 **Utilizzo degli isotopi come traccianti**

La massa di un atomo è data dal contributo di tutte le particelle subatomiche, ovvero elettroni, neutroni e protoni. Grazie al fatto che gli isotopi presentano tra di loro una massa diversa, essi sono analiticamente distinguibili; per questo motivo gli isotopi possono essere utilizzati come traccianti, possono cioè essere incorporati in una molecola di cui si vuole seguire il metabolismo all'interno di un sistema biologico.

L'avvento dell'uso degli isotopi stabili come traccianti risale agli anni '30: Harold Urey fu un chimico statunitense che per primo dimostrò l'esistenza del deuterio³ (Urey HC, 1932). Con l'aiuto di David Rittenberg e Rudolph Schoenheimer, Urey mise a punto un metodo per sostituire un atomo di idrogeno con uno di deuterio a livello di specifici gruppi funzionali (Schoenheimer, 1935a). Con questa tecnica, riuscirono ad ottenere un derivato deuterato dell'olio

³ Il deuterio è un isotopo stabile dell'idrogeno ed il suo nucleo è costituito da un protone ed un neutrone.

di semi di lino che utilizzarono come tracciante e che consentì loro di svolgere studi animali sul metabolismo lipidico (Schoenheimer, 1935b).

Dopo la Seconda guerra mondiale, l'utilizzo degli isotopi stabili come traccianti nello studio di processi biologici cadde in declino a favore dei radioisotopi. Questo fu principalmente dovuto al fatto che la guerra rese disponibili una grande quantità di isotopi radioattivi, come il ^{14}C (Ruben, 1941), che potevano essere misurati in modo più semplice e con una sensibilità maggiore rispetto agli isotopi stabili (Kamen, 1947). Oggigiorno, tuttavia, si sta invece tornando a preferire gli isotopi stabili, grazie allo sviluppo di nuove tecnologie e a causa delle preoccupazioni in merito alla sicurezza riguardante l'uso di radiazioni ionizzanti nell'uomo (Wilkinson, 2018).

1.4.3 Abbondanza isotopica naturale

In natura, la maggior parte degli elementi esiste come miscela di isotopi e ciascun isotopo presenta una diversa abbondanza naturale in base alla quale contribuisce a determinare la massa atomica convenzionalmente assegnata a quell'atomo.

Gli isotopi stabili più comunemente utilizzati come traccianti e la loro abbondanza naturale sono mostrati in Tabella 2 (Wilkinson, 2018).

Il comportamento chimico dei diversi isotopi stabili è tra di loro molto simile, e per atomi relativamente pesanti è praticamente identico; tuttavia, in natura sono noti alcuni processi che possono portare a cambiamenti dell'abbondanza isotopica. L'evaporazione e la condensazione dell'acqua, ad esempio, dipendono dalla massa. L'idrogeno possiede due isotopi stabili (^1H e ^2H) e l'ossigeno ne possiede tre (^{16}O , ^{17}O e ^{18}O); dalla loro combinazione derivano nove possibili isotopologi, ovvero molecole composte da isotopi diversi. Di questi, gli isotopologi in forma liquida costituiti da idrogeno e ossigeno pesanti sono caratterizzati da una energia di legame maggiore e da una diffusività minore, pertanto evaporano più lentamente rispetto alle forme più leggere. Questo porta ad un arricchimento dell'acqua liquida in isotopi pesanti e, al contrario, ad un arricchimento del vapore acqueo in isotopi leggeri (Galewsky et al., 2016).

Un altro esempio è riscontrabile nel mondo vegetale dove, tra le piante maggiori, è possibile distinguere quelle con un basso contenuto di ^{13}C da quelle con un alto contenuto di ^{13}C (Smith & Epstein, 1971): durante la fotosintesi, le piante convertono la CO_2 presente nell'atmosfera o nell'ambiente acquatico in

carboidrati. Durante questo processo avviene un fenomeno di frazionamento dei due isotopi stabili del carbonio. Ciò significa che le sostanze organiche derivanti dalla fotosintesi sono impoverite in ^{13}C rispetto alla CO_2 di partenza. Tuttavia, è stato osservato che, a seconda del *pathway* fotosintetico che la pianta sfrutta, l'arricchimento isotopico è differente: le piante che durante la fissazione dell'anidride carbonica utilizzano il *pathway* C4 (*pathway* dell'acido dicarbossilico) presentano un quantitativo di ^{13}C maggiore rispetto alle piante che seguono il ciclo di Calvin (Bender, 1971).

Tabella 2 Isotopi stabili più comunemente utilizzati come traccianti e relativa abbondanza naturale (Wilkinson, 2018).

Element	Stable Isotopes	% Natural Abundance
Hydrogen	^1H	99.985
	^2H	0.015
Carbon	^{12}C	98.89
	^{13}C	1.11
Nitrogen	^{14}N	99.63
	^{15}N	0.37
Oxygen	^{16}O	99.76
	^{17}O	0.037
	^{18}O	0.204
Sulfur	^{32}S	95.00
	^{33}S	0.76
	^{34}S	4.22
Silicon	^{28}Si	92.21
	^{29}Si	4.9
	^{30}Si	3.09
Iron	^{54}Fe	5.82
	^{56}Fe	91.66
	^{57}Fe	2.19
	^{58}Fe	0.33
Zinc	^{64}Zn	48.89
	^{66}Zn	27.81
	^{67}Zn	4.11
	^{68}Zn	18.57
	^{70}Zn	0.62
Selenium	^{74}Se	0.87
	^{76}Se	9.02
	^{77}Se	7.58
	^{78}Se	23.52
	^{80}Se	49.82

1.4.4 *Isotope Ratio Mass Spectrometry*

La *Isotope Ratio Mass Spectrometry* (IRMS) è una tecnica di spettrometria di massa in grado di determinare l'abbondanza isotopica relativa di un determinato elemento come ad esempio C, O o H. La IRMS trova applicazione in diversi ambiti, tra cui le scienze forensi, l'industria alimentare (es. identificazione di adulterazioni), le scienze biologiche (es. studi metabolici), e così via. La IRMS è nota fin dal secondo dopoguerra, dato che le conoscenze in merito alle variazioni naturali di abbondanza isotopica risalgono addirittura agli anni '30 (Bender, 1971). Il padre della IRMS fu Alfred Nier, il quale costruì il suo primo spettrometro nel 1936; da allora, la tecnica è stata migliorata ma sono rimasti costanti il tipo di analizzatore di massa, ovvero il settore magnetico, e la presenza di più *detector* (Flenker, 2012).

La principale implementazione è stata l'introduzione di una interfaccia a flusso continuo, la quale consente, tramite un gas *carrier*, l'introduzione continua di campione all'interno della sorgente di ioni. Questo ha permesso di accoppiare a monte lo spettrometro di massa ad altri sistemi analitici, come ad esempio gas cromatografi. Nello stesso periodo, per l'analisi di composti contenenti ^{13}C è stato introdotto un sistema di combustione *on-line* grazie al quale i componenti organici analizzati vengono ossidati tutti a CO_2 . In questo modo il segnale viene normalizzato e non è necessario deconvolvere gli spettri (Flenker, 2012).

Infine, nel 1996 è stato descritto per la prima volta il *backflush*: un problema della combustione *on-line* era la presenza di una grande quantità di solvente che raggiungeva la sorgente. Il *backflush* è un sistema di collegamento temporizzato tra fornello di combustione e spettrometro di massa grazie al quale tutto ciò che non si vuole analizzare (es. solvente o composti con uno specifico tempo di ritenzione) viene scartato e non raggiunge la sorgente (Flenker, 2012).

Per l'analisi del carbonio, la peculiarità di questo strumento è infine la presenza di tre diversi *detector*, i quali prendono il nome di *Faraday cups* e sono adibiti rispettivamente alla rivelazione della CO_2 avente m/z pari a 44, 45 o 46. Ciascun *detector* è collegato ad un proprio sistema di amplificazione del segnale ed il segnale viene amplificato in maniera differente in base alla quantità di ioni che vengono rilevati: il segnale relativo alla massa 45, che è solitamente la meno abbondante, viene amplificato di più rispetto al segnale della massa 44 così da

ottenere due valori di intensità confrontabile. Questo permette di apprezzare anche piccole differenze in abbondanza isotopica

2

OBIETTIVI DELLA TESI

Gli obiettivi principali di questo progetto di tesi sono i seguenti:

1. Valutare come varia nel tempo la quantità di DHA presente a livello dei fosfolipidi plasmatici in pazienti adulti, sani e a dieta onnivora che assumono per tre mesi quotidianamente 250 mg di DHA sotto forma di integratore alimentare. Si valuterà anche tale variazione quantitativa durante tre mesi di *washout* in cui i pazienti non assumeranno più il supplemento.
2. Determinare il *turnover* del DHA utilizzando il supplemento come tracciante isotopico. Nello specifico, si valuterà ai vari *time point* l'abbondanza isotopica relativa, espressa come $\delta(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})$, del DHA presente nei fosfolipidi plasmatici. Si valuterà anche la cinetica di eliminazione del DHA durante tre mesi di *washout* in cui i pazienti non assumeranno più il supplemento.

3

STRUMENTAZIONE

3.1 *Gas-chromatography-Flame Ionization Detector*

La quantificazione dei fosfolipidi, dei trigliceridi e degli acidi grassi liberi con relativa composizione in acidi grassi è stata eseguita mediante un gas cromatografo (Agilent 5890 GC) accoppiato ad un rivelatore a ionizzazione di fiamma.

3.1.1 *Iniettore on-column*

I campioni sono stati iniettati in colonna in modalità *on-column*: questo consente di iniettare il campione in forma liquida. Al momento dell'iniezione, l'iniettore ed il forno si trovano ad una temperatura inferiore rispetto a quella di vaporizzazione del solvente in cui è ripreso il campione, consentendo che questo non vaporizzi subito. In questo modo viene ridotto il rischio di alterazione del campione stesso.

3.1.2 *Colonna Omegawax™*

Il Gas cromatografo è allestito con una colonna capillare Omegawax™ (Supelco) di silice fusa con una fase stazionaria di polietilenglicole.

La colonna è lunga 30 m ed ha un diametro interno di 0.25 mm; lo spessore del film di fase stazionaria è di 0.25 µm. Questa è stata scelta poiché garantisce analisi altamente riproducibili di esteri metilici di acidi grassi, soprattutto di acidi grassi omega-3 ed omega-6.

3.2 Gas-chromatography-Combustion-Isotope Ratio Mass Spectrometry

Per l'analisi dell'arricchimento isotopico è stato utilizzato un gas cromatografo accoppiato, mediante un'interfaccia a combustione, ad un *isotope ratio mass spectrometer* (Delta V, Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA).

3.2.1 Colonna DB-225

Il gas cromatografo è stato allestito con una colonna DB-225 (Agilent Technologies) la quale è caratterizzata da una fase stazionaria polisilossanica; nello specifico la fase stazionaria è una (50%-cianopropilfenil) - dimetilpolisilossanica il cui spessore è di 0.25 μm .

La colonna è lunga 30 m ed ha un diametro interno di 0.25 mm. È stata scelta questa colonna perché particolarmente adatta alla separazione di acidi grassi metilati ed in particolare di quelli a lunga catena, quale il DHA.

3.2.2 DELTA V™ Isotope Ratio Mass Spectrometer

Il DELTA V™ è uno spettrometro di massa usato per le analisi di abbondanza isotopica relativa; esso è rappresentato schematicamente in Figura 12.

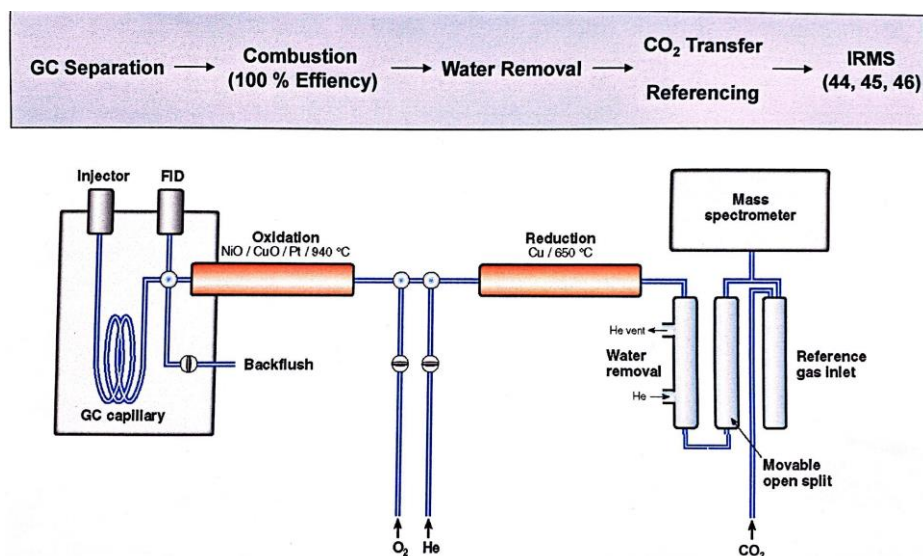


Figura 12 Rappresentazione schematica del GC-C-IRMS DELTA V™.

Tramite l'autocampionatore, il campione viene iniettato nel gas cromatografo ed una volta entrato in colonna viene vaporizzato. In questo modo, in base alla loro diversa volatilità, le molecole presenti nel campione (acidi grassi metilati, in questo caso di studio) vengono separate. L'iniettore utilizzato è di tipo *on-column*.

Il gas cromatografo è seguito da un fornello di combustione (o ceramico) che si trova ad alta temperatura; il fornello ossida gli acidi grassi metilati portando alla produzione di CO₂ ed H₂O. L'ossidazione del campione avviene grazie alla previa ossidazione del ceramico stesso.

Un sistema temporizzato collega l'uscita della colonna al ceramico: si tratta del *backflush* il quale, quando è chiuso, fa sì che le molecole uscenti dalla colonna raggiungano il ceramico mentre quando è aperto fa in modo che queste vengano scartate. L'apertura e la chiusura del *backflush* sono governate da un sistema ad aria compressa.

Successivamente vi è un'interfaccia adibita alla rimozione dell'acqua prodotta durante l'ossidazione, inoltre, il flusso di gas che entra nella sorgente viene ridotto rispetto a quello che esce dal gas cromatografo: il flusso uscente è di 1 mL/min e viene ridotto di 5 volte.

Le molecole di CO₂ raggiungono poi la sorgente di ionizzazione ad impatto elettronico; gli ioni così prodotti vengono separati in base al loro rapporto *m/z* mediante un analizzatore di massa a settore magnetico.

Grazie al diverso raggio di curvatura che ciascuno ione acquisisce in virtù del suo rapporto *m/z*, gli ioni vengono raccolti da tre rivelatori differenti, che sono delle *Faraday cups*. I rivelatori quantificano gli ioni aventi rispettivamente *m/z* pari a 44 (¹²C¹⁶O₂), 45 (¹²C¹³CO₂) e 46 (¹²C¹⁸O¹⁶O) (Figura 13).

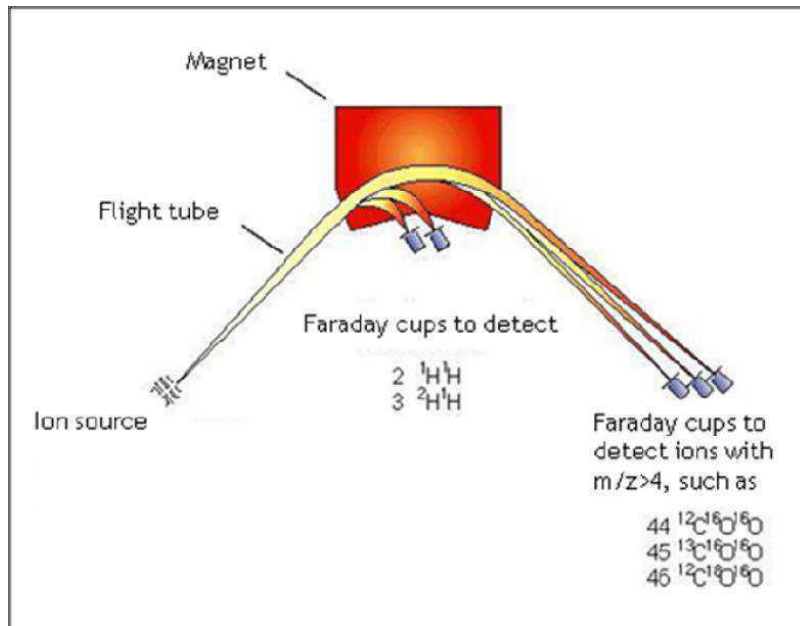


Figura 13 Rappresentazione schematica di un analizzatore a settore magnetico in IRMS e delle Faraday cups (detector).

Infine, il segnale di ciascun rivelatore viene amplificato in maniera differente in base alla quantità di ioni: il segnale della *cup* per gli ioni con m/z pari a 45 viene amplificato di più rispetto a quello della *cup* per gli ioni con m/z 44 poiché normalmente l'abbondanza relativa di $^{12}\text{C}^{13}\text{CO}_2$ è inferiore rispetto a quella di $^{12}\text{CO}_2$. Questa diversa amplificazione ha lo scopo di ottenere dei segnali di intensità paragonabile che consentano di apprezzare anche il segnale relativo alla massa 45, altrimenti troppo basso.

Al termine dell'analisi lo strumento fornisce il cromatogramma (Figura 14) del campione e le seguenti altre informazioni:

- Tempo di ritenzione
- Intensità dei segnali, espresse in millivolt (mV), relative alle masse 44, 45 e 46
- Area totale sottesa dal picco cromatografico
- L'abbondanza isotopica relativa.

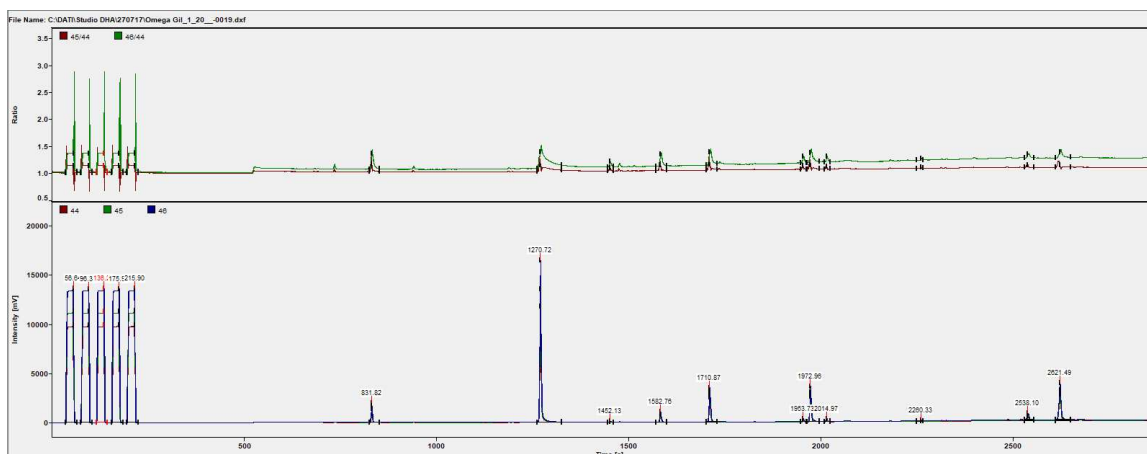


Figura 14 Esempio di cromatogramma acquisito al GC-IRMS.

L'abbondanza isotopica relativa viene espressa come $\delta^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ [per mil] vs VPDB e viene calcolata mediante l'equazione:

$$\delta\left(\frac{^{13}\text{C}}{^{12}\text{C}}\right) = \left(\frac{R_C}{R_S} - 1\right) \times 1000$$

R rappresenta il rapporto tra la quantità dell'isotopo più pesante e l'isotopo più leggero nel campione (al numeratore) o nello standard.

Il valore ottenuto viene solitamente moltiplicato per un fattore mille in modo da poter rendere apprezzabili anche piccole differenze di δ .

3.2.3 Calibrazione dello strumento

Lo standard verso cui l'IRMS viene calibrato prima di eseguire le analisi è il *Vienna – Pee Dee Belemnite*, un materiale avente la stessa composizione isotopica del *Pee Dee Belemnite* (PDB). Il PDB è un fossile marino risalente al Cretaceo; la CO_2 che deriva dal PDB dopo trattamento con acido fosforico rappresenta lo “zero” per le misure di abbondanza isotopica relativa per l'ossigeno ed il carbonio.

La calibrazione non viene fatta utilizzando direttamente il PDB ma grazie ad un materiale secondario che nel nostro caso è la soluzione di Schimmelmann (F8-2, Arndt Schimmelmann). La soluzione di Schimmelmann è una miscela di acidi grassi C14, C16, C18 e C20 in forma sia metilata che etilata.

La ditta dichiara il valore di $\delta^{13\text{C}/^{12}\text{C}}$ (vs PDB) del C18 metilato; quindi, la soluzione viene analizzata ed usata come calibrante. Impostando al picco del C18 metilato il valore di $\delta^{13\text{C}/^{12}\text{C}}$ (vs PDB) dichiarato dalla ditta, lo strumento è in grado di calcolare il $\delta^{13\text{C}/^{12}\text{C}}$ (vs PDB) degli altri picchi presenti nel cromatogramma. La calibrazione prevede di determinare l'abbondanza isotopica relativa, verso Schimmelmann, di CO₂ che verrà utilizzata come standard. La CO₂ calibrata verso Schimmelmann prende il nome di *in-house standard*.

3.2.4 Software Isodat 3.0

Isodat 3.0 è un *software* sviluppato dalla Thermo Fischer Scientific che consta di una componente *Workspace* e di una *Aquisition*. Tramite l'*Aquisition* è possibile fornire i comandi allo strumento. Tramite il *Workspace* è possibile analizzare i dati ottenuti.

In base alla tipologia di campione che viene analizzato, dall'*Aquisition* vengono selezionati il metodo per la gas cromatografia e quello per la spettrometria di massa.

Dal *Workspace* si visualizzano poi i cromatogrammi e, per ciascun picco cromatografico, si può ottenere il valore di $\delta^{13\text{C}/^{12}\text{C}}$ che lo strumento calcola sulla base della calibrazione precedentemente eseguita.

MATERIALI E METODI

4.1 Descrizione della popolazione

L'Ospedale di Padova ha reclutato sette pazienti adulti, sani e a dieta onnivora. Questi hanno partecipato allo studio in maniera volontaria e lo studio è stato condotto seguendo le linee guida fornite dalla Dichiarazione di Helsinki. Tutte le procedure sono state approvate dal comitato etico locale e tutti i partecipanti hanno firmato un consenso informato.

Lo studio si prefigge di valutare il *turnover* del DHA nei fosfolipidi plasmatici: i pazienti hanno assunto quotidianamente per tre mesi un integratore contenente 250 mg di DHA proveniente da alghe (*OmegaGil*, Ganassini Corporate).

Ai pazienti è stato fatto un prelievo ematico prima di iniziare l'integrazione, otto prelievi durante i tre mesi di integrazione e cinque prelievi nei tre mesi di *washout*.

Le date dei prelievi sono state concordate come indicato in Tabella 3.

I partecipanti allo studio si sono impegnati per sottoporsi al maggior numero possibile di prelievi previsti e per rispettare la calendarizzazione.

Tabella 3 Descrizione delle tempistiche dei prelievi ematici: 9 prelievi durante la supplementazione (periodi di *washin*) e 6 prelievi dopo la sua interruzione (periodo di *washout*).

NUMERO PRELIEVO	TEMPO DALL'INIZIO DELLA SUPPLEMENTAZIONE
1° prelievo	T0 – Basale
2° prelievo	T4
3° prelievo	T7
4° prelievo	T14
5° prelievo	T28
6° prelievo	T42
7° prelievo	T56
8° prelievo	T70
9° prelievo	T88

10° prelievo	T4 WA
11° prelievo	T10 WA
12° prelievo	T16 WA
13° prelievo	T31 WA
14° prelievo	T44 WA
15° prelievo	T94 WA

4.2 Raccolta dei campioni plasmatici

Il campione ematico è stato prelevato e raccolto in tubi di EDTA; quindi, è stato centrifugato e sono stati recuperati plasma e globuli rossi. Questi sono stati suddivisi in aliquote, le quali sono state addizionate con pirogallolo come antiossidante e conservate a -80°C.

4.3 Preparazione dei campioni

I lipidi plasmatici sono stati estratti da 200 μ L di campione utilizzando il metodo di Folch (FOLCH et al., 1957). Le classi lipidiche (fosfolipi, PL; colesterolo libero, CO; acidi grassi liberi, FFA; trigliceridi, TG; esteri del colesterolo, CE) sono poi state separate mediante TLC e visualizzate mediante lampada UV in seguito a colorazione della lastra con fluoresceina. Le diverse classi lipidiche sono state derivatizzate sfruttando una soluzione di HCl-metanolico, ed infine gli acidi grassi liberi metilati sono stati estratti con esano.

L'olio contenuto in una capsula di integratore alimentare è stato invece processato mediante metilazione diretta (solo trattamento con HCl-metanolico) previa diluizione in solvente organico.

4.4 Analisi qualitativa e quantitativa

L'analisi quali- e quantitativa di PL e TG dei campioni plasmatici e dei lipidi totali dell'integratore alimentare è stata eseguita mediante analisi al gas cromatografo (Agilent 5890 GC) sfruttando un rivelatore a ionizzazione di fiamma (FID). È stata utilizzata una colonna Omegawax™ di silice fusa (30 m × 0.25 mm diametro interno × 0.25 µm spessore del film; Supelco) ed He come gas *carrier*.

1 µL di campione è stato iniettato in modalità *on-column* e di ciascun campione è stata fatta una singola iniezione. Alla temperatura del forno è stato impostato il gradiente descritto da Simonato et al. (Simonato et al., 2022). Gli acidi grassi metilati sono stati identificati grazie ad una precedente iniezione di una miscela a composizione nota di acidi grassi metilati (GLC 461, Nu-Chek Prep). La quantificazione è stata fatta grazie all'utilizzo di standard interni (L- α -fosfatidilcolinedinonanoil C9:0; L- α -fosfatidilcolinedipentadecanoil, C15:0 per i PL. Acido trinonanoico C9:0; Acido tripentadecanoico C15:0 per i TG) a concentrazione nota. La composizione lipidica è stata espressa come percentuale di ciascun acido grasso rispetto ai PL o ai TG plasmatici totali.

4.5 Determinazione dell'arricchimento isotopico

L'arricchimento isotopico del DHA presente nei PL plasmatici e nei lipidi totali dell'integratore alimentare è stato determinato mediante GC-C-IRMS (Delta V, Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA). È stata utilizzata una colonna DB225 di silice fusa (30 m × 0.25 mm diametro interno × 0.25 µm spessore del film; Agilent Technologies) ed He come gas *carrier*. 1 µL di campione è stato iniettato in modalità *on-column* e ciascun campione è stato analizzato in triplicato. Gli acidi grassi metilati sono stati identificati grazie alla precedente iniezione di una miscela a composizione nota di acidi grassi metilati (GLC 461, Nu-Chek Prep). Il gas *reference* utilizzato per la determinazione dell'abbondanza isotopica è CO₂; prima delle analisi lo strumento è stato calibrato con una miscela standard di acidi grassi metilati (F8-2, Arndt Schimmelmann). Alla temperatura del forno è stato impostato il gradiente descritto da Simonato et al. (Simonato et al., 2022). L'abbondanza isotopica relativa tra ¹³C/¹²C è stata espressa come δ¹³C/¹²C (vs PDB) ed il valore di δ¹³C/¹²C (vs PDB) è riportato in milli-Urey (mUr), dove ogni 1 mUr rappresenta una variazione di una parte per mille del rapporto ¹³C/¹²C rispetto al *reference standard* internazionale (Vienna Pee Dee Belemnite, V-PDB). La percentuale di DHA proveniente dall'integratore presente nei fosfolipidi plasmatici è stata calcolata al penultimo ed all'ultimo *time point* del *washin* di ciascun paziente mediante la seguente equazione.

$$DHA (\%) = \frac{(A - B)}{(C - B)} \times 100$$

dove:

- A è il δ¹³C/¹²C (vs PDB) del DHA dei fosfolipidi plasmatici al tempo T in analisi.
- B è il δ¹³C/¹²C (vs PDB) al T0.
- C è il δ¹³C/¹²C (vs PDB) del DHA presente nell'integratore.

4.6 Calcolo della cinetica di eliminazione

La cinetica di eliminazione del DHA dal *pool* dei fosfolipidi plasmatici è stata calcolata correlando ciascun valore di $\delta^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ (vs PDB) al tempo corrispondente, espresso in settimane. Mediante una regressione esponenziale eseguita con il *software* GraphPad Prism 8.0.1 è stata ottenuta l'equazione che descrive tale cinetica e dalla quale è stata calcolata l'emivita del DHA nei PL plasmatici.

4.7 Analisi statistica

I valori di $\delta^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ riportati sono stati calcolati come media e deviazione standard dei tre valori ottenuti per ciascun campione. L'analisi statistica è stata condotta mediante test non parametrici utilizzando il *software* GraphPad Prism 8.0.1.

4.8 Solventi, composti e lipidi utilizzati

Il processamento dei campioni ha richiesto l'utilizzo di diversi solventi e composti. Le sostanze utilizzante e la ditta produttrice sono indicate in tabella 4.

Tabella 4 Elenco dei solventi e dei composti utilizzati per il processamento dei campioni plasmatici e relativa ditta produttrice.

COMPOSTI E SOLVENTI	PRODUTTORE
Butilidrossitoluente	Sigma
Fluoresceina	Fluka
Potassio carbonato	Merck
Sodio cloruro	Carlo Erba
Acido acetico glaciale	Carlo Erba
Acido cloridrico metanolico	Merck Life Science SRL
Cloroformio	Carlo Erba
Diisopropiletere	Sigma Aldrich
Eptano	Supelco
Esano	Carlo Erba
Etanolo	Carlo Erba
Metanolo	Carlo Erba

Le miscele lipidiche e gli standard interni utilizzati per l'identificazione e la quantificazione degli acidi grassi e per la calibrazione del GC-C-IRMS, e la relativa ditta produttrice, sono indicati in tabella 5.

Tabella 5 Miscele lipidiche e standard interni utilizzati e relativa ditta produttrice.

MISCELE LIPIDICHE E STANDARD INTERNI	PRODUTTORE
Acido trinonanoico (C9:0)	Sigma Aldrich
Acido tripentadecanoico (C15:0)	Sigma Aldrich
GLC	Nu-Chek Prep
L- α -fosfatidilcolinedipentadecanoil (C15:0)	Sigma chemical co.
L- α -fosfatidilcolinedinonanoil (C9:0)	Sigma chemical co.
Schimmelman	Arndt Schimmelman

5

RISULTATI

5.1 Descrizione dei pazienti

Per questo lavoro di tesi sono stati reclutati sette pazienti di cui due maschi e cinque femmine. Le loro caratteristiche cliniche al momento del reclutamento sono riassunte in Tabella 6; l'età media era di 36 ± 9 anni, il peso medio era di 66 ± 12 kg, e l'altezza media era di 1.70 ± 0.08 m.

Tabella 6 Descrizione delle persone che hanno partecipato allo studio.

Paziente	Sesso	Età (anni)	Peso (kg)	Altezza (m)
1	M	32	81	1.78
2	M	54	79	1.80
3	F	37	53	1.65
4	F	29	51	1.65
5	F	38	69	1.64
6	F	31	63	1.63
7	F	32	66	1.78

5.2 Adesione al protocollo dello studio

Tutti i partecipanti hanno affermato di aver assunto tutte le capsule previste per l'intera durata dello studio (1 capsula, corrispondente a 250 mg/die di DHA, per 88 giorni). Essi si sono inoltre impegnati a sottoporsi al maggior numero possibile di prelievi rispettando inoltre la calendarizzazione dei prelievi stessi; la calendarizzazione è descritta nelle Tabelle 7a e 7b.

Tabella 7a Calendarizzazione dei prelievi durante il periodo di *washin* (N.E. prelievo non effettuato).

		Numero del prelievo								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
sigla time point		Basale	T4	T7	T14	T28	T42	T56	T70	T88
Paziente	Settimane trascorse dall'inizio della supplementazione									
1	0.0	0.6	1.3	2.0	4.0	6.0	8.0	10.0	12.6	
2	0.0	0.6	1.0	2.0	4.0	6.0	8.0	10.0	12.6	
3	0.0	0.6	1.0	2.0	4.0	6.0	8.0	10.0	12.6	
4	0.0	0.6	1.0	2.0	4.0	6.0	8.0	10.0	12.6	
5	0.0	0.6	1.0	2.0	4.0	6.0	8.0	10.0	12.1	
6	0.0	0.4	1.1	2.0	4.0	6.0	8.1	N.E.	12.6	
7	0.0	0.6	1.0	2.0	4.0	6.0	8.0	10.0	12.6	

Tabella 7b Calendarizzazione dei prelievi durante il periodo di *washout* (N.E. prelievo non effettuato).

		Numero del prelievo					
		10	11	12	13	14	15
sigla time point		T5WA	T10WA	T16WA	T31WA	T44WA	T94WA
Paziente	Settimane trascorse dall'inizio della supplementazione						
1	13.3	14.0	14.9	17.0	18.9	26.0	
2	13.3	14.0	14.9	17.0	18.9	N.E.	
3	13.3	14.0	14.9	17.0	18.9	26.0	
4	13.3	14.0	14.9	17.0	18.9	26.0	
5	N.E.	13.4	14.4	16.6	18.4	25.3	
6	13.3	14.3	14.9	N.E.	18.9	N.E.	
7	13.3	14.0	14.9	17.0	18.9	26.0	

5.3 Caratterizzazione del supplemento

5.3.1 Composizione

Dall'analisi dei lipidi totali presenti nel supplemento è emersa la composizione riportata in Tabella 8); gli acidi grassi più abbondanti sono l'acido palmitico (C16:0, 25.13%), l'acido oleico (C18:1-9, 24.73%) ed il DHA, che è il più abbondante (C22:6-3, 35.6%).

Tabella 8 Composizione lipidica del supplemento OmegaGil: acidi grassi presenti e loro abbondanza espressa come percentuale di ciascun acido grasso rispetto agli acidi grassi totali.

Acido grasso	FAMOL%
C6	1.60
C10	0.60
C14	0.96
C16	25.13
C16:1n-7	0.42
C17	0.42
C18	2.34
C18:1n-9	24.73
C18:1n-7	0.53
C18:2n-6	3.54
C22:6n-3	35.60

5.3.2 Caratterizzazione isotopica

Dall'analisi isotopica dei lipidi totali presenti nel supplemento sono risultati i valori di abbondanza isotopica relativa riassunti in Tabella 9. Il DHA risulta avere un $\delta^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ (vs PDB) di -13.4 ± 0.0 .

Tabella 9 Composizione isotopica del supplemento OmegaGil.

Acido grasso	$\delta^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ (vs PDB)	Dev.St
C14:0	-6.0	0.8
C16:0	-5.5	0.2
C18:0	-14.3	0.5
C18:1n-9	-27.0	0.5
C18:2n-6	-26.2	0.7
C20:3n-6	-13.0	0.0
C22:0	-27.0	0.0
C22:6n-3	-13.4	0.0

5.4 **Analisi quantitativa dei lipidi plasmatici**

5.4.1 **Fosfolipidi**

La composizione dei fosfolipidi plasmatici a ciascun *time point* è riassunta nelle Tabelle 10 (da *a* a *e*); i valori sono espressi come media e deviazione standard della quantità percentuale di ciascun acido grasso rispetto alla quantità di acidi grassi totale. La quantità minima media di DHA è pari a 2.48% e corrisponde al valore basale, mentre quella massima è di 4.55% e corrisponde a T5WA.

Tabella 10a Composizione media dei fosfolipidi plasmatici nei primi cinque time point (dal basale al T7). In grassetto sono riportati i dati riguardanti il DHA.

	Basale		T4		T7	
	<i>Media</i>	<i>Dev.st</i>	<i>Media</i>	<i>Dev.st</i>	<i>Media</i>	<i>Dev.st</i>
C6	2.3	1.1	0.74	0.57	0.25	0.040
C8	0.010	0.020	0.00	0.00	0.00	0.00
C10	0.010	0.030	0.00	0.00	0.00	0.00
C12	0.24	0.13	0.190	0.080	0.110	0.030
C14	0.69	0.18	0.78	0.21	0.54	0.11
C1415	0.00	0.00	0.00	0.00	0.010	0.010
C16	34.2	1.5	30.4	1.1	32.4	1.1
C1619	0.30	0.17	0.250	0.080	0.200	0.040
C1617	0.46	0.18	0.59	0.24	0.57	0.22
C17	0.500	0.020	0.390	0.030	0.37	0.12
C171	0.030	0.050	0.120	0.080	0.090	0.030
C18	14.40	0.75	10.7	1.1	12.73	0.84
C1819	8.9	1.3	8.82	0.86	9.9	1.6
C1817	1.48	0.22	1.24	0.15	1.37	0.16
C1826	17.4	1.8	22.3	2.3	21.9	3.1
C1836	0.00	0.00	0.200	0.040	0.170	0.090
C1833	0.100	0.070	0.400	0.12	0.150	0.040
C20	0.570	0.080	0.400	0.060	0.360	0.020
C2019	0.120	0.020	0.100	0.040	0.120	0.020
C2026	0.210	0.030	0.200	0.030	0.230	0.040
C2036	2.35	0.24	2.30	0.55	2.37	0.42
C2046	7.3	1.4	9.1	1.6	8.3	1.7
C2033	0.020	0.040	0.60	0.39	0.00	0.00
C2053	0.63	0.29	0.90	0.88	0.69	0.19
C22	1.52	0.18	1.70	0.36	0.98	0.15
C2219	0.010	0.020	0.040	0.040	0.00	0.00
C2226	0.00	0.00	0.020	0.020	0.00	0.00
C2246	0.190	0.070	0.80	0.33	0.210	0.060
C2253	0.45	0.13	0.50	0.13	0.500	0.090
C2263	2.48	0.49	3.93	0.63	3.32	0.54
C24	1.40	0.15	0.79	0.27	0.91	0.18
C2419	1.79	0.19	1.40	0.35	1.27	0.15
mgPL/dl	151	29	115	31	155	19

Tabella 10b Composizione media dei fosfolipidi plasmatici nei time point compresi tra T14 e T42. In grassetto sono riportati i dati riguardanti il DHA.

	T14		T28		T42	
	<i>Media</i>	<i>Dev.st</i>	<i>Media</i>	<i>Dev.st</i>	<i>Media</i>	<i>Dev.st</i>
C6	0.240	0.040	0.71	0.14	0.510	0.040
C8	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C12	0.150	0.050	0.120	0.040	0.120	0.030
C14	0.49	0.23	0.69	0.18	0.710	0.060
C1415	0.020	0.020	0.00	0.00	0.00	0.00
C16	33.10	0.88	32.8	1.4	33.10	0.92
C1619	0.210	0.050	0.220	0.040	0.260	0.080
C1617	0.51	0.18	0.66	0.15	0.56	0.14
C17	0.470	0.040	0.400	0.030	0.410	0.040
C171	0.100	0.030	0.00	0.00	0.00	0.00
C18	14.5	1.3	12.68	0.59	12.47	0.66
C1819	9.8	1.4	9.8	1.9	9.0	1.2
C1817	1.39	0.14	1.34	0.15	1.44	0.18
C1826	20.7	2.5	20.5	2.2	21.7	1.6
C1836	0.180	0.060	0.130	0.040	0.100	0.020
C1833	0.150	0.070	0.210	0.080	0.7	1.0
C20	0.410	0.090	0.420	0.080	0.420	0.050
C2019	0.140	0.040	0.100	0.030	0.090	0.010
C2026	0.270	0.040	0.230	0.020	0.220	0.050
C2036	2.34	0.41	2.09	0.35	1.84	0.82
C2046	7.4	1.4	7.3	1.4	7.3	1.4
C2033	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C2053	0.53	0.19	0.75	0.45	0.61	0.23
C22	1.02	0.19	1.44	0.29	1.44	0.16
C2219	0.030	0.020	0.00	0.00	0.00	0.00
C2226	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C2246	0.200	0.050	0.250	0.080	0.260	0.050
C2253	0.450	0.080	0.38	0.10	0.370	0.070
C2263	3.12	0.53	4.09	0.52	3.94	0.54
C24	0.86	0.16	1.01	0.22	0.97	0.11
C2419	1.30	0.25	1.66	0.40	1.62	0.28
mgPL/dl	153	24	137	21	131	22

Tabella 10c Composizione media dei fosfolipidi plasmatici nei time point compresi tra T56 e T88. In grassetto sono riportati i dati riguardanti il DHA.

	T56		T70		T88	
	<i>Media</i>	<i>Dev.st</i>	<i>Media</i>	<i>Dev.st</i>	<i>Media</i>	<i>Dev.st</i>
C6	0.060	0.010	0.070	0.040	0.00	0.00
C8	0.030	0.010	0.030	0.010	0.00	0.00
C10	0.030	0.020	0.020	0.010	0.00	0.00
C12	0.110	0.040	0.130	0.070	0.180	0.070
C14	0.52	0.17	0.56	0.38	0.68	0.12
C1415	0.000	0.010	0.050	0.030	0.00	0.00
C16	32.0	1.0	33.0	1.5	33.4	1.7
C1619	0.20	0.06	0.08	0.12	0.240	0.040
C1617	0.490	0.070	0.51	0.24	0.47	0.12
C17	0.470	0.070	0.430	0.030	0.440	0.050
C171	0.070	0.060	0.070	0.010	0.050	0.050
C18	13.49	0.63	13.08	0.75	11.3	4.3
C1819	9.32	0.70	7.7	3.0	9.1	2.0
C1817	1.39	0.13	1.12	0.56	1.31	0.15
C1826	20.0	1.6	22.6	2.6	24.0	2.6
C1836	0.110	0.070	0.170	0.030	0.050	0.070
C1833	0.140	0.040	0.150	0.070	0.170	0.050
C20	0.440	0.060	0.42	0.10	0.440	0.090
C2019	0.130	0.030	0.150	0.040	0.090	0.020
C2026	0.270	0.010	0.260	0.070	0.200	0.050
C2036	2.33	0.40	2.09	0.51	2.25	0.62
C2046	9.0	2.7	7.6	1.6	7.5	1.2
C2033	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C2053	0.66	0.17	0.93	0.93	0.66	0.16
C22	1.42	0.19	1.33	0.23	1.22	0.20
C2219	0.030	0.010	0.000	0.010	0.010	0.010
C2226	0.010	0.010	0.000	0.000	0.000	0.000
C2246	0.190	0.050	0.150	0.090	0.130	0.040
C2253	0.380	0.070	0.38	0.11	0.39	0.10
C2263	3.75	0.56	4.05	0.74	3.22	0.42
C24	1.24	0.18	1.15	0.31	0.94	0.12
C2419	1.75	0.32	1.63	0.30	1.48	0.24
mgPL/dl	241	51	193	53	140	30

Tabella 10d Composizione media dei fosfolipidi plasmatici nei time point compresi tra T5WA e T16WA. In grassetto sono riportati i dati riguardanti il DHA.

	T5WA		T10WA		T16WA	
	<i>Media</i>	<i>Dev.st</i>	<i>Media</i>	<i>Dev.st</i>	<i>Media</i>	<i>Dev.st</i>
C6	0.00	0.00	1.33	0.49	0.97	0.55
C8	0.00	0.00	0.030	0.050	0.04	0.10
C10	0.00	0.00	0.050	0.040	0.070	0.060
C12	0.100	0.030	0.220	0.080	0.33	0.35
C14	0.540	0.090	0.73	0.18	0.66	0.16
C1415	0.00	0.00	0.030	0.090	0.010	0.030
C16	32.2	1.5	33.6	1.4	32.5	1.2
C1619	0.220	0.050	0.230	0.050	0.220	0.050
C1617	0.45	0.17	0.47	0.17	0.53	0.18
C17	0.410	0.080	0.460	0.040	0.460	0.070
C171	0.030	0.050	0.050	0.050	0.100	0.020
C18	11.7	1.8	13.37	0.88	12.4	1.3
C1819	9.1	1.5	7.8	1.4	9.1	1.5
C1817	1.34	0.11	1.33	0.18	1.40	0.20
C1826	20.9	2.7	21.2	2.1	21.3	1.9
C1836	0.140	0.090	0.06	0.10	0.170	0.030
C1833	0.26	0.11	0.130	0.040	0.150	0.040
C20	0.47	0.13	0.630	0.090	0.49	0.21
C2019	0.23	0.12	0.110	0.010	0.090	0.040
C2026	0.280	0.050	0.230	0.030	0.150	0.090
C2036	2.33	0.55	2.15	0.25	2.02	0.43
C2046	8.9	2.4	6.9	1.4	8.1	1.6
C2033	0.00	0.00	0.090	0.070	0.08	0.10
C2053	1.0	1.1	0.54	0.21	0.68	0.27
C22	1.08	0.19	1.64	0.46	1.34	0.22
C2219	0.000	0.010	0.020	0.020	0.010	0.010
C2226	0.030	0.070	0.000	0.010	0.08	0.12
C2246	0.43	0.29	0.140	0.030	0.170	0.030
C2253	0.67	0.27	0.370	0.090	0.42	0.14
C2263	4.6	1.3	2.69	0.65	3.11	0.80
C24	1.11	0.31	1.40	0.32	1.17	0.23
C2419	1.55	0.41	1.90	0.39	1.67	0.31
mgPL/dl	146	14	124	15	128	26

Tabella 10e Composizione media dei fosfolipidi plasmatici nei time point compresi tra T31WA e T94WA. In grassetto sono riportati i dati riguardanti il DHA.

	T31WA		T44WA		T94WA	
	<i>Media</i>	<i>Dev.st</i>	<i>Media</i>	<i>Dev.st</i>	<i>Media</i>	<i>Dev.st</i>
C6	0.00	0.00	0.44	0.16	0.79	0.44
C8	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C12	0.110	0.010	0.080	0.030	0.140	0.080
C14	0.58	0.15	0.440	0.040	0.74	0.12
C1415	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C16	33.24	0.69	30.8	2.0	31.67	0.87
C1619	0.240	0.060	0.180	0.040	0.220	0.020
C1617	0.44	0.15	0.47	0.20	0.50	0.20
C17	0.460	0.030	0.430	0.050	0.400	0.040
C171	0.080	0.020	0.070	0.020	0.00	0.00
C18	13.36	0.46	12.7	1.2	12.60	0.44
C1819	9.91	0.34	9.5	1.9	9.3	1.0
C1817	1.58	0.14	1.43	0.23	1.22	0.17
C1826	21.5	2.6	18.7	1.4	22.2	1.9
C1836	0.160	0.030	0.150	0.030	0.170	0.040
C1833	0.120	0.050	0.100	0.020	0.230	0.090
C20	0.51	0.10	0.520	0.090	0.410	0.060
C2019	0.100	0.030	0.120	0.020	0.130	0.040
C2026	0.220	0.040	0.220	0.070	0.230	0.060
C2036	2.15	0.69	5.5	7.5	2.29	0.54
C2046	7.1	1.5	8.5	2.3	8.14	0.56
C2033	0.00	0.00	0.030	0.020	0.00	0.00
C2053	0.56	0.29	0.67	0.30	0.71	0.40
C22	1.39	0.22	1.40	0.15	1.35	0.31
C2219	0.020	0.010	0.03	0.01	0.00	0.00
C2226	0.090	0.040	0.040	0.030	0.03	0.00
C2246	0.140	0.070	0.210	0.050	0.300	0.090
C2253	0.410	0.080	0.54	0.11	0.50	0.11
C2263	2.67	0.30	3.52	0.64	3.28	0.37
C24	1.21	0.12	1.16	0.28	0.96	0.37
C2419	1.76	0.14	1.97	0.20	1.50	0.24
mgPL/dl	144	25	146	24	142	18

5.4.2 Analisi quantitativa del DHA nei trigliceridi plasmatici

In Tabella 11 sono riportate le quantità di DHA presente nei TG plasmatici al prelievo basale, al T88 ed al T94WA: i valori sono espressi come media e deviazione standard della quantità percentuale di ciascun acido grasso rispetto alla quantità di acidi grassi totale. Prima dell'inizio della supplementazione non era rilevabile DHA all'interno dei TG plasmatici, mentre dopo tre mesi di supplementazione la sua quantità percentuale aumenta ad 1.29%. Al termine del periodo di *washout* sale mediamente al 2.41%.

Tabella 11 Quantità media di DHA presente nei TG plasmatici prima dell'inizio della supplementazione, al termine della supplementazione ed al termine del periodo di *washout*.

	Basale		T88		T94WA	
	Media	Dev.st	Media	Dev.st	Media	Dev.st
C2263	0	0	1.29	0.92	2.4	1.2

5.4.3 Variazione temporale del DHA nei fosfolipidi plasmatici

Per ciascun paziente è stata analizzata la variazione quantitativa del DHA presente nei fosfolipidi plasmatici durante la durata dello studio; l'andamento dell'abbondanza percentuale del DHA nei PL plasmatici di ciascun paziente è rappresentato in Figura 15.

Un comportamento che risulta ricorrente in tutti i pazienti è l'aumento di DHA nei PL plasmatici nella prima settimana successiva all'inizio della supplementazione e nella tredicesima settimana successiva all'inizio della supplementazione (la quale corrisponde a cinque giorni dall'interruzione della supplementazione). Fa eccezione il Paziente 6 in cui il DHA% diminuisce in corrispondenza del T5WA, mentre al Paziente 5 non è stato effettuato il prelievo corrispondente a questo *time point*. Dopo tre mesi di *washout* le quantità di DHA nei PL plasmatici tornano ad essere simili a quelle prima della supplementazione (Wilcoxon test, *P-value* 0.125). L'analisi quantitativa del prelievo T44WA del Paziente 6 non è stata eseguita per problemi legati agli *standard* interni, per questo motivo il valore di DHA% corrispondente non è rappresentato.

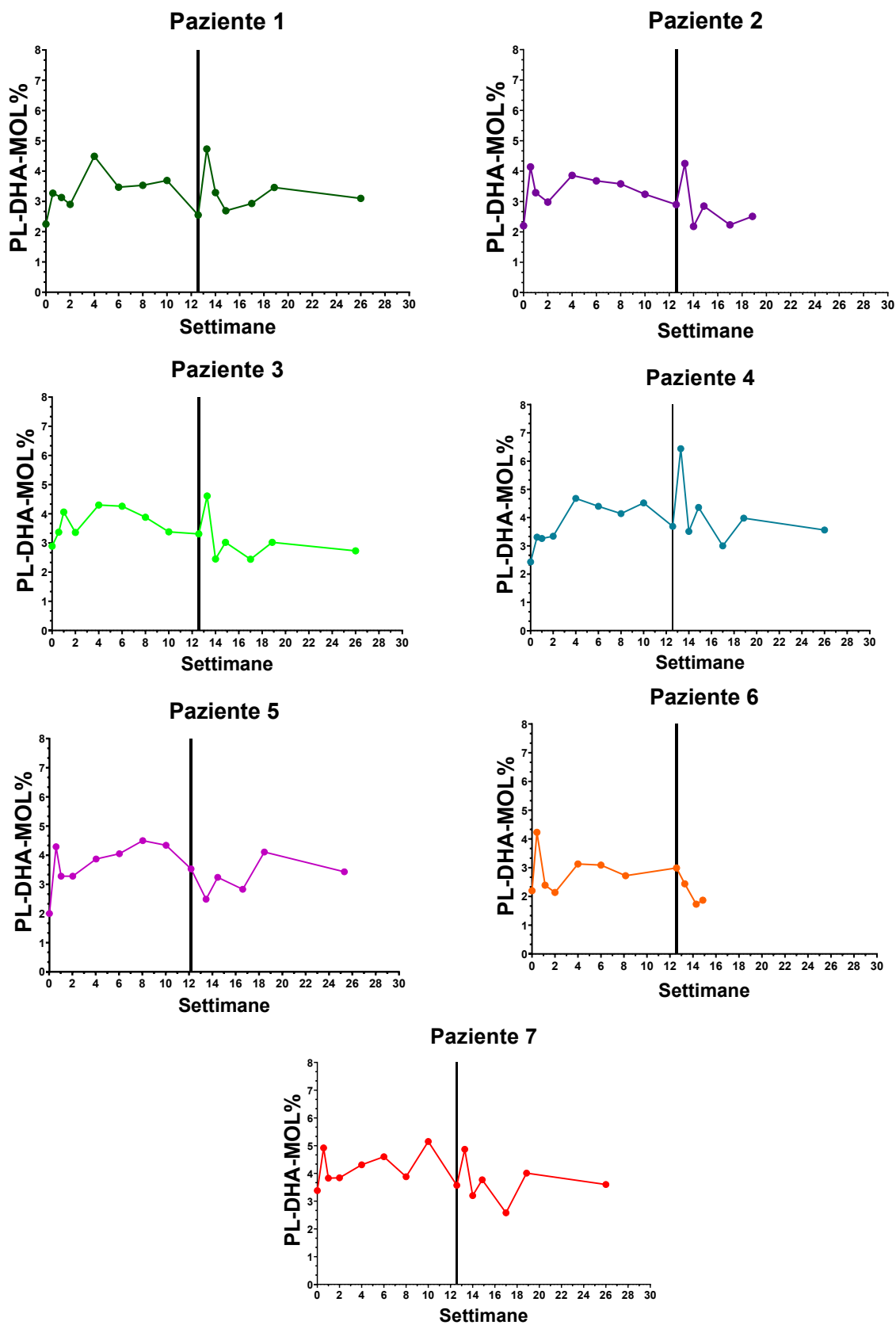


Figura 15 Andamento temporale dell'abbondanza percentuale del DHA nei fosfolipidi plasmatici di ciascun paziente. La linea verticale corrisponde al termine della supplementazione.

5.5 Analisi isotopica del DHA nei fosfolipidi plasmatici

Per ciascun paziente è stata analizzata l'abbondanza isotopica relativa del DHA presente nei fosfolipidi plasmatici durante la durata dello studio; l'andamento del $\delta^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ (vs PDB) del DHA nei PL plasmatici è rappresentato in Figura 16. I valori di $\delta^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ (vs PDB) a ciascun *time point*, calcolati come mediana, 25% percentile e 75% percentile ed *outlier*, sono riportati in Tabella 12.

Durante i tre mesi di supplementazione è ricorrente un aumento del $\delta^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ durante la prima settimana successiva all'inizio della supplementazione, quindi una sua diminuzione fino alla seconda-sesta settimana ed infine una tendenza ad aumentare di nuovo fino al termine della supplementazione, raggiungendo un valore sempre maggiore rispetto a quello basale e differente in maniera statisticamente significativa rispetto ad esso (Wilcoxon test, *P-value* 0.0156) (Figura 17).

All'inizio della fase di *washout*, il valore di $\delta^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ continua ad aumentare durante la prima settimana circa dall'interruzione della supplementazione risultando, al prelievo T5WA, differente in maniera statisticamente significativa rispetto al valore basale (Wilcoxon test, *P-value* 0.0313). Successivamente, $\delta^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ diminuisce fino all'ultimo *time point* in cui torna ad assumere valori molto simili a quelli basali (Wilcoxon test, *P-value* 0.6250) (Figura 17). Non è possibile valutare il $\delta^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ del DHA del Paziente 2 e del Paziente 6 al termine del *washout* poiché non sono stati effettuati i prelievi corrispondenti.

Al termine del periodo di *washin*, per ciascun paziente è stato calcolato il contributo percentuale dell'integratore al DHA totale presente nei fosfolipidi plasmatici (Tabella 13). Mediamente il DHA proveniente dall'integratore è il 29 ± 12 %. Il raggiungimento dello *steady state* è stato valutato confrontando la percentuale di DHA proveniente dall'integratore al T70 ed al T88 (Wilcoxon test, *P-value* 0.5625) (Figura 18).

Infine, per ciascun paziente è stata determinata la cinetica di eliminazione e l'emivita del DHA proveniente dall'integratore dal *pool* dei fosfolipidi plasmatici (Figura 19). Mediamente l'emivita calcolata in giorni è di 23 ± 6 giorni (valore minimo 13 giorni, valore massimo 31 giorni).

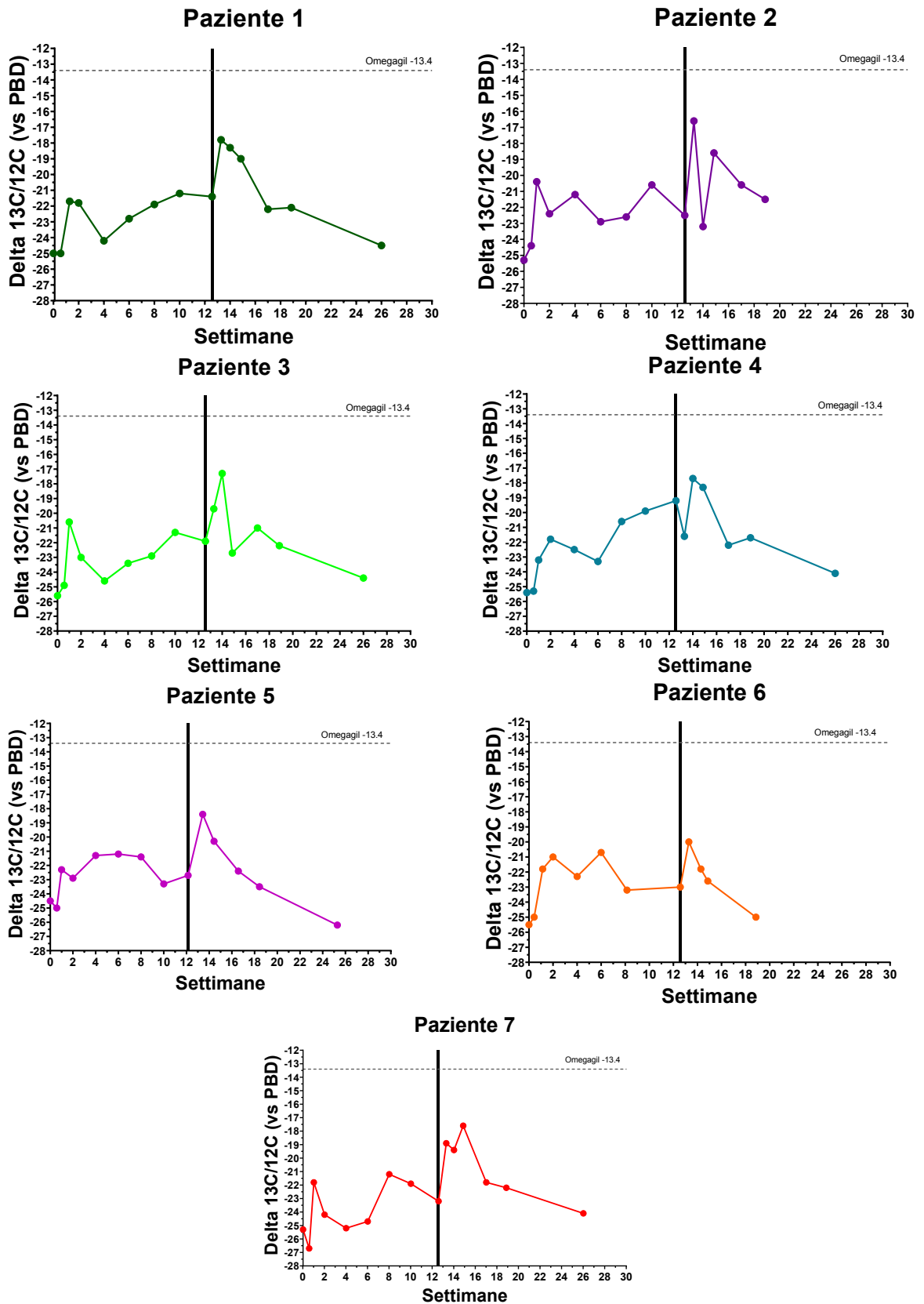


Figura 16a Andamento temporale dell'abbondanza isotopica relativa ($\delta^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ vs PDB) del DHA nei fosfolipidi plasmatici di ciascun paziente. La linea verticale rappresenta il termine della supplementazione. La linea tratteggiata rappresenta l'arricchimento dell'integratore.

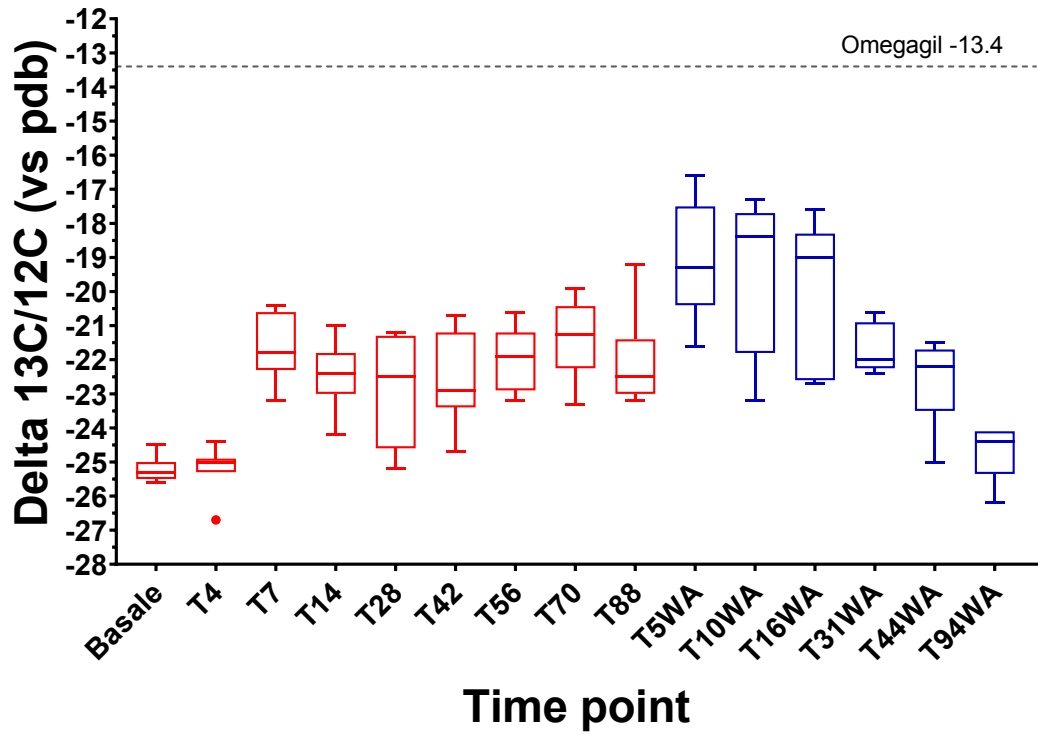


Figura 16b Andamento generale della variazione di delta di DHA durante il periodo di washin (rosso) e di washout (blu). L'andamento è rappresentato come valore mediano e intervallo interquartile. I pallini rappresentano gli outlier.

Tabella 12 Valore mediano, 25% percentile e 75% percentile deli $\delta^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ (vs PDB) del DHA nei PL plasmatici ai diversi *time points*.

$\delta^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ (vs PDB)			
Prelievo	Mediana	25% Percentile	75% Percentile
Basale	-25.3	-25.5	-25,0
T4	-25.0	-25.3	-24.9
T7	-21.8	-22.3	-20.6
T14	-22.4	-23.0	-21.8
T28	-22.5	-24.6	-21.3
T42	-22.9	-23.4	-21.2
T56	-21.9	-22.9	-21.2
T70	-21.3	-22.3	-20.4
T88	-22.5	-23,0	-21.4
T5WA	-19.3	-20.4	-17.5
T10WA	-18.4	-21.8	-17.7
T16WA	-19.0	-22.6	-18.3
T31WA	-22.0	-22.3	-20.9
T44WA	-22.2	-23.5	-21.7
T94WA	-24.4	-25.3	-24.1

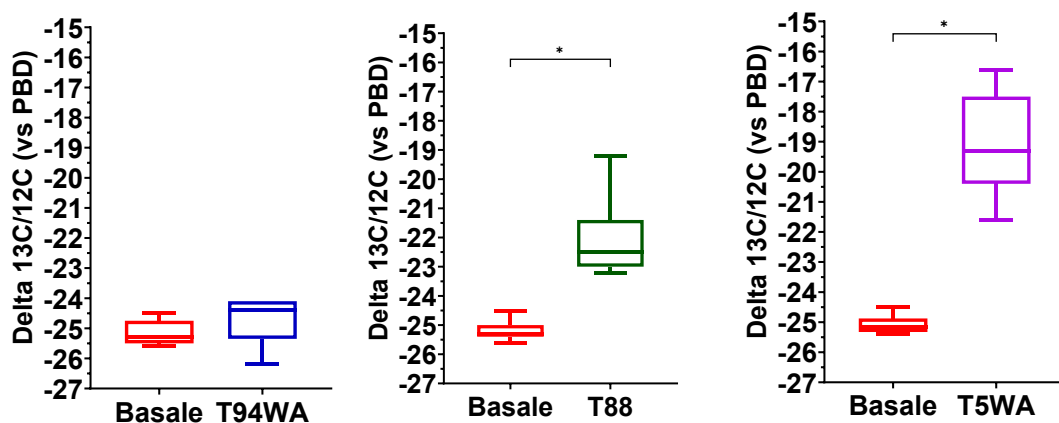


Figura 17 Confronto dell'arricchimento isotopico del DHA prima dell'inizio della supplementazione e dopo tre mesi di washout (Wilcoxon test, P-value: 0.6250); prima dell'inizio della supplementazione e al termine del washin (Wilcoxon test, P-value 0.0156); prima dell'inizio della supplementazione e circa 5 giorni dopo la sospensione della supplementazione (Wilcoxon test, P-value 0.0313).

Tabella 13 Percentuale di DHA proveniente dall'integratore ed incorporato nei PL plasmatici in corrispondenza degli ultimi due *time point* di ciascun paziente.

	DHA (%) PROVENIENTE DALL'INTEGRATORE			Media valori	Dev.st
	T56	T70	T88		
Paziente 1		32.59	31.33	29	12
Paziente 2		39.85	24.02		
Paziente 3		35.50	30.52		
Paziente 4		45.83	52.07		
Paziente 5		10.69	16.13		
Paziente 6	19.38		20.82		
Paziente 7		28.80	17.83		

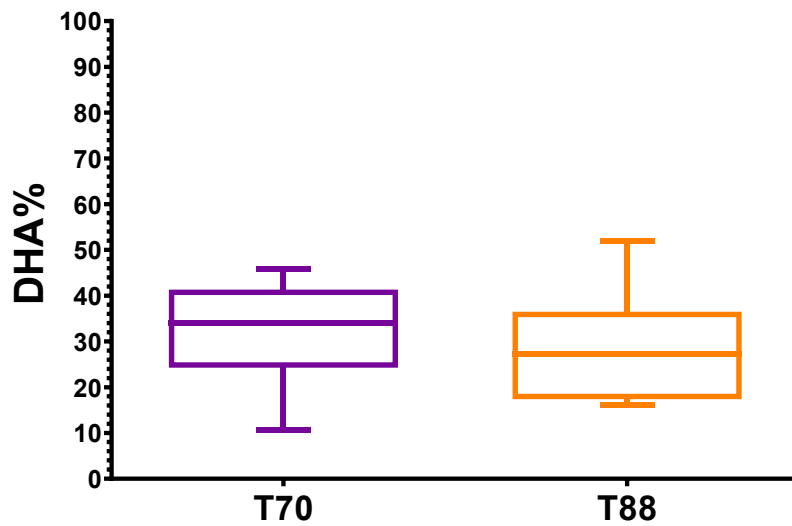


Figura 18 Confronto tra la percentuale di DHA proveniente dall'integratore agli ultimi due prelievi (Wilcoxon test, P-value 0.5625).

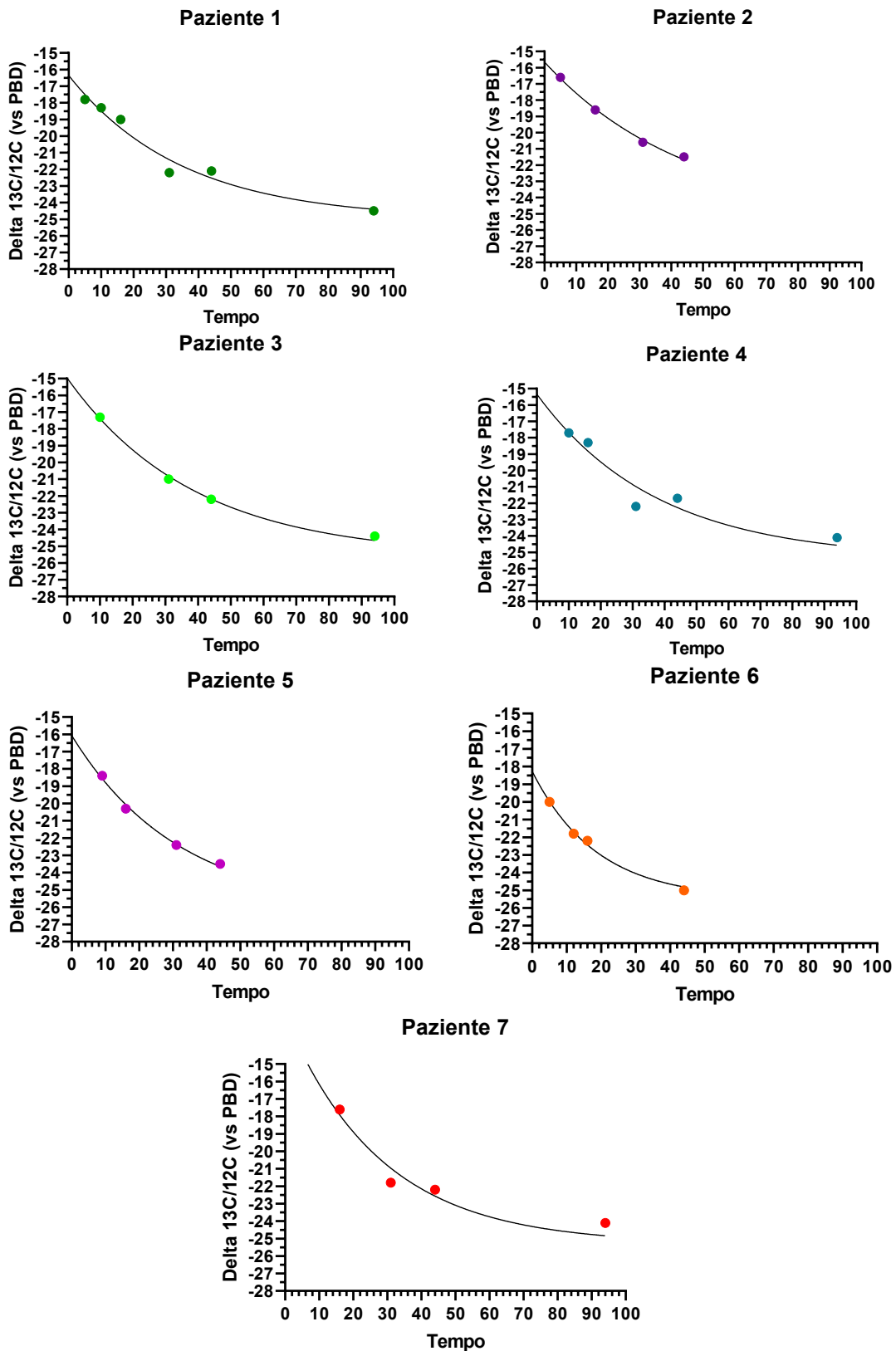


Figura 19 Cinetica di eliminazione (pallini = punti sperimentali, linea = fitting condotto con l'equazione $f(x) = y_0 + a \cdot e^{-bx}$. In ascissa sono riportati i giorni trascorsi dalla sospensione della supplementazione.

6

DISCUSSIONE

È comunemente accettato ed ampiamente dimostrato il ruolo benefico del DHA in molti aspetti della salute dell'uomo. La sua fonte principale è la dieta; tuttavia, il suo normale *intake* non è sufficiente a soddisfare le raccomandazioni degli enti competenti. Per questo motivo è spesso consigliata l'assunzione di DHA sotto forma di integratore alimentare soprattutto nelle donne gravide e nei soggetti cardiopatici (Koletzko et al., 2007, 2008; Kris-Etherton et al., 2002).

Ad oggi manca un'opinione concorde in merito al dosaggio e alla durata ottimali della supplementazione, in quanto le informazioni disponibili sul suo *turnover* sono molto limitate.

Il *turnover* di una molecola può essere studiato mediante l'uso di traccianti quali gli isotopi stabili, come ad esempio il ^{13}C . Ad oggi, la maggior parte degli studi metabolici riguardanti il DHA e basati sulla variazione dell'abbondanza isotopica si è però focalizzata sulla sua sintesi a partire da ALA; un esempio è dato dai lavori di Goyens et al. e di Pawlosky et al. (Goyens et al., 2005; Pawlosky et al., 2001). Essi, mediante somministrazione di ALA marcato rispettivamente con ^{13}C e con ^2H , hanno dimostrato che la quantità di ALA convertito in acido docosapentaenoico e successivamente in DHA non supera l'1%. Sono anche stati condotti alcuni studi in cui la popolazione ha assunto un integratore alimentare contenente DHA, come nel nostro caso, ma che non hanno sfruttato la tecnica degli isotopi stabili. Questi, inoltre, si sono focalizzati sull'effetto che la supplementazione ha sulle concentrazioni di DHA nel plasma o in altri *pool* lipidici e non tanto sul suo *turnover*.

Questo studio, quindi, consente di ottenere nuove informazioni riguardo la cinetica di incorporazione ed eliminazione di una molecola di origine esogena a livello di un *pool* endogeno quali i fosfolipidi plasmatici. Si è deciso di analizzare questo *pool* poiché di facile accesso e perché, tra i lipidi plasmatici, i PL sono particolarmente ricchi in n-3 LC-PUFAs, al contrario di TG ed FFA, e anche perché i TG sono troppo influenzati dalla dieta nel breve termine. Questo è confermato dai valori di abbondanza percentuale di DHA da noi misurati: a livello di PL, infatti, è possibile riscontrare una certa quantità di DHA anche al

baseline mentre nei TG esso è assente in tutti i pazienti prima dell'inizio della supplementazione.

6.1 Analisi del profilo quantitativo

Nei PL l'abbondanza percentuale media di DHA presente prima dell'inizio della supplementazione è pari a $2.48 \pm 0.49\%$, in accordo con quanto affermato da Arterburn et al. (Arterburn et al., 2006)

Dai nostri risultati si evince come l'andamento dei livelli di DHA nei PL plasmatici non sia sempre regolare; rimane però costante in tutti i pazienti il primo picco a circa una settimana dall'inizio della supplementazione. Aumentando improvvisamente l'*intake* di DHA, è plausibile un suo rapido aumento a livello dei fosfolipidi plasmatici poiché questi, tra le classi lipidiche del plasma, sono quelli in cui il DHA si distribuisce in maniera maggiore (Vidgren et al., 1997). Segue poi una diminuzione di tali livelli probabilmente perché il DHA tende a redistribuirsi in altri *pool* lipidici, e fino al termine della supplementazione i livelli rimangono pressoché stabili in tutti i pazienti. Quest'ultimo dato è in accordo con Arterburn et al. (Arterburn et al., 2006) i quali affermano che i livelli di DHA nei PL plasmatici raggiungono un equilibrio entro un mese dall'inizio di una supplementazione. I livelli di DHA nel nostro studio sono poco influenzati dall'assunzione dell'integratore e questo potrebbe essere dovuto ad un dosaggio troppo basso, oppure (o anche) ad una riduzione della sintesi endogena a seguito della supplementazione. Nel profilo di alcuni pazienti sono inoltre riscontrabili alcuni picchi che non seguono l'andamento generale (es. Paziente 1, T28; Paziente 6, T14; Paziente 7, T70); questi sono probabilmente causati dall'assunzione di DHA tramite la dieta.

Anche nel periodo di *washout* si osserva un andamento ricorrente: i livelli di DHA nei PL plasmatici aumentano rapidamente dopo la sospensione della supplementazione. Questo può essere dovuto alla immissione in circolo di DHA a partire dai *pool* a lento turnover come il tessuto adiposo (Lefils et al., 2010; Strawford et al., 2004). Successivamente la concentrazione di DHA si riduce anche se, dopo tre mesi, ancora non ritorna ai valori del *baseline* (T0 $2.48 \pm 0.49\%$; T94WA $3.28 \pm 0.37\%$); va comunque notato che tra i due valori non c'è una differenza statisticamente significativa (Wilcoxon test, *P-value* 0.125).

6.2 Analisi del profilo isotopico

6.2.1 Periodo di *washin*

L'andamento dell'abbondanza isotopica relativa deve essere analizzato contestualmente ai dati quantitativi del DHA, in quanto il $\delta(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})$ è una misura relativa che dipende appunto da tale quantità. Oltretutto, la fonte di DHA per i partecipanti allo studio non è solo l'integratore alimentare.

In generale l'andamento dell'abbondanza isotopica relativa è caratterizzato da una prima fase di crescita durante le prime settimane di supplementazione, e successivamente da una di decrescita fino alla settimana 4-6; infine, si ha nuovamente un aumento.

Il primo picco è comune a tutti i pazienti, così come quello presente nel profilo dell'abbondanza percentuale. Questo conferma come sia proprio il DHA proveniente dall'integratore, ricco in ^{13}C , a determinare l'aumento dei livelli plasmatici dell'acido grasso. Analogamente, la successiva diminuzione dei valori di $\delta(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})$ dimostra una sua effettiva redistribuzione a seguito dell'improvviso aumentato introito. Dopo questa prima fase il $\delta(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})$ tendenzialmente aumenta fino a raggiungere, al termine della supplementazione, un valore maggiore rispetto al basale in tutti i pazienti (Wilcoxon test, *P-value* 0.0156); questo fatto dimostra come la velocità di incorporazione del DHA proveniente dall'integratore nel *pool* dei PL plasmatici sia maggiore rispetto alla velocità di eliminazione. Risulta però interessante osservare come durante questa fase il suo andamento non sia sempre regolare; vi sono delle eccezioni dovute alla variabilità interindividuale ed altre dovute probabilmente a fenomeni biologici.

Mentre i pazienti 1, 3 e 4 mostrano un profilo regolare, per il paziente 7 al termine della supplementazione (T88) il $\delta(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})$ risulta minore rispetto ai valori misurati ai *time point* precedenti (T56 e T70). Questo dato, visto assieme al rispettivo andamento dell'abbondanza percentuale, può essere spiegato da un effetto dovuto alla dieta: è probabile che tra il T56 ed il T70 il paziente abbia assunto DHA anche da una fonte dietetica diversa rispetto all'integratore, determinando un aumento dei suoi livelli nei PL plasmatici. Il DHA assunto con la dieta contiene un quantitativo di ^{13}C inferiore rispetto all'integratore, così come dimostrato dai valori misurati al *baseline*. Questa quota di DHA causa una

diluizione della quota proveniente dall'integratore, determinando così una diminuzione del valore di $\delta(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})$.

Si osservano molte altre variazioni in tutti i pazienti, probabilmente dovute a una serie di fenomeni di redistribuzione tra i diversi *pool* lipidici che influiscono sull'andamento del $\delta(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})$. Questi fenomeni spiegherebbero anche perché le percentuali di DHA provenienti dall'integratore al T70 e al T88 siano molto variegata, e perché in diversi casi i valori calcolati al T88 risultino inferiori dei rispettivi valori al T70. Nonostante non ci sia una differenza statisticamente significativa tra le percentuali al T70 e al T88, si deduce che nella maggior parte dei pazienti non si sia ancora raggiunta una condizione di totale equilibrio.

6.2.2 Periodo di *washout*

Durante la fase di *washout* il profilo di variazione del $\delta(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})$ è più regolare e ricorrente che non nella fase precedente. Si osserva sempre un picco entro la prima settimana dopo la sospensione della supplementazione (solo nel Paziente 7 questo aumento è più prolungato nel tempo) (Wilcoxon test, *P-value* 0.0313) e, a seguire, si osserva una tendenza dell'abbondanza isotopica a diminuire.

La cinetica di eliminazione è apparentemente di tipo esponenziale, e l'emivita media risulta di circa 23 giorni. Ciò significa che il DHA proveniente dall'integratore viene eliminato dall'organismo umano velocemente e non è quindi in grado di esplicare effetti benefici a lungo termine.

L'aumento del $\delta(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})$ alla sospensione della supplementazione è sempre affiancato anche da un aumento dei livelli di DHA nei PL plasmatici. È quindi plausibile che durante i tre mesi di *washin* l'organismo si sia abituato ad un certo *intake* giornaliero e che una sua improvvisa diminuzione scateni una massiccia liberazione di DHA dai siti in cui questo è stato accumulato. Lefils et al. hanno condotto uno studio su un modello animale in cui alcuni topi sono stati mantenuti in condizioni di dieta *standard*, altri hanno assunto una dieta ricca di DHA; di questi ultimi, alcuni sono stati studiati solo durante il periodo di supplementazione, altri anche durante un periodo di *washout*. Nel loro caso si osserva un aumento dei livelli di DHA in tessuti come il fegato ed il tessuto adiposo sottocutaneo negli animali sottoposti a dieta ricca di DHA rispetto ai controlli e, alla sospensione della supplementazione, i livelli di DHA in questi tessuti diminuisce (Lefils et al., 2010). Questo dimostra come l'assunzione di un

supplemento determini un accumulo a livello di tessuti periferici del supplemento stesso e come invece la sua sospensione ne determini una mobilitazione. Questo spiegherebbe il picco nei valori di delta, comune in tutti i pazienti, nei primi prelievi del *washout*.

CONCLUSIONI

Dall'analisi del profilo quantitativo e del profilo isotopico del DHA dei PL plasmatici si possono trarre le seguenti conclusioni. All'inizio di una supplementazione con 250 mg/die di DHA sotto forma di trigliceride l'organismo risponde mediante una rapida incorporazione dell'acido grasso a livello dei PL. A questo rapido aumento, segue una rapida diminuzione dovuta ad una redistribuzione dell'acido grasso. Durante i tre mesi in analisi vi sono tuttavia vari fenomeni di redistribuzione, e al termine della supplementazione non è ancora stata raggiunta totalmente una condizione di equilibrio. Inoltre, l'abbondanza percentuale di DHA non viene molto influenzata dalla supplementazione; tre mesi di supplementazione con 250 mg/die risulterebbero quindi essere troppo pochi per ottenere degli effetti rilevanti a livello quantitativo e per raggiungere una condizione di *steady state* per quanto riguarda la distribuzione del DHA tra i vari *pool* lipidici.

In seguito alla sospensione della supplementazione, inoltre, dopo una prima fase di mobilitazione da parte di siti di accumulo, il DHA viene eliminato piuttosto velocemente dai PL plasmatici e non è possibile, quindi, avere degli effetti benefici a lungo termine.

Questo studio è da considerarsi preliminare in quanto presenta alcuni limiti procedurali, che includono la ridotta numerosità dei pazienti, per cui ad esempio non è possibile valutare l'influenza del genere e del peso sul metabolismo del DHA. Inoltre, la dieta non è controllata, per cui i soggetti dello studio assumono con la dieta quantità variabili di DHA che diluisce quello introdotto con l'integratore. Naturalmente, manca anche la valutazione degli effetti di diversi dosaggi del DHA. Ciononostante, si ritiene che questo studio possa fungere da base per studi più approfonditi ed elaborati, in quanto consente di definire la tempistica dei prelievi che dovranno essere effettuati. In aggiunta, la tecnica utilizzata per questo lavoro di tesi è innovativa e permette di effettuare studi di cinetica anche in soggetti fragili, quali donne in gravidanza e bambini, ai quali non si vogliono somministrare composti marcati artificialmente con isotopi stabili. Ogni metabolita che abbia un contenuto diverso, a livello di abbondanza naturale, di ^{13}C o di deuterio, può essere utilizzato come tracciante.

RIFERIMENTI

- Abdelrahman, M. A., Osama, H., Saeed, H., Madney, Y. M., Harb, H. S., & Abdelrahim, M. E. A. (2022). Impact of n-3 polyunsaturated fatty acid intake in pregnancy on maternal health and birth outcomes: systematic review and meta-analysis from randomized controlled trails. *Archives of Gynecology and Obstetrics*. <https://doi.org/10.1007/s00404-022-06533-0>
- Abdukeyum, G. G., Owen, A. J., Larkin, T. A., & McLennan, P. L. (2016). Up-regulation of mitochondrial antioxidant superoxide dismutase underpins persistent cardiac nutritional-preconditioning by long chain n-3 polyunsaturated fatty acids in the rat. *Journal of Clinical Medicine*, 5(3). <https://doi.org/10.3390/jcm5030032>
- Alzoubi, M. R., & Aldomi AL-Domi, H. (2017). Could omega-3 fatty acids a therapeutic treatment of the immune-metabolic consequence of intermittent hypoxia in obstructive sleep apnea? In *Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews* (Vol. 11, Issue 4, pp. 297–304). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2016.06.024>
- Arab, K., Rossary, A., Flourié, F., Tourneur, Y., & Steghens, J.-P. (2006). Docosahexaenoic acid enhances the antioxidant response of human fibroblasts by upregulating γ -glutamyl-cysteinyl ligase and glutathione reductase. *British Journal of Nutrition*, 95(1), 18–26. <https://doi.org/10.1079/bjn20051626>
- Arterburn, L. M., Hall, E. B., & Oken, H. (2006). *Distribution, interconversion, and dose response of n3 fatty acids in humans 1-4*. <https://academic.oup.com/ajcn/article/83/6/1467S/4633217>
- Banerjee, S., & Mazumdar, S. (2012). Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte. *International Journal of Analytical Chemistry*, 2012, 1–40. <https://doi.org/10.1155/2012/282574>
- Bender, M. M. (1971). *VARIATIONS IN THE 'C/'C RATIOS OF PLANTS IN RELATION TO THE PATHWAY OF PHOTOSYNTHETIC CARBON DIOXIDE FIXATION* (Vol. 10).
- Birch, E. E., Carlson, S. E., Hoffman, D. R., Fitzgerald-Gustafson, K. M., Fu, V. L. N., Drover, J. R., Castañeda, Y. S., Minns, L., Wheaton, D. K. H., Mundy, D., Marunycz, J., & Diersen-Schade, D. A. (2010). The DIAMOND (DHA Intake and Measurement of Neural Development) Study: A double-masked, randomized controlled clinical trial of the maturation of infant visual acuity as a function of the dietary level of docosahexaenoic acid. *American Journal of Clinical Nutrition*, 91(4), 848–859. <https://doi.org/10.3945/ajcn.2009.28557>
- Birch, E. E., Dennis, •, Hoffman, R., Uauy, R., & Birch, D. G. (1998). Visual Acuity and the Essentiality of Docosahexaenoic Acid and Arachidonic Acid in the Diet of Term Infants. In *Pediatric Research* (Vol. 44).

- Bucher, H. C., Hengstler, P., Schindler, C., & Meier, G. (2002). *N-3 Polyunsaturated Fatty Acids in Coronary Heart Disease: A Meta-analysis of Randomized Controlled Trials*.
- Calder, P. C. (2013). N-3 Fatty acids, inflammation and immunity: New mechanisms to explain old actions. *Proceedings of the Nutrition Society*, 72(3), 326–336. <https://doi.org/10.1017/S0029665113001031>
- Carlson, S. E., Colombo, J., Gajewski, B. J., Gustafson, K. M., Mundy, D., Yeast, J., Georgieff, M. K., Markley, L. A., Kerling, E. H., & Shaddy, D. J. (2013). DHA supplementation and pregnancy outcomes. *American Journal of Clinical Nutrition*, 97(4), 808–815. <https://doi.org/10.3945/ajcn.112.050021>
- Carlson, S. E., Ford, A. J., Werkman, S. H., Peeples, J. M., & K Koo, W. W. (1996). Visual Acuity and Fatty Acid Status of Term Infants Fed Human Milk and Formulas with and without Docosahexaenoate and Arachidonate from Egg Yolk Lecithin. In *Pediatric Research* (Vol. 39).
- Cole, G. M., Ma, Q. L., & Frautschy, S. A. (2009). Omega-3 fatty acids and dementia. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 81(2–3), 213–221. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2009.05.015>
- Coulthard, L. R., White, D. E., Jones, D. L., McDermott, M. F., & Burchill, S. A. (2009). p38MAPK: stress responses from molecular mechanisms to therapeutics. In *Trends in Molecular Medicine* (Vol. 15, Issue 8, pp. 369–379). <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2009.06.005>
- Denis, I., Potier, B., Vancassel, S., Heberden, C., & Lavialle, M. (2013). Omega-3 fatty acids and brain resistance to ageing and stress: Body of evidence and possible mechanisms. In *Ageing Research Reviews* (Vol. 12, Issue 2, pp. 579–594). <https://doi.org/10.1016/j.arr.2013.01.007>
- Faldella, G., Govoni, M., Alessandroni, R., Marchiani, E., Paolo Salvioli, G., Luigi Biagi, P., Spano, C., Clinico di Pediatria Preventiva Neonatologia, I., Faldella Marchiani G P Salvioli R Alessandroni, G. E., Govoni, M., Biagi C Spano, P. L., & Giacomo Faldella, P. (1996). Visual evoked potentials and dietary long chain polyunsaturated fatty acids in preterm infants Feto-maternal and Developmental Medicine. In *Archives of Disease in Childhood* (Vol. 75).
- Flenker, U. (2012). Isotope ratio mass spectrometry - history and terminology in brief. In *Drug Testing and Analysis* (Vol. 4, Issue 12, pp. 893–896). <https://doi.org/10.1002/dta.1399>
- FOLCH, J., LEES, M., & SLOANE STANLEY, G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry*, 226(1), 497–509. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)64849-5](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)64849-5)
- Galewsky, J., Steen-Larsen, H. C., Field, R. D., Worden, J., Risi, C., & Schneider, M. (2016). Stable isotopes in atmospheric water vapor and applications to the hydrologic cycle. In *Reviews of Geophysics* (Vol. 54, Issue 4, pp. 809–865). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1002/2015RG000512>

- Goyens, P. L. L., Spilker, M. E., Zock, P. L., Katan, M. B., & Mensink, R. P. (2005). Compartmental modeling to quantify α -linolenic acid conversion after longer term intake of multiple boluses. *Journal of Lipid Research*, *46*(7), 1474–1483. <https://doi.org/10.1194/jlr.M400514-JLR200>
- Heinrich, P. C., Behrmann, I., Haan, S., Hermanns, H. M., & Schaper, F. (2003). Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation 1. In *Biochem. J* (Vol. 374).
- Herrera, E. A., Farías, J. G., González-Candía, A., Short, S. E., Carrasco-Pozo, C., & Castillo, R. L. (2015). Ω 3 supplementation and intermittent hypobaric hypoxia induce cardioprotection enhancing antioxidant mechanisms in adult rats. *Marine Drugs*, *13*(2), 838–860. <https://doi.org/10.3390/md13020838>
- Ian Givens, D., & Gibbs, R. A. (2008). Current intakes of EPA and DHA in European populations and the potential of animal-derived foods to increase them. *Proceedings of the Nutrition Society*, *67*(3), 273–280. <https://doi.org/10.1017/S0029665108007167>
- Innis, S. M. (n.d.). Dietary (n-3) Fatty Acids and Brain Development 1,2. In *The Journal of Nutrition Recent Advances in Nutritional Sciences*. <https://academic.oup.com/jn/article/137/4/855/4664682>
- Innis, S. M. (2008). Dietary omega 3 fatty acids and the developing brain. In *Brain Research* (Vol. 1237, pp. 35–43). <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2008.08.078>
- Kamen, MD. (1947). Use of isotopes in biochemical research: Fundamental aspects. *Annual Review of Biochemistry*, *16*, 631–654.
- Koletzko, B., Cetin, I., Thomas Brenna, J., Alvino, G., von Berlepsch, J., Biesalski, H. K., Clandinin, T., Debertin, H., Decsi, T., Demmelmair, H., Desoye, G., Dietz, V., Dodds, P., Emmett, P., Facchinetti, F., Gillman, M. W., Heinrich, J., Herrera, E., Heird, W. C., ... Weiler, H. (2007). Dietary fat intakes for pregnant and lactating women. *British Journal of Nutrition*, *98*(5), 873–877. <https://doi.org/10.1017/S0007114507764747>
- Koletzko, B., Lien, E., Agostoni, C., Böhles, H., Campoy, C., Cetin, I., Decsi, T., Dudenhausen, J. W., Dupont, C., Forsyth, S., Hoesli, I., Holzgreve, W., Lapillonne, A., Putet, G., Secher, N. J., Symonds, M., Szajewska, H., Willatts, P., & Uauy, R. (2008). The roles of long-chain polyunsaturated fatty acids in pregnancy, lactation and infancy: Review of current knowledge and consensus recommendations. In *Journal of Perinatal Medicine* (Vol. 36, Issue 1, pp. 5–14). <https://doi.org/10.1515/JPM.2008.001>
- Kris-Etherton, P. M., Harris, W. S., & Appel, L. J. (2002). Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease. In *Circulation* (Vol. 106, Issue 21, pp. 2747–2757). <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000038493.65177.94>
- Lafuente, M., González-Herrero, M. E. R., Villadóniga, S. R., & Domingo, J. C. (2021). Antioxidant activity and neuroprotective role of docosahexaenoic acid

- (Dha) supplementation in eye diseases that can lead to blindness: A narrative review. In *Antioxidants* (Vol. 10, Issue 3, pp. 1–13). MDPI. <https://doi.org/10.3390/antiox10030386>
- Lauritzen, L., Brambilla, P., Mazzocchi, A., Harsløf, L. B. S., Ciappolino, V., & Agostoni, C. (2016). DHA effects in brain development and function. In *Nutrients* (Vol. 8, Issue 1). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/nu8010006>
- Lefils, J., Géloën, A., Vidal, H., Lagarde, M., & Bernoud-Hubac, N. (2010). Dietary DHA: Time course of tissue uptake and effects on cytokine secretion in mice. *British Journal of Nutrition*, 104(9), 1304–1312. <https://doi.org/10.1017/S0007114510002102>
- Levant, B. (2011). N-3 (Omega -3) Fatty acids in postpartum depression: Implications for prevention and treatment. In *Depression Research and Treatment* (Vol. 2011). <https://doi.org/10.1155/2011/467349>
- Malcolm, C. A., McCulloch, D. L., & Montgomery, C. (n.d.). *Maternal docosahexaenoic acid supplementation during pregnancy and visual evoked potential development in term infants: a double blind, prospective, randomised trial*. www.archdischild.com
- Mallick, R., Basak, S., & Duttaroy, A. K. (2019). Docosahexaenoic acid, 22:6n-3: Its roles in the structure and function of the brain. In *International Journal of Developmental Neuroscience* (Vol. 79, pp. 21–31). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2019.10.004>
- Mantovani, A., Dinarello, C. A., Molgora, M., & Garlanda, C. (2019). Interleukin-1 and Related Cytokines in the Regulation of Inflammation and Immunity. In *Immunity* (Vol. 50, Issue 4, pp. 778–795). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.03.012>
- Massaro, M., Scoditti, E., Carluccio, M. A., & de Caterina, R. (2010). Nutraceuticals and prevention of atherosclerosis: Focus on ω -3 polyunsaturated fatty acids and mediterranean diet polyphenols. In *Cardiovascular Therapeutics* (Vol. 28, Issue 4). <https://doi.org/10.1111/j.1755-5922.2010.00211.x>
- Mori, T. A. (2018). Reprint of: Marine OMEGA-3 fatty acids in the prevention of cardiovascular disease. *Fitoterapia*, 126, 8–15. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2018.04.003>
- Oppedisano, F., Macrì, R., Gliozzi, M., Musolino, V., Carresi, C., Maiuolo, J., Bosco, F., Nucera, S., Zito, M. C., Guarnieri, L., Scarano, F., Nicita, C., Coppoletta, A. R., Ruga, S., Scicchitano, M., Mollace, R., Palma, E., & Mollace, V. (2020). The anti-inflammatory and antioxidant properties of n-3 PUFAs: Their role in cardiovascular protection. In *Biomedicines* (Vol. 8, Issue 9). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/biomedicines8090306>
- Pawlosky, R. J., Hibbeln, J. R., Novotny, J. A., & Salem, N. (2001). Physiological compartmental analysis of α -linolenic acid metabolism in adult humans. *Journal of Lipid Research*, 42(8), 1257–1265. [https://doi.org/10.1016/s0022-2275\(20\)31576-5](https://doi.org/10.1016/s0022-2275(20)31576-5)

- Pokrovskii, V. A., & Mosln, V. v. (1987). *ATOM BOMBARDMENT IN MASS SPECTROMETRY* (Vol. 23, Issue i).
- Richter, C. K., Bowen, K. J., Mozaffarian, D., Kris-Etherton, P. M., & Skulas-Ray, A. C. (2017). Total Long-Chain n-3 Fatty Acid Intake and Food Sources in the United States Compared to Recommended Intakes: NHANES 2003–2008. *Lipids*, 52(11), 917–927. <https://doi.org/10.1007/s11745-017-4297-3>
- Robert R. Wolfe, D. L. C. (2004). *Isotope Tracers in Metabolic Research: Principles and Practice of Kinetic Analysis, 2nd Edition*.
- Ruben, S. K. M. D. (1941). Long-Lived Radioactive Carbon: C14. *Physical Review Journals Archive*, 59, 349.
- Saini, R. K., & Keum, Y. S. (2018). Omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids: Dietary sources, metabolism, and significance — A review. In *Life Sciences* (Vol. 203, pp. 255–267). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.04.049>
- Schiller, J., & Huster, D. (2012). New methods to study the composition and structure of the extracellular matrix in natural and bioengineered tissues. In *Biomatter* (Vol. 2, Issue 3, pp. 115–131). <https://doi.org/10.4161/biom.20866>
- Schoenheimer, R. R. D. (1935a). Deuterium as an indicator in the study of intermediary metabolism. I. *Journal of Biological Chemistry*, 111, 163–168.
- Schoenheimer, R. R. D. (1935b). Deuterium as an indicator in the study of intermediary metabolism. III. The role of fat tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 111, 175–181.
- Simonato, M., Visentin, S., Verlato, G., Cosmi, E., Correani, A., Cogo, P., & Carnielli, V. P. (2022). DHA turnover in pregnant women using the natural abundance variation of 13C: A pilot study. *British Journal of Nutrition*. <https://doi.org/10.1017/S0007114522001088>
- Sinclair, A. J. (2019). Docosahexaenoic acid and the brain– what is its role? *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 28(4), 675–688. [https://doi.org/10.6133/apjcn.201912_28\(4\).0002](https://doi.org/10.6133/apjcn.201912_28(4).0002)
- Smith2, B. N., & Epsten, S. (1971). Two Categories of 1CC/12C Ratios for Higher Plantsl. In *Plant Physiol* (Vol. 47).
- Smithers, L. G., Gibson, R. A., Mcphee, A., & Makrides, M. (2008). Higher dose of docosahexaenoic acid in the neonatal period improves visual acuity of preterm infants: results of a randomized controlled trial 1-4. <https://academic.oup.com/ajcn/article/88/4/1049/4650063>
- Strawford, A., Antelo, F., Christiansen, M., Hellerstein, M. K., & Heller, M. K. (2004). Adipose tissue triglyceride turnover, de novo lipogenesis, and cell proliferation in humans measured with 2 H 2 O. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 286, 577–588. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00093.2003>.-The

- Swanson, D., Block, R., & Mousa, S. A. (2012). Omega-3 fatty acids EPA and DHA: Health benefits throughout life. In *Advances in Nutrition* (Vol. 3, Issue 1, pp. 1–7). <https://doi.org/10.3945/an.111.000893>
- Sydenham, E., Dangour, A. D., & Lim, W. S. (2012). Omega 3 fatty acid for the prevention of cognitive decline and dementia. *Sao Paulo Medical Journal*, 130(6), 419. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD005379.pub3>
- Tan, A., Sullenbarger, B., Prakash, R., & McDaniel, J. C. (2018). Supplementation with eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid reduces high levels of circulating proinflammatory cytokines in aging adults: A randomized, controlled study. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 132, 23–29. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2018.03.010>
- Urey HC, B. F. M. G. (1932). A hydrogen isotope of mass 2. *Physical Review Journals Archive*, 39(164).
- Versari, D., Daghini, E., Viridis, A., Ghiadoni, L., & Taddei, S. (2009). Endothelial dysfunction as a target for prevention of cardiovascular disease. In *Diabetes care: Vol. 32 Suppl 2*. <https://doi.org/10.2337/dc09-s330>
- Vidgren, H. M., Ågren, J. J., Schwab, U., Rissanen, T., Hänninen, O., & Uusitupa, M. I. J. (1997). Incorporation of n-3 fatty acids into plasma lipid fractions, and erythrocyte membranes and platelets during dietary supplementation with fish, fish oil, and docosahexaenoic acid-rich oil among healthy young men. *Lipids*, 32(7), 697–705. <https://doi.org/10.1007/s11745-997-0089-x>
- Wall, R., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., & Stanton, C. (2010). Fatty acids from fish: The anti-inflammatory potential of long-chain omega-3 fatty acids. In *Nutrition Reviews* (Vol. 68, Issue 5, pp. 280–289). <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2010.00287.x>
- Whelton, S. P., He, J., Whelton, P. K., & Muntner, P. (2004). Meta-Analysis of observational studies on fish intake and coronary heart disease. *American Journal of Cardiology*, 93(9), 1119–1123. <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2004.01.038>
- Wilkinson, D. J. (2018). Historical and contemporary stable isotope tracer approaches to studying mammalian protein metabolism. In *Mass Spectrometry Reviews* (Vol. 37, Issue 1, pp. 57–80). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/mas.21507>
- Xin, P., Xu, X., Deng, C., Liu, S., Wang, Y., Zhou, X., Ma, H., Wei, D., & Sun, S. (2020). The role of JAK/STAT signaling pathway and its inhibitors in diseases. In *International Immunopharmacology* (Vol. 80). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106210>
- Yehuda, S., Rabinovitz, S., Carasso, R. L., & Mostofsky, D. I. (2002). The role of polyunsaturated fatty acids in restoring the aging neuronal membrane. In *Neurobiology of Aging* (Vol. 23).

RINGRAZIAMENTI

Ringrazio prima di tutto i miei genitori, che mi hanno sostenuta in questi anni in tutte le scelte, giuste o sbagliate, che ho preso. Modigliani compreso.

In particolare, ringrazio Paolo che è ormai un anno mezzo che ha rinunciato generosamente alla sua macchina.

Ringrazio mio fratello, che è per me un esempio nonostante lui forse non lo sappia: grazie per i consigli e gli incoraggiamenti senza i quali, probabilmente, oggi non sarei qui. Ringrazio Silvia per essere la sorella che non ho, sempre pronta ad ascoltarmi e a rivolgermi una parola di conforto: sei la persona migliore che potessi desiderare al fianco di Enrico e nella nostra famiglia.

Ringrazio gli amici di ieri, di oggi e sicuramente di domani: Antonino, Blanca, Fedez e Sara. Non ci sono parole per descrivere quello che siete per me e quanto la vostra amicizia mi abbia aiutata a diventare quella che sono (una *drama queen*).

Ringrazio Fede per avermi supportata e sopportata in tutti questi anni... e sfamata. Letteralmente senza di te non ce l'avrei fatta.

Ringrazio Anna, che mi ha sempre incoraggiata e soprattutto tranquillizzata quando iniziavo a non farcela più, nonostante la calma non sia il suo forte; per questo apprezzo ancora di più l'aiuto che mi hai dato.

Ringrazio Elisa, che più di una collega si è dimostrata un'amica; mi hai sostenuta nella vita e nel lavoro, mi hai tenuto la mano, asciugato le lacrime ma anche condiviso con me tanti *gossip*, tante risate e tanti caffettain. Sei speciale.

Ringrazio inoltre Manuela, la mia Correlatrice, per l'opportunità che mi ha dato e per tutto quello che mi ha insegnato; da te ho imparato l'importanza della precisione e dell'organizzazione ma soprattutto della passione. Ringrazio il Prof. Di Marco, il mio Relatore, per la disponibilità che mi ha sempre dimostrato e l'aiuto che mi ha dato nell'affrontare questo percorso.

Ringrazio infine la Prof. Cogo ed il Prof. Carnielli per avermi fatta sentire apprezzata fin da subito e per continuare a darmi la possibilità di crescere, imparare e soprattutto la possibilità di trovare la mia strada.