



**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI
PADOVA**

DIPARTIMENTO DI PEDIATRIA SALUS PUERI

**SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN MEDICINA DELLO
SVILUPPO E SCIENZE DELLA PROGRAMMAZIONE
INDIRIZZO MALATTIE RARE
CICLO XXI**

**APPLICAZIONI BIOMEDICHE DI TECNICHE DI
SPETTROMETRIA DI MASSA A RAPPORTO
ISOTOPICO**

Direttore della scuola : Ch.mo Prof. Giuseppe Basso

Coordinatore di indirizzo : Ch.mo Prof. Giorgio Perilongo

Supervisore : Dott.ssa Paola E. Cogo

Dottorando : MANUELA SIMONATO

ANNO ACCADEMICO 2008-2009

Ai miei due angeli

INDICE

Riassunto	pag.1
Abstract	pag.3

Capitolo 1

Stima, con un metodo non invasivo, della biosintesi endogena di due acidi grassi a lunga catena, acido arachidonico e docosaesaenoico, in neonati pretermine.

- Gli isotopi stabili pag.5
- Traccianti marcati con isotopi stabili pag.6
- Tossicità degli isotopi pag.7
- Applicazioni degli isotopi stabili nella ricerca e diagnosi nell'uomo pag.7
- Abbondanza isotopica naturale di ^{13}C pag.8
- Applicazione dell'abbondanza naturale di ^{13}C nella ricerca pag.9
- Spettrometria di massa a rapporto isotopico pag.10
- Spettrometri di massa molecolari pag.13
- Vantaggi dell'IRMS rispetto agli spettrometri di massa molecolari pag.13

Capitolo 2

Stima, con un metodo non invasivo, della biosintesi endogena di due acidi grassi a lunga catena, acido arachidonico e docosaesaenoico, in neonati pretermine.

- Introduzione pag.21
- Obiettivo dello studio pag.29
- Materiali e metodi pag.31
- Risultati pag.35
- Discussione pag.41
- Bibliografia pag.45

Capitolo 3

Misura del metabolismo di SP-B e di DSPC in vivo nell'uomo usando la tecnica degli isotopi stabili

- Introduzione pag. 49
- Obiettivo pag. 59
- Materiali e metodi pag. 61
- Risultati pag. 67
- Discussione pag. 71
- Bibliografia pag. 75

RIASSUNTO

Obiettivo di questa tesi è stato l'applicazione sia di isotopi stabili ad abbondanze naturali sia di traccianti marcati con isotopi stabili (^{13}C -leucina e D_2O) per lo studio di diverse vie metaboliche, quali la sintesi, di acidi grassi, nel bambino pretermine e la sintesi proteica e lipidica nell'adulto.

Il primo studio ha visto l'utilizzo di una dieta arricchita con due acidi grassi che presentavano un'abbondanza naturalmente diversa di ^{13}C rispetto a quella degli altri acidi grassi per determinare, per un lungo periodo di tempo, la sintesi assoluta e in percentuale di questi due acidi grassi nei bambini pretermine.

Nel secondo studio abbiamo utilizzato leucina marcata con ^{13}C e acqua marcata con deuterio per determinare il metabolismo della fosfatidilcolina disatura (DSPC) e della proteina specifica B del surfattante (SP-B).

ABSTRACT

The aim of this thesis concerning the setting of new methods to study metabolic pathways in vivo using both stable isotope tracer (^{13}C -leucine and D_2O) both stable isotope at natural abundance.

First chapter reports a new method to measure absolute and percentage of AA and DHA synthesis. Preterm infants were fed with a formula enriched in AA and DHA with a higher content of ^{13}C than did the endogenously synthesized long chain fatty acids (LCP).

The second chapter reports a new method to measure SP-B synthesis in vivo in humans by means of stable isotopes. We administered a 24 h infusion of ^{13}C -Leucine as metabolic precursor of SP-B and $^2\text{H}_2\text{O}$ as precursor of dipalmitoyl phosphatidylcholine (DSPC).

INTRODUZIONE

La spettrometria di massa a rapporto isotopico (IRMS) e la spettrometria di massa molecolare (MS) sono tecniche, rispettivamente ad alta e bassa precisione, usate da decenni per l'analisi isotopica. Gli isotopi stabili possono essere usati come traccianti naturali o artificiali per seguire il metabolismo di molecole organiche in organismi viventi e in ecosistemi.

Attualmente gli isotopi stabili sono usati in campi differenti e in una molteplicità di applicazioni, in archeologia (1), in geochimica (2), in campo farmaceutico (3), nelle scienze forensi (4, 5), nel controllo antidoping (6, 7), nella chimica ambientale (8) e anche nel campo dell'arte (9). Molteplici sono le applicazioni nella ricerca in biologia e medicina, dalla determinazione del turnover di substrati quali aminoacidi, glucosio (10-12) e acidi grassi (13-17) alla misura della spesa energetica (18-20), alla composizione corporea (21) o alla più recente proteomica (22, 23).

Nella diagnostica, gli isotopi stabili sono soprattutto utilizzati, tramite il breath test, per la misura delle funzioni epatiche, gastriche, intestinali, pancreatiche e per la diagnosi di infezioni da *Helicobacter pylori* (24-26).

Gli isotopi stabili

Si definiscono isotopi di uno stesso elemento quelli che hanno uguale numero di protoni (e quindi di elettroni) ma diverso numero di neutroni, hanno quindi lo stesso numero atomico e occupano la stessa posizione nella tavola periodica degli elementi, ma un diverso numero di massa. Gli isotopi di uno stesso elemento hanno quindi proprietà chimiche simili, in ragione dello stesso numero di protoni, ma proprietà fisiche diverse, in ragione della massa differente.

La distribuzione isotopica stabile degli elementi dipende dall'origine e dall'evoluzione dei composti di cui fanno parte. Quindi due composti aventi la stessa formula possono avere differente composizione isotopica se la loro origine e/o la loro storia sono diverse, frutto di tutti i processi di frazionamento che esistono in natura e che le molecole subiscono. Questo è il principio che viene sfruttato per le misure delle abbondanze naturali in studi che spaziano dall'agronomia alla medicina.

D'altro canto le molecole possono essere volutamente marcate con isotopi stabili, in una o più posizioni, e poiché vengono minimamente discriminate nei processi metabolici, possono essere utilizzate come traccianti negli studi chimici e biologici.

Traccianti marcati con isotopi stabili

Le molecole possono essere volutamente marcate con isotopi stabili, in una o più posizioni, e poiché vengono minimamente discriminate nei processi metabolici, possono essere utilizzate come traccianti negli studi chimici e biologici.

L'introduzione di questi traccianti, siano esse molecole organiche o acqua deuterata, nell'organismo può essere eseguita per differenti vie, endovenosa piuttosto che orale, e le moderne tecniche analitiche consentono di misurare i composti indifferenziati o dopo conversione nei loro metaboliti.

La possibilità di discriminare i composti intermedi o metaboliti, in processi metabolici difficilmente seguibili dal vivo, ha reso l'uso degli isotopi stabili in medicina una interessante via di indagine.

Tra tutti gli isotopi stabili i più usati, per gli studi nell'uomo, sono quelli dell'idrogeno, del carbonio, dell'ossigeno e dell'azoto.

Nell'elenco seguente sono indicate le distribuzioni percentuali medie di questi elementi:

Elemento	Isotopi stabili	Abbondanza naturale media (%)	Valori dei rapporti standard	Standard di riferimento internazionale
Idrogeno	1H	99.985	2H/1H =	SMOW (Standard Mean Ocean Water)
	2H	0.015	0.000316	
Carbonio	12C	98.892	13C/12C =	PDB (Pee Dee Belemnite) Carbonato di calcio fossile
	13C	1.108	0.0112372	
Azoto	14N	99.6337	15N/14N =	AIR (Azoto dell'aria)
	15N	0.3663	0.007353	
Ossigeno	16O	99.7587	18O/16O =	SMOW (Standard Mean Ocean Water)
	18O	0.2039	0.0039948	
Zolfo	32S	95.02	34S/32S =	CDT (Canyon Diablo Troilite)
	34S	4.22	0.0450045	

Ci sono molti vantaggi nell'uso degli isotopi stabili in medicina. Primo tra tutti è che questi possono essere utilizzati sia in bambini che in donne in gravidanza in quanto non c'è esposizione a radiazioni, come avviene invece per gli isotopi radioattivi. Inoltre molti isotopi hanno elementi radioattivi che decadono velocemente nel tempo (es: il radioattivo dell'azoto decade in 10 minuti, quello dell'ossigeno in 124 sec) non consentendone l'utilizzo in studi metabolici di lunga durata. D'altro canto l'utilizzo di ^{14}C o ^3H porta ad un maggior effetto di discriminazione isotopica da parte delle vie metaboliche ed enzimatiche vista la differenza di massa dagli isotopi naturali ^{12}C e ^1H .

Inoltre più isotopi stabili possono essere utilizzati contemporaneamente e in dosi ripetute consentendo di studiare differenti aspetti biologici utilizzando lo stesso campione.

Tossicità degli isotopi

Dosi molto alte di deuterio hanno mostrato avere effetti tossici negli animali ma le dosi utilizzate erano molto più alte di quelle usate negli studi clinici. Infatti una quantità di D₂O pari al 10-20% dei fluidi corporei provoca alterazione delle funzioni cellulari, riduzione della sintesi proteica e della velocità delle reazioni enzimatiche e, se innalzata al 30-40%, risulta letale (27, 28). Nell'uomo le dosi usate sono molto basse e si è stabilito che la soglia massima alla quale si presentano effetti avversi è di circa 200-400 mg/Kg di peso corporeo. Negli studi clinici la quantità di deuterio usato come tracciante è notevolmente più bassa, compresa tra 1-80 mg/Kg di peso corporeo (27).

A differenza del deuterio, la differenza di massa tra ¹²C e ¹³C è piccola quindi anche la possibilità di effetti clinici causati dalla somministrazione di ¹³C è remota. Inoltre ¹³C contribuisce percentualmente all'1,1% del carbonio totale, quindi in quantità già molto elevata. Negli studi clinici, la quantità di solito impiegata come tracciante è dell'ordine di 1 mg/Kg di ¹³C (raramente supera i 25 mg/Kg).

Applicazione degli isotopi stabili nella ricerca e diagnosi nell'uomo

Sia in ambito pediatrico che nell'adulto sono state descritte varie applicazioni con gli isotopi stabili e, tra i più utilizzati, ci sono il glucosio marcato ¹³C, acidi grassi e aminoacidi marcati con ¹⁵N, acqua deuterata e doppiamente marcata (²H₂O, ²H₂¹⁸O). L'acqua corporea totale così come la spesa energetica totale possono essere determinati misurando la diluizione del tracciante nei liquidi corporei. Gli isotopi stabili possono essere molto utili nello studio di una via metabolica sconosciuta o per identificare malattie metaboliche. Prodotti come CO₂, NH₃ e H₂O possono essere facilmente esaminati, mentre metaboliti più complessi possono essere studiati nei fluidi biologici dopo che sono stati sottoposti a differenti stadi di purificazione analitica.

Il breath test ¹³CO₂ è un test facile da eseguire ed indolore per il paziente. E' stato molto utilizzato soprattutto per lo studio di problemi gastrointestinali. Numerosi processi digestivi possono essere valutati dalla comparsa nel respiro di ¹³CO₂, indicando la quantità di substrato ossidato, per es l'uso di acetato ¹³C per lo studio dello svuotamento gastrico nei neonati.

In tabella 1 sono riportati alcuni esempi di applicazioni degli isotopi stabili in pediatria e nell'adulto.

Tabella 1: Applicazioni degli isotopi stabili in pediatria.

Argomento dello studio	Tracciante	Riferimento bibliografico
<i>Infezioni</i>		
Helicobacter pylori	¹³ C-urea	(29)
<i>Funzionalità gastrointestinale</i>		
Svuotamento gastrico	¹³ C-acetato, ¹³ C-ottanoato	(30, 31)
<i>Maldigestione</i>		
Deficienza di lattasi	¹³ C-lattosio	(32)
Deficienza di lipasi	¹³ C-triottanoina, ¹³ C-trioleina, ¹³ C-acido palmitico	(33)
<i>Malassorbimento</i>		
Carboidrati	¹³ C-glucosio	(34)
Grassi	Differenti ¹³ C-trigliceridi	(33)
Aminoacidi	¹³ C- ¹⁵ N- leucina, ¹³ C-leucina	(35-37)
<i>Composizione corporea</i>		
Acqua corporea totale	D ₂ ¹⁸ O	(38)
<i>Processi sintetici</i>		
Gluconeogenesi	2,3- ¹³ C ₂ -alanina, 6,6 ² H-glucosio	(39, 40)
Albumina	¹⁵ N glicina, ¹³ C leucina	(41, 42)
Colesterolo	D ₂ O	(43)
Conversione di acidi grassi	¹³ C-acido linoleico, vari acidi grassi marcati ¹³ C (arachidonico, docosaesaenoico)	(17, 44)
<i>Metabolismo e disordini metabolici</i>		
Spesa energetica	D ₂ ¹⁸ O	(45-48)
Intolleranza al fruttosio	¹³ C-fruttosio	(49)
Fenilchetonuria	² H-fenilalanina	(50)

Da più di 10 anni il nostro gruppo si occupa di studi sulla nutrizione del neonato e sulle patologie polmonari condotti usando gli isotopi stabili (51-58).

Abbondanza isotopica naturale di ¹³C

L'analisi degli isotopi stabili riguarda la variazione del contenuto isotopico derivante da un processo di frazionamento, un processo in cui un isotopo di un elemento è discriminato, fisicamente o chimicamente, rispetto ad un altro. La marcatura isotopica naturale può dare informazioni sulle reazioni metaboliche, sulle reazioni dovute all'ambiente e sulla fonte e/o sul destino di nutrienti. Il ciclo della fotosintesi, con la

produzione di glucosio, determina una modifica isotopica per quanto riguarda il contenuto in deuterio dell'acqua, ma diventa estremamente selettivo per quanto riguarda l'anidride carbonica e quindi il rapporto $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$. La naturale variazione dell'abbondanza del ^{13}C riflette il suo passaggio attraverso sistemi biologici nei quali la trasformazione viene accompagnata da un frazionamento isotopico che porta ad un leggero arricchimento o deplezione di ^{13}C . Il frazionamento isotopico del carbonio porta ad un abbassamento del valore di ^{13}C di circa il 20 ‰ per le piante terrestri e di circa 10 ‰ per le piante acquatiche (59).

Le piante incorporano CO_2 secondo 3 meccanismi fotosintetici: le più comuni sono le piante C3 così chiamate per il nome della reazione enzimatica che, usando l'enzima ribulosio bis-fosfato carbossilasi ossigenasi, porta alla produzione dell'acido 3-fosfoglicerico, un composto contenente 3 atomi di carbonio; questo ciclo reversibile, chiamato Calvin-Benson, porta a piante con un basso contenuto in ^{13}C ($\delta^{13}\text{C}$ da -24 ‰ a -34 ‰). Le piante C3 costituiscono circa il 90% di tutte le piante ed includono la vite, il riso e la soia. Il meccanismo, chiamato ciclo Hatch-Slack per piante C4, usa l'enzima fosfoenolpiruvato carbossilasi per facilitare la fissazione della CO_2 e portare alla formazione di ossalacetato, un composto formato da 4 atomi di carbonio. Questo processo non è reversibile e porta ad una minore discriminazione verso la $^{13}\text{CO}_2$ risultando in piante C4 più arricchite in ^{13}C ($\delta^{13}\text{C}$ da -6 ‰ a -19 ‰). Esempi di piante C4 includono piante grasse delle regioni calde mais e canna da zucchero. La terza categoria di piante, chiamate del ciclo Crassulean Acid Metabolism (CAM), usa sia il percorso C3 sia quello C4 dipendentemente dall'ambiente in cui si trovano, di questa categoria fanno parte i cactus e le piante dell'ananas. (59).

Applicazione dell'abbondanza naturale di ^{13}C nella ricerca

I campi di applicazione del rapporto isotopico $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ a livelli di abbondanza naturale sono vari:

1. Medicina: infezioni batteriche (60) e studi di metabolismo in vivo (12, 17)
2. Alimentare: autenticità degli alimenti (61)
3. Doping: dosaggio steroidi nelle urine (7)
4. Ambientale: paleoclima (62)

Per quanto riguarda gli studi di metabolismo in vivo il gruppo di Demmelmair (17) ha pubblicato uno studio sulla stima della sintesi di acido arachidonico (AA) in 4 bambini pretermine usando la tecnica dell'abbondanza isotopica naturale, ai bambini oggetti dello

studio è stata somministrata una dieta, per quattro giorni, con la parte lipidica derivante esclusivamente da piante di tipo C4 (mais). Con questo studio l'autore ha stimato che circa il 34% dell'acido linoleico venga convertito nel suo metabolita endogeno, l'AA. Il lavoro presentato nel capitolo due di questa tesi prevede un'estensione di questo metodo: andremo a misurare la sintesi sia di AA che di acido docosaesaenoico (DHA) in 11 bambini pretermine nutriti, esclusivamente per 7 mesi, con una dieta arricchita di AA e DHA derivante da piante C4.

Spettrometria di massa a rapporto isotopico

Misurare variazioni isotopiche a livello di abbondanze naturali richiede uno spettrometro di massa avente sensibilità minore ma capacità di risoluzione e precisione molto più elevata rispetto agli spettrometri di massa convenzionali, lo strumento utilizzato per fare queste misurazione è lo spettrometro di massa a rapporto isotopico (IRMS). Lo spettrometro IRMS comprende tre parti fondamentali:

- Una sorgente di ioni
- Un analizzatore di massa
- Un contatore di ioni

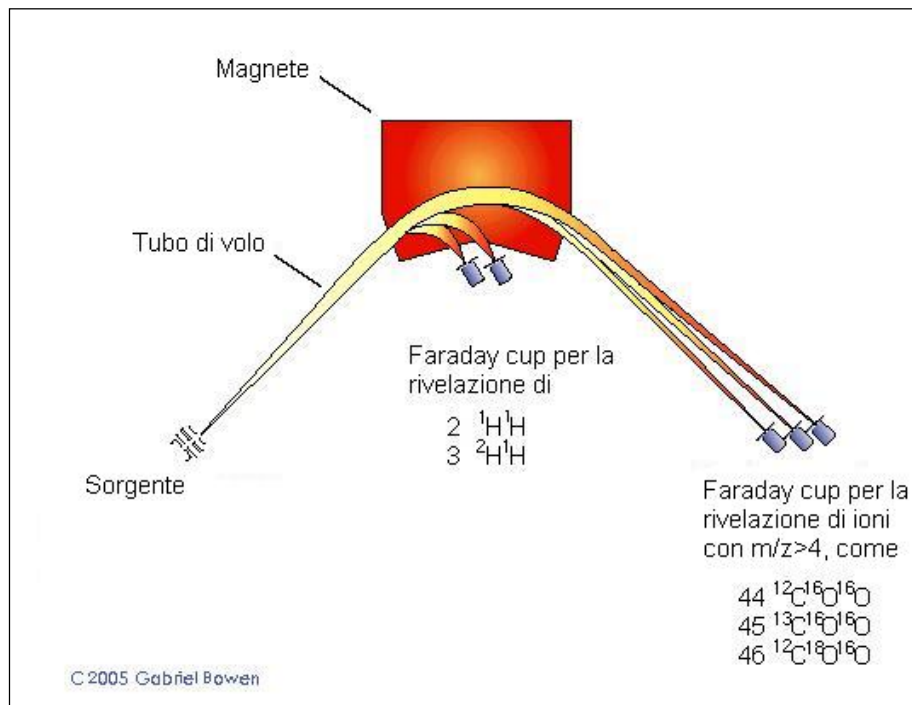


Figura 1: Schema di un IRMS

La sorgente ha lo scopo di ionizzare le molecole del campione (generalmente introdotto in forma gassosa) per interazione con un fascio di elettroni che causa la formazione di

ioni positivi dai composti del campione. Gli ioni positivi sono poi accelerati e condotti all'interno dell'analizzatore di massa, ovvero un campo elettromagnetico dove gli ioni sono separati a seconda del loro rapporto massa/carica (m/z). Infine gli ioni sono raccolti e contati da un rivelatore.

Per effettuare la misura con IRMS è necessario convertire la molecola di interesse nel campione in forma gassosa. Ci sono due sistemi per l'introduzione del campione per l'analisi IRMS, il Dual Inlet (DI-IRMS) e il Continuous Flow (CF-IRMS). Nel primo sistema il campione viene preparato per l'analisi off-line, cioè convertito in gas prima di essere iniettato nello spettrometro.

La tecnica CF prevede invece l'introduzione del campione in un flusso di elio che lo trasporta fino alla sorgente dello spettrometro. Questo sistema offre la possibilità di essere interfacciato con tecniche preparative e/o separative, quali l'elemental analyser (EA), la gascromatografia (GC) o, più recentemente, cromatografia liquida (LC). Per misurare la composizione isotopica di molecole organiche si utilizza il GC che permette di avere la separazione dei composti previa derivatizzazione opportuna del campione necessario a renderlo volatile (Figura 2).

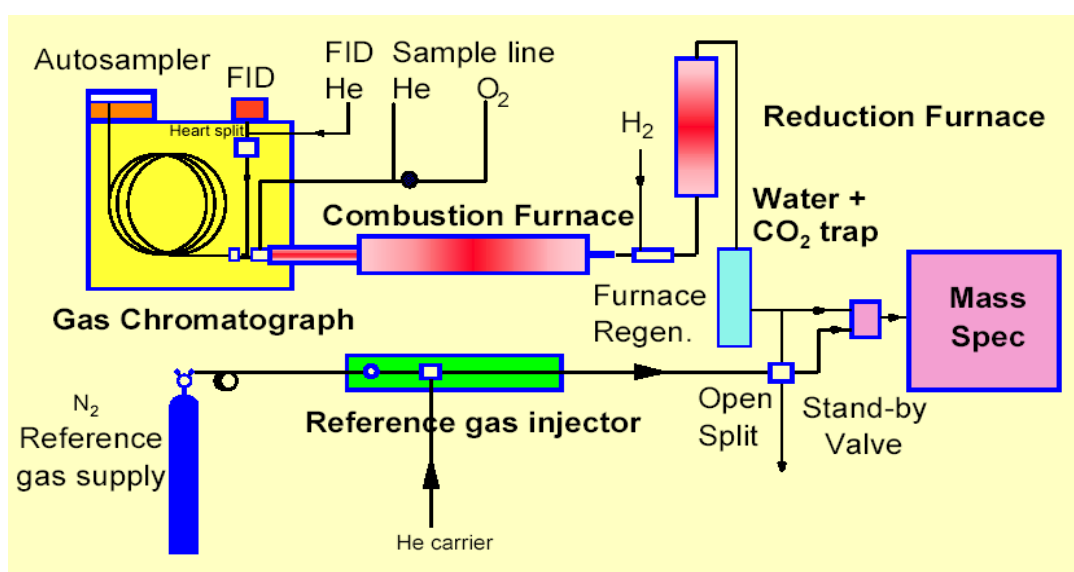


Figura 2. Schema di un GC-C-IRMS

Uno splitter all'uscita della colonna cromatografia consente al campione di arrivare al tubo di combustione o di pirolisi, per l'analisi di azoto e carbonio, idrogeno e ossigeno. Per la misura del carbonio i composti passano in un tubo di ossidazione costituito da ceramica e allumina contenente un filamento di rame, uno di platino e uno di nichel (63). L'ossidazione nella fornace avviene per reazione del rame con l'ossigeno puro a

600-650°C per formare CuO (ossido di rame). Il platino agisce poi da catalizzatore nella reazione tra nichel e ossigeno per formare NiO (ossido di nichel) a 960°C. Il forno di riduzione rimuove l'eccesso di ossigeno e riduce eventuali forme di ossido nitrico ad azoto. Dopo la combustione del composto a CO₂ e H₂O questa ultima viene rimossa usando una trappola di nafion. La parte finale dell'interfaccia è l'open split che porta il flusso di elio all'IRMS. Dalla misura contemporanea delle masse m/z 44 e m/z 45, corrispondenti rispettivamente a ¹²CO₂ e ¹³CO₂, si calcolano i rapporti isotopici.

Per misurare l'idrogeno i campioni vengono iniettati in un reattore di pirolisi che ad alta temperatura (1400°C) converte quantitativamente la molecola in H₂ o CO che vengono successivamente misurati dallo spettrometro. Dalla misura del rapporto tra massa m/z 3 relativa a ²H₂ e m/z 2 corrispondente a ¹H₂ è possibile calcolare il rapporto isotopico.

I rapporti isotopici sono usualmente espressi in termini di valori di δ (delta) che esprimono le deviazioni, in parti per mille, da un materiale di riferimento:

$$\delta X(\text{‰}) = \left(\frac{R_{\text{campione}} - R_{\text{standard}}}{R_{\text{standard}}} \right) \times 1000$$

dove R=rapporto massa isotopo pesante/massa isotopo leggero (es: ¹³C/¹²C, ²H/¹H)

δX>0 indica un arricchimento dell'isotopo pesante nel campione rispetto allo standard;

δX<0 indica un impoverimento dell'isotopo pesante o un arricchimento dell'isotopo leggero rispetto allo standard.

Per standardizzare le misure e renderle comparabili, i valori di δ vengono convertiti in atom percent excess (APE) tramite l'utilizzo di curve di calibrazione costruite con quantità crescenti di campione arricchito. In termini di ¹³C arricchimento un cambiamento dell'1(‰) è approssimativamente equivalente ad un cambiamento di 0.001 APE.

Lo strumento usato in questa tesi, un Delta XL Plus (ThermoFinnigan, Milano, Italia), è stato interfacciato al sistema di combustione (GC Combustion III) e a quello di pirolisi ad alta temperatura High Temperature Conversion, (TC) per l'analisi rispettivamente del carbonio e dell'idrogeno nelle molecole organiche. Per l'analisi del deuterio nelle urine l'IRMS è stato interfacciato con l'High Temperature Conversion Elemental Analyzer (TC/EA). Il TC-EA (ThermoFinnigan, Milano, Italia) è un analizzatore elementare che ci permette di analizzare la composizione isotopica dell'ossigeno (¹⁸O/¹⁶O) e dell'idrogeno (D/H) in campioni biologici.

Spettrometri di massa molecolari

Gli spettrometri di massa molecolari sono usati per varie applicazioni che comprendono l'analisi di molecole, o matrici, biologiche complesse (64). La maggioranza degli studi per l'analisi dell'arricchimento del ^{13}C viene fatta con MS accoppiati ad un GC, aventi una sorgente, in grado di ionizzare l'analita, operante in impatto elettronico o in ionizzazione chimica, un quadrupolo come analizzatore di masse in grado di separare gli ioni in base al loro rapporto massa/carica (m/z) e un rivelatore, di solito un dinodo, in grado di amplificare la debolissima corrente prodotta dagli ioni che hanno superato l'analizzatore.

Vantaggi dell'IRMS rispetto agli spettrometri di massa molecolari

Per la misurazione di rapporti isotopici gli spettrometri di massa a singolo quadrupolo devono operare in modalità SIM (selected ion monitoring) in modo da aumentare la sensibilità. Anche in modalità SIM la limitata accuratezza e precisione impone di avere un arricchimento minimo dei campioni di 0.5 APE (1, 65). In altre parole gli spettrometri di massa a singolo quadrupolo non permettono di ottenere informazioni accurate e precise a livelli di abbondanze naturali o in casi nei quali ci sia una bassa incorporazione del tracciante che risulti in un arricchimento <0.5 APE.

La misurazione contemporanea di due o tre forme isotopomeriche ci permette, con il GC-C-IRMS, di misurare composizioni isotopiche a bassi arricchimenti e a livelli di abbondanze naturali con un'alta accuratezza e precisione. Questo significa che piccole quantità dell'isotopo più pesante possono essere rilevate in presenza di elevate quantità dell'isotopo più leggero.

La sensibilità del GC-C-IRMS è tale da poter rilevare un rapporto tracciante su tracciato (mol/mol) al di sotto di 10^{-5} .

Obiettivo di questa tesi è stato l'applicazione sia di isotopi stabili ad abbondanze naturali sia di traccianti marcati con isotopi stabili (^{13}C -leucina e D_2O) per lo studio di diverse vie metaboliche, quali la sintesi, di acidi grassi, nel bambino pretermine e la sintesi proteica e lipidica nell'adulto.

Il primo studio ha visto l'utilizzo di una dieta arricchita con due acidi grassi che presentavano un'abbondanza naturalmente diversa di ^{13}C rispetto a quella degli altri acidi grassi per determinare, per un lungo periodo di tempo, la sintesi assoluta e in percentuale di questi due acidi grassi nei bambini pretermine.

Nel secondo studio abbiamo utilizzato leucina marcata con ^{13}C e acqua marcata con deuterio per determinare il metabolismo della fosfatidilcolina disatura (DSPC) e della proteina specifica B del surfattante (SP-B).

BIBLIOGRAFIA

1. Brand WA. High precision isotope ratio monitoring techniques in mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 1996;31(3):225-35.
2. Craig H. Isotopic standards for carbon and oxygen correction factors for mass-spectrometric analysis of carbon dioxide. *Geochim Cosmochim Acta* 1957;12:133-49.
3. Jasper JP, Westenberger BJ, Spencer JA, Buhse LF, Nasr M. Stable isotopic characterization of active pharmaceutical ingredients. *J Pharm Biomed Anal* 2004;35(1):21-30.
4. Benson S, Lennard C, Maynard P, Roux C. Forensic applications of isotope ratio mass spectrometry--a review. *Forensic Sci Int* 2006;157(1):1-22.
5. Fraser I, Meier-Augenstein W. Stable (2)H isotope analysis of modern-day human hair and nails can aid forensic human identification. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2007;21(20):3279-85.
6. Ayotte C, Levesque JF, Cle roux M, Lajeunesse A, Goudreault D, Fakirian A. Sport nutritional supplements: quality and doping controls. *Can J Appl Physiol* 2001;26 Suppl:S120-9.
7. Cawley AT, Flenker U. The application of carbon isotope ratio mass spectrometry to doping control. *J Mass Spectrom* 2008;43(7):854-64.
8. Schmidt TC, Zwank L, Elsner M, Berg M, Meckenstock RU, Haderlein SB. Compound-specific stable isotope analysis of organic contaminants in natural environments: a critical review of the state of the art, prospects, and future challenges. *Anal Bioanal Chem* 2004;378(2):283-300.
9. Fortunato G, Ritter A, Fabian D. Old Masters' lead white pigments: investigations of paintings from the 16th to the 17th century using high precision lead isotope abundance ratios. *Analyst* 2005;130(6):898-906.
10. Tissot S, Normand S, Guilluy R, Pachiaudi C, Beylot M, Laville M, et al. Use of a new gas chromatograph isotope ratio mass spectrometer to trace exogenous ¹³C labelled glucose at a very low level of enrichment in man. *Diabetologia* 1990;33(8):449-56.
11. Jandrain BJ, Pallikarakis N, Normand S, Pirnay F, Lacroix M, Mosora F, et al. Fructose utilization during exercise in men: rapid conversion of ingested fructose to circulating glucose. *J Appl Physiol* 1993;74(5):2146-54.

12. Rambal C, Pachiaudi C, Normand S, Riou JP, Louisot P, Martin A. Use of compounds naturally labeled with stable isotopes for the study of the metabolism of glycoprotein neutral sugars by gas-liquid chromatography-isotope-ratio mass spectrometry. Technical validation in the rat. *Carbohydr Res* 1992;236:29-37.
13. Stolinski M, Murphy JL, Jones AE, Jackson AA, Wootton SA. Stable-isotope method for determining the gastrointestinal handling of [1-¹³C]palmitic acid. *Lipids* 1997;32(3):337-40.
14. Guo Z, Nielsen S, Burguera B, Jensen MD. Free fatty acid turnover measured using ultralow doses of [U-¹³C]palmitate. *J Lipid Res* 1997;38(9):1888-95.
15. Croset M, Brossard N, Pachiaudi C, Normand S, Lecerf J, Chirouze V, et al. In vivo compartmental metabolism of ¹³C-docosahexaenoic acid, studied by gas chromatography-combustion isotope ratio mass spectrometry. *Lipids* 1996;31 Suppl:S109-15.
16. Brossard N, Croset M, Normand S, Pousin J, Lecerf J, Laville M, et al. Human plasma albumin transports [¹³C]docosahexaenoic acid in two lipid forms to blood cells. *J Lipid Res* 1997;38(8):1571-82.
17. Demmelmair H, von Schenck U, Behrendt E, Sauerwald T, Koletzko B. Estimation of arachidonic acid synthesis in full term neonates using natural variation of ¹³C content. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1995;21(1):31-6.
18. Hilkert AW, Douthitt CB, Schluter HJ, Brand WA. Isotope ratio monitoring gas chromatography/Mass spectrometry of D/H by high temperature conversion isotope ratio mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 1999;13(13):1226-30.
19. Levine JA. Measurement of energy expenditure. *Public Health Nutr* 2005;8(7A):1123-32.
20. Schoeller DA. Uses of stable isotopes in the assessment of nutrient status and metabolism. *Food Nutr Bull* 2002;23(3 Suppl):17-20.
21. Wells JC, Fewtrell MS. Measuring body composition. *Arch Dis Child* 2006;91(7):612-7.
22. MacCoss MJ, Matthews DE. Quantitative MS for proteomics: teaching a new dog old tricks. *Anal Chem* 2005;77(15):294A-302A.
23. Doherty MK, Whitehead C, McCormack H, Gaskell SJ, Beynon RJ. Proteome dynamics in complex organisms: using stable isotopes to monitor individual protein turnover rates. *Proteomics* 2005;5(2):522-33.

24. Amann A, Spanel P, Smith D. Breath analysis: the approach towards clinical applications. *Mini Rev Med Chem* 2007;7(2):115-29.
25. Swart GR, van den Berg JW. ¹³C breath test in gastroenterological practice. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1998;225:13-8.
26. Peeters M. Urea breath test: a diagnostic tool in the management of *Helicobacter pylori*-related gastrointestinal diseases. *Acta Gastroenterol Belg* 1998;61(3):332-5.
27. Koletzko B, Demmelmaier H, Hartl W, Kindermann A, Koletzko S, Sauerwald T, et al. The use of stable isotope techniques for nutritional and metabolic research in paediatrics. *Early Hum Dev* 1998;53 Suppl:S77-97.
28. Jones PJ, Leatherdale ST. Stable isotopes in clinical research: safety reaffirmed. *Clin Sci (Lond)* 1991;80(4):277-80.
29. Koletzko S, Haisch M, Seeboth I, Braden B, Hengels K, Koletzko B, et al. Isotope-selective non-dispersive infrared spectrometry for detection of *Helicobacter pylori* infection with ¹³C-urea breath test. *Lancet* 1995;345(8955):961-2.
30. Pozler O, Neumann D, Vorisek V, Bukac J, Bures J, Kokstein Z. Development of gastric emptying in premature infants. Use of the (¹³)C-octanoic acid breath test. *Nutrition* 2003;19(7-8):593-6.
31. Barbosa L, Vera H, Moran S, Del Prado M, Lopez-Alarcon M. Reproducibility and reliability of the ¹³C-acetate breath test to measure gastric emptying of liquid meal in infants. *Nutrition* 2005;21(3):289-94.
32. Hiele M, Ghoois Y, Rutgeerts P, Vantrappen G, Carchon H, Eggermont E. ¹³CO₂ breath test using naturally ¹³C-enriched lactose for detection of lactase deficiency in patients with gastrointestinal symptoms. *J Lab Clin Med* 1988;112(2):193-200.
33. Watkins JB, Klein PD, Schoeller DA, Kirschner BS, Park R, Perman JA. Diagnosis and differentiation of fat malabsorption in children using ¹³C-labeled lipids: trioctanoin, triolein, and palmitic acid breath tests. *Gastroenterology* 1982;82(5 Pt 1):911-7.
34. Lifschitz CH, Boutton TW, Carrazza F, Beyreiss K, Schmitz J, Ricour C, et al. A carbon-13 breath test to characterize glucose absorption and utilization in children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1988;7(6):842-7.
35. Cortiella J, Matthews DE, Hoerr RA, Bier DM, Young VR. Leucine kinetics at graded intakes in young men: quantitative fate of dietary leucine. *Am J Clin Nutr* 1988;48(4):998-1009.

36. de Benoist B, Abdulrazzak Y, Brooke OG, Halliday D, Millward DJ. The measurement of whole body protein turnover in the preterm infant with intragastric infusion of L-[1-¹³C]leucine and sampling of the urinary leucine pool. *Clin Sci (Lond)* 1984;66(2):155-64.
37. Balagopal P, Ford G, Ebenstein D, Nadeau D, Nair K. Mass spectrometric methods for determination of ¹³C-Leucine enrichment in human muscle protein. *Anal Biochem* 1996;239:77-85.
38. Trowbridge FL, Graham GG, Wong WW, Mellits ED, Rabold JD, Lee LS, et al. Body water measurements in premature and older infants using H₂¹⁸O isotopic determinations. *Pediatr Res* 1984;18(6):524-7.
39. Bier DM, Leake RD, Haymond MW, Arnold KJ, Gruenke LD, Sperling MA, et al. Measurement of "true" glucose production rates in infancy and childhood with 6,6-dideuteroglucose. *Diabetes* 1977;26(11):1016-23.
40. Frazer TE, Karl IE, Hillman LS, Bier DM. Direct measurement of gluconeogenesis from [2,3-¹³C]alanine in the human neonate. *Am J Physiol* 1981;240(6):E615-21.
41. Yudkoff M, Nissim I, McNellis W, Polin R. Albumin synthesis in premature infants: determination of turnover with [15N]glycine. *Pediatr Res* 1987;21(1):49-53.
42. Jacobs R, Demmelmair H, Rittler P, Kellermann J, Koletzko B, Krick M, et al. Isolation of plasma albumin by ethanol extraction is inappropriate for isotope ratio measurements during the acute phase response. *Journal of Chromatography B* 2005;817:145-51.
43. Biolo G, Agostini F, Simunic B, Sturma M, Torelli L, Preiser J, et al. Positive energy balance is associated with accelerated muscle atrophy and increased erythrocyte glutathione turnover during 5 wk of bed rest. *Am J Clin Nutr* 2008;88:950-8.
44. Koletzko B, Demmelmair H, Socha P. Nutritional support of infants and children: supply and metabolism of lipids. *Baillieres Clin Gastroenterol* 1998;12(4):671-96.
45. Jones PJ, Winthrop AL, Schoeller DA, Swyer PR, Smith J, Filler RM, et al. Validation of doubly labeled water for assessing energy expenditure in infants. *Pediatr Res* 1987;21(3):242-6.
46. Schoeller D, Hnilicka J. Reliability of the doubly labelled water method for the measurement of total daily energy expenditure in free-living subjects. *Journal of nutrition* 1996;126:348S-54S.

47. Roberts SB, Coward WA, Schlingenseipen KH, Nohria V, Lucas A. Comparison of the doubly labeled water ($2\text{H}_2(18)\text{O}$) method with indirect calorimetry and a nutrient-balance study for simultaneous determination of energy expenditure, water intake, and metabolizable energy intake in preterm infants. *Am J Clin Nutr* 1986;44(3):315-22.
48. Lucas A, Ewing G, Roberts SB, Coward WA. How much energy does the breast fed infant consume and expend? *Br Med J (Clin Res Ed)* 1987;295(6590):75-7.
49. Gopher A, Vaisman N, Mandel H, Lapidot A. Determination of fructose metabolic pathways in normal and fructose-intolerant children: a ^{13}C NMR study using $[\text{U-}^{13}\text{C}]$ fructose. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87(14):5449-53.
50. Matalon R, Matthews DE, Michals K, Bier D. The use of deuterated phenylalanine for the in vivo assay of phenylalanine hydroxylase activity in children. *J Inher Metab Dis* 1982;5(1):17-9.
51. Carnielli VP, Sulkers EJ, Moretti C, Wattimena JL, van Goudoever JB, Degenhart HJ, et al. Conversion of octanoic acid into long-chain saturated fatty acids in premature infants fed a formula containing medium-chain triglycerides. *Metabolism* 1994;43(10):1287-92.
52. Cogo PE, Carnielli VP, Bunt JE, Badon T, Giordano G, Zacchello F, et al. Endogenous surfactant metabolism in critically ill infants measured with stable isotope labeled fatty acids. *Pediatr Res* 1999;45(2):242-6.
53. Cogo PE, Zimmermann LJ, Rosso F, Tormena F, Gamba P, Verlato G, et al. Surfactant synthesis and kinetics in infants with congenital diaphragmatic hernia. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;166(2):154-8.
54. Cogo PE, Zimmermann LJ, Meneghini L, Mainini N, Bordignon L, Suma V, et al. Pulmonary surfactant disaturated-phosphatidylcholine (DSPC) turnover and pool size in newborn infants with congenital diaphragmatic hernia (CDH). *Pediatr Res* 2003;54(5):653-8.
55. Cogo PE, Zimmermann LJ, Pesavento R, Sacchetto E, Burighel A, Rosso F, et al. Surfactant kinetics in preterm infants on mechanical ventilation who did and did not develop bronchopulmonary dysplasia. *Crit Care Med* 2003;31(5):1532-8.
56. Cogo PE, Zimmermann LJ, Verlato G, Midrio P, Gucciardi A, Ori C, et al. A dual stable isotope tracer method for the measurement of surfactant disaturated-phosphatidylcholine net synthesis in infants with congenital diaphragmatic hernia. *Pediatr Res* 2004;56(2):184-90.

57. Cogo PE, Toffolo GM, Ori C, Vianello A, Chierici M, Gucciardi A, et al. Surfactant disaturated-phosphatidylcholine kinetics in acute respiratory distress syndrome by stable isotopes and a two compartment model. *Respir Res* 2007;8:13.
58. Cogo PE, Simonato M, Mariatoffolo G, Stefanutti G, Chierici M, Cobelli C, et al. Dexamethasone therapy in preterm infants developing bronchopulmonary dysplasia: effect on pulmonary surfactant disaturated-phosphatidylcholine kinetics. *Pediatr Res* 2008;63(4):433-7.
59. Smith BN, Epstein S. Two Categories of C/C Ratios for Higher Plants. *Plant Physiol* 1971;47(3):380-4.
60. Savarino V, Mela GS, Zentilin P, Bisso G, Pivari M, Mansi C, et al. Comparison of isotope ratio mass spectrometry and nondispersive isotope-selective infrared spectroscopy for ¹³C-urea breath test. *Am J Gastroenterol* 1999;94(5):1203-8.
61. Martin C, Zhang B, Naulet N, Martin M. *J Am Chem Soc* 1986;108:5116-22.
62. Bukata AR, Kyser TK. Carbon and nitrogen isotope variations in tree-rings as records of perturbations in regional carbon and nitrogen cycles. *Environ Sci Technol* 2007;41(4):1331-8.
63. Merritt DA, Freeman KH, Ricci MP, Studley SA, Hayes JM. Performance and optimization of a combustion interface for isotope ratio monitoring gas chromatography/mass spectrometry. *Anal Chem* 1995;67(14):2461-73.
64. Hopfgartner G, Bourgogne E. Quantitative high-throughput analysis of drugs in biological matrices by mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev* 2003;22:195-214.
65. Preston T, Slater C. Mass spectrometric analysis of stable-isotope-labelled amino acid tracers. *Proc Nutr Soc* 1994;53(2):363-72.

CAPITOLO 2

STIMA, CON UN METODO NON INVASIVO, DELLA BIOSINTESI ENDOGENA DI DUE ACIDI GRASSI A LUNGA CATENA, ACIDO ARACHIDONICO E DOCOSAESAENOICO, IN NEONATI PRETERMINE.

Gli acidi grassi poliinsaturi (PUFA) sono acidi grassi con almeno 18 atomi di carbonio e una o più insaturazioni. A seconda della distanza, del primo doppio legame, dal metile terminale del primo acido grasso i PUFA possono essere classificati in due serie: la serie n-3 e la serie n-6.

Nelle diete europee l'acido linoleico (LA) (n-6) è il principale PUFA seguito poi dall'acido α -linoleico (ALA) n-3. Questi due acidi grassi non possono essere sintetizzati dai mammiferi e sono quindi chiamati acidi grassi essenziali. Gli acidi grassi LA e ALA, una volta entrati nel compartimento cellulare, possono essere trasformati, a livello microsomiale, in acidi grassi poliinsaturi a lunga catena (LCP), gli LCP per definizione hanno più di 20 atomi di carbonio e tre o più insaturazioni. Il più importante LCP della serie n-6 è l'acido arachidonico (AA), mentre l'acido eicosapentanoico (EPA) e l'acido docosaesaenoico (DHA) sono i principali LCP della serie n-3.

Gli acidi grassi LCP, assunti con la dieta, sono presenti in alte concentrazioni nella carne e negli oli vegetali (AA) e nel pesce (EPA e DHA) e sono mattoni importanti nella costituzione delle strutture lipidiche (1). La loro localizzazione li vede incorporati nelle strutture fosfolipidiche delle membrane cellulari dove assicurano, in particolare EPA e DHA, il giusto grado di fluidità, permeabilità e modulazione.

Sintesi di AA e DHA

La conversione di LA a AA e di ALA a EPA e DHA avviene principalmente nella milza a livello del reticolo endoplasmatico e coinvolge una serie di enzimi di allungamento, che sequenzialmente aggiungono una unità di 2 atomi di carbonio allo scheletro dell'acido grasso, ed enzimi di desaturazione che inseriscono un doppio legame nella molecola.

LA (18:2n-6) viene convertito in acido γ -linoleico (18:3n-6) per poi formare l'AA (20:4n-6). L'AA viene poi ulteriormente metabolizzato ad acido docosapentaenoico (22:5n-6) o ad eicosanoidi.

ALA (18:3n-3) viene convertito ad acido stearidonico (18:4n3) e ad acido eicosatetraenoico (20:4n-3) fino ad arrivare all'EPA (20:5n-3). L'EPA viene poi

metabolizzato a DHA (22:6n-3) oppure ad eicosanoidi. La conversione di ALA e DHA richiede una traslocazione ai perossisomi dove avviene una reazione di β -ossidazione. Gli enzimi coinvolti nella sintesi del DHA sono responsabili anche della conversione di LA a AA.

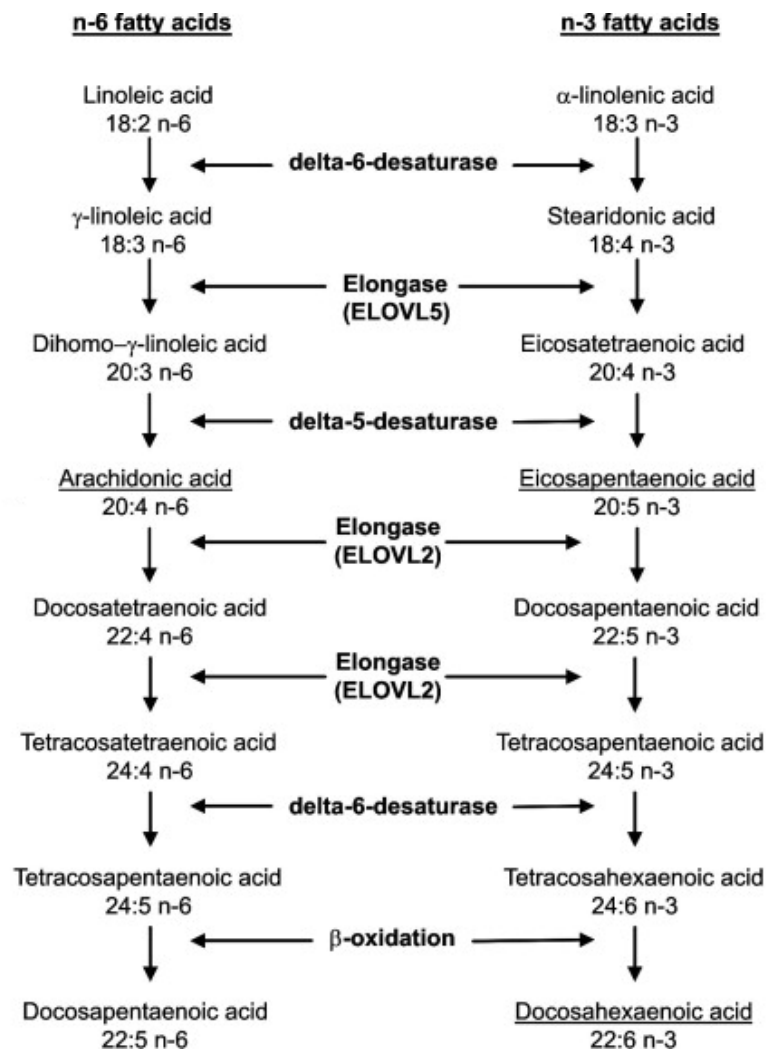


Figura 1 Metabolismo degli acidi grassi delle serie n-3 e n-6

Sono stati fatti numerosi studi per vedere la conversione di ALA a EPA e DHA usando gli isotopi stabili come traccianti (ALA uniformemente marcato ^{13}C o ^2H) (2, 3).

Questi studi hanno dimostrato che il 15-35% dell'ALA introdotto con la dieta viene rapidamente catabolizzato ad anidride carbonica per produrre energia (4-7) e che, solo l'1%, viene convertito in DHA (8, 9).

ALA mostra il più alto grado di ossidazione rispetto a tutti gli altri acidi grassi (10). Negli uomini la conversione di ALA ad EPA varia tra lo 0.3% e l'8%, mentre la conversione di ALA a DHA è inferiore al 4% (11, 12).

Nelle donne la conversione è più efficiente, circa il 21% dell'ALA è convertito ad EPA e più del 9% è convertito a DHA (5).

Studi fatti con isotopi stabili (^{13}C -LA e ^{13}C -ALA) hanno dimostrato che anche i bambini prematuri, ad un mese di vita, sono in grado di sintetizzare AA e DHA a partire dai loro precursori e che il $6\% \pm 2$ e il $14\% \pm 4$ della dose di ^{13}C -LA e ^{13}C -ALA veniva convertita, rispettivamente, in AA e DHA.

Importanza di AA e DHA

ARA e DHA sono importanti componenti strutturali delle membrane fosfolipidiche altamente specializzate presenti nel sistema nervoso centrale (13, 14).

DHA è il principale acido grasso della serie n-3 presente nelle membrane di tutti gli organi, è però particolarmente abbondante nel cervello e nella retina. A livello della retina DHA è il principale LCP presente nei segmenti terminali dei coni e dei bastoncelli dove costituisce circa il 50% degli acidi grassi della fosfatidiletanolamina (PE) e della fosfatidilserina (PS) e circa l'80% di tutti gli LCP (13). Queste membrane sono specializzate per la trasmissione rapida degli impulsi luminosi e contengono il 90-95% di lipidi esterificati come fosfolipidi (PL). Questi PL sono particolari in quanto contengono PE, PS e fosfatidilcolina (PC) nei quali il DHA rappresenta entrambi gli acidi grassi. A livello della retina il DHA regola le funzioni della rodopsina, il fotopigmento proteico deputato alla visione anche in condizioni di bassa luminosità.

I PL della materia grigia cerebrale contengono alte quantità di DHA sotto forma di PE e PS e di AA come PI. DHA è presente a livello cerebrale negli aminofosfolipidi delle membrane cellulari dei neuroni, nelle membrane plasmatiche dei sinaptosomi e delle vescicole sinaptiche, dove svolge un ruolo preferenziale nella mediazione delle attività biochimiche che consentono la neurotrasmissione. Le cellule gliali provvedono alla sintesi di DHA che viene rilasciato nello spazio extra-cellulare e quindi accumulato nelle cellule neuronali.

AA è presente nei PL di membrana, in particolare nel PI, di tutto il corpo; è essenziale per la crescita (15) ed è importante in quanto, liberato dai fosfolipidi di membrana, è il precursore degli eicosanoidi della serie 2 (prostaglandine e trombossani) e dei leucotrieni della serie 4, ha quindi un complessivo effetto pro-infiammatorio (Tabella 1). Sebbene i derivati dell'AA abbiano una azione pro-infiammatoria, studi recenti hanno dimostrato

che le lipoxine, derivate dall'AA, sono invece eicosanoidi endogeni antinfiammatori. Le lipoxine (LXA4 e LXB4) sono prodotte in vari tessuti e generate dall'interazione cellula-cellula). Esse agiscono da un lato inibendo la chemiotassi, l'aderenza e la migrazione dei neutrofili ed il danno leucocito-mediato, e dall'altro favorendo la soppressione dei neutrofili e dell'IL-8 (16). Nei pazienti con fibrosi cistica è stato evidenziato come nel lavaggio bronco alveolare (BAL) vi sia una diminuzione di lipoxine e studi clinici hanno dimostrato che la somministrazione di analoghi delle lipoxine sopprimono l'infiammazione neutrofila, riducono la carica batterica ed attenuano la severità della malattia (17). Sempre a livello polmonare le LXA4 hanno i recettori cysLT1 in comune con i leucotrieni responsabili dell'asma, dell'edema, della ipersecrezione mucosa e della infiammazione eosinofila. Il legame delle LXA4 con il recettore blocca l'azione del leucotriene per cui inibisce la broncostruzione (18)

EPA ha effetti anti-infiammatori (Tabella 1) in quanto porta alla produzione di eicosanoidi della serie 3 (prostaglandine e trombossani) e ai leucotrieni della serie 5 (19, 20). Sono state evidenziate recentemente due molecole derivate dal DHA che sono i docosatrieni e le 17S risolvine. Sono presenti nel cervello del topo, nelle cellule gliali umane e nelle cellule ematiche. Hanno un'azione antinfiammatoria ed immunoregolatrice, per regolazione della migrazione dei neutrofili ed espressione delle citochine, nonché neuroprotettiva; per tale motivo sono definite anche neuroprotectine (21).

Gli acidi grassi delle serie n-3 e n-6 agiscono anche sulle vie metaboliche, quest'azione coinvolge 3 meccanismi generali: gli acidi grassi dei PL delle membrane ne influenzano la fluidità e questa può, a sua volta, avere effetto sulle proteine associate alla membrana, sui recettori, sui sistemi di trasporto e sui canali ionici; i PL di membrana e i loro acidi grassi n-3 e n-6 fungono, come visto sopra, da precursori degli eicosanoidi e, alla fine, hanno un effetto rapido e diretto sull'espressione genica attraverso meccanismi dipendenti dal recettore attivo della proliferazione dei perossisomi (PPAR) (22-24).

Attivatori di PPAR, quali LCP e eicosanoidi, controllano diversi geni correlati al metabolismo lipidico come l'ABCA1 e l'ABCG1 (25).

di vita, influenza sia la presenza di cellule specifiche nel sangue periferico sia la loro abilità nel produrre citochine in seguito ad un insulto esterno (32).

AA e DHA nel neonato pretermine

La differenza, nell'introduzione con la dieta di AA e DHA, in bambini pretermine nutriti con latte materno o con formule per l'infanzia (33) e il loro ruolo importante nelle funzioni visive e nervose, ha focalizzato l'attenzione sul bisogno di chiarire la capacità dei bambini di sintetizzare AA e DHA a partire dai loro precursori (LA e ALA).

L'accumulo di AA e DHA si verifica in massimo grado durante l'ultimo trimestre di vita intrauterina ed è quindi il prematuro ad essere più esposto alla carenza di questi componenti nutrizionali (34). Se da una parte i neonati pretermine sono potenzialmente in grado di convertire ALA e LA nei rispettivi LCP, come è stato dimostrato in studi condotti con isotopi stabili (35), dall'altra l'efficacia di questa sintesi endogena è molto bassa. Per tali motivi, sia il feto che il neonato, nei primi mesi di vita extrauterina sono totalmente dipendenti dal trasferimento materno di DHA mediato prima dalla placenta e poi dall'allattamento al seno.

Con questo lavoro noi presentiamo un nuovo approccio per misurare la sintesi di AA e di DHA in bambini pretermine usando la tecnica dell'abbondanza isotopica naturale (36, 37). Il metodo si basa sulla misura della variazione naturale del contenuto di ^{13}C di alcuni nutrienti.

Le piante incorporano CO_2 secondo tre meccanismi fotosintetici:

il ciclo di Calvin o C3 (es. vite e barbabietola)

il ciclo di Hatch-Slack o C4 (es. canna e mais)

il ciclo noto come Crassulean Acid Methabolism o CAM, meno comune

Il meccanismo C3 provoca un frazionamento del carbonio molto più elevato rispetto agli altri due meccanismi. Gli isotopi più pesanti, in questo caso il ^{13}C , sono cineticamente meno favoriti e quindi più lenti a reagire. Piante C3 hanno quindi un minor rapporto $^{13}\text{C}:^{12}\text{C}$ rispetto alle piante C4.

Un'attenta selezione della fonte dei nutrienti crea un'opportunità unica per realizzare studi metabolici. In Europa la maggior parte del cibo consumato deriva da piante C3, questo fa sì che l'arricchimento in ^{13}C nelle persone sia simile a quello della loro dieta; quindi aggiungendo alla dieta prodotti derivanti da piante C4 questi possono fungere da traccianti naturali, i cambiamenti dell'arricchimento isotopico possono poi essere misurati nel plasma con tecniche di spettrometria di massa a rapporto isotopico ad alta

precisione. Con questo approccio è stato già possibile valutare il contributo della dieta nella sintesi del glucosio e dei lipidi (36, 37).

Con questo studio noi proponiamo un'estensione di questo approccio che ci permette di misurare, in bambini pretermine e per un periodo di 7 mesi il contributo, alla sintesi di AA e DHA, sia della dieta sia della sintesi endogena.

OBIETTIVO DELLO STUDIO

Quantificare la sintesi di AA e DHA in bambini pretermine nutriti con una formula supplementata con LCP.

MATERIALI E METODI

Pazienti

Questo studio fa parte di un trial clinico randomizzato condotto all'ospedale pediatrico Sofia (Rotterdam, Olanda) dal 1992 al 1995. Sono stati arruolati bambini pretermine la cui madre aveva deciso, o non era in grado, di non allattarli. I bambini sono stati randomizzati a ricevere 2 formule identiche nella composizione di acidi grassi e che differivano solamente per la presenza di AA e DHA (38).

In tabella 2 le caratteristiche dei pazienti studiati.

I neonati sono stati nutriti, durante i 7 mesi dello studio, esclusivamente con le due formule la cui composizione è mostrata in tabella 3.

Il progetto dello studio è stato approvato dal Comitato Etico locale e il consenso informato è stato ottenuto per tutti i pazienti studiati.

Disegno dello studio

Le due formule sono state prodotte in esclusiva per questo studio dalla Nutricia (Zoetermeer, Olanda) e sono identiche ad eccetto per l'aggiunta di LCP (AA, DHA) nella formula supplementata (LCP formula). La miscela lipidica aggiunta alla formula LCP e contenente AA e DHA derivava esclusivamente da due oli, DHASCO e ARASCO, prodotti rispettivamente da un'alga marina e da un fungo (Martek Biosciences Corporation, Columbia).

Dati sulla composizione delle formule, e sull'assorbimento intestinale degli acidi grassi sono stati riportati su uno studio precedente pubblicato dal nostro gruppo di ricerca (38).

Tabella 2

Caratteristiche cliniche dei bambini studiati. I dati sono presentati come media±deviazione standard

Caratteristiche	Gruppo no-LCP n=11	Gruppo LCP n=11	p
Sesso (M/F)	4/7	6/5	
Peso alla nascita (kg)	1.16± 0.27	1.15± 0.36	p=0.48
Età gestazionale (wks)	31± 2	31± 2	p=0.92
Peso a 7 mesi (kg)	6.7± 0.3	6.7± 0.5	p=0.75

LCPs, acidi grassi polinsaturi a lunga catena; no-LCP, senza aggiunta di LCPs; LCP con aggiunta di LCPs. Dati paragonati con t-test

Tabella 3. Composizione della formula¹e $\delta^{13}\text{C}$ (‰) _{ped} di alcuni acidi grassi delle due formule. I valori di delta sono espressi come media \pm SD

	no-LCP (n=11)	LCP (n=11)	$\delta^{13}\text{C}$ no-LCP	$\delta^{13}\text{C}$ LCP
Calorie (Kcal/L)	800	800		
Proteine (g/L)	22	22		
Carboidrati (g/L)	80	80		
Lattosio (g/L)	40	40		
Dextrine maltose (g/L)	40	40		
Grasso (g/L)	44	44		
Acidi Grassi (% by wt)				
8:0	2.29	2.20		
10:0	1.92	1.88		
12:0	14.08	14.34		
14:0	6.72	6.47		
16:0	9.33	8.65	-27.6 \pm 0.1	-27.5 \pm 0.2
18:0	4.35	4.48	-29.9 \pm 0.04	-29.9 \pm 0.04
20:0	0.27	0.29		
16:1n-7	0.21	0.17		
18:1n-9	43.15	42.49	-30.1 \pm 0.1	-29.6 \pm 0.2
18:1n-7	0.63	0.63		
18:2n-6 (LLA)	14.14	14.05	-29.9 \pm 0.4	-29.6 \pm 0.1
20:4n-6 (ARA)	0	0.84	n.d.	-16.8 \pm 0.01
18:3n-3 (LNA)	1.23	1.21	-30.3 \pm 0.3	-29.8 \pm 0.1
20:5n-3	0	0		
22:6n-3 (DHA)	0	0.64	n.d.	-17.3 \pm 0.3
Total n-6 LCPs ¹	0	0.97		
Total n-3 LCPs ¹	0	0.64		

¹LCPs, acidi grassi polinsaturi a lunga catena; no-LCP gruppo di bambini nutriti con la formula senza LCP; LCP, gruppo di bambini nutriti con formula supplementata con LCPs.

Sono stati raccolti prelievi di sangue (500ul), in tubi con EDTA, dalla madre, dalla vena ombelicale al momento del parto (o entro 30 minuti) e dal bambino a 1, 3 e 7 mesi di vita.

Il sangue è stato immediatamente centrifugato per 10 minuti a 1300g e il plasma conservato in provette contenenti pirogallolo come antiossidante e mantenuto a -20°C fino all'analisi.

Determinazione quantitativa e isotopica degli acidi grassi nel plasma

Dai campioni di plasma sono stati isolati i trigliceridi e i fosfolipidi.

Per l'analisi delle classi lipidiche plasmatiche 200ul di plasma sono stati estratti secondo il metodo descritto da Folch (39) dopo l'aggiunta dello standard interno per ogni classe lipidica contenente sia l'acido nonanoico sia l'acido eptadecanoico.

Gli estratti sono stati portati a secco sotto flusso di azoto a 37°C. I lipidi sono stati dissolti in una soluzione di cloroformio/metanolo (2:1, v/v) e seminati in una lastra da TLC di gel di silice (20x20). La lastra da TLC è stata sviluppata con eptano/diisopropilene/acido acetico (60:40:3, v/v/v). Dopo essere state asciugate in flusso di azoto, le classi lipidiche sono state visualizzate spruzzando la lastra con soluzione etanolica di 1,2 diclorofluoresceina al 10% e visualizzate con lampada UV. Le macchie corrispondenti alle diverse classi lipidiche, identificate per comparazione con standard, sono state grattate e sottoposte a metilazione con HCl/MeOH.

Gli esteri metilici sono stati estratti con esano, 1ul dell'estratto è stato iniettato in gascromatografo (HP-5890, Amstelveen, Olanda) in iniettore operante in modalità splitless (280°C), dopo separazione in colonna Omegawax, 30mx0.25mmx0.25um (Supelco, Milano, Italy), utilizzando elio come carrier.

Arricchimento ¹³C degli acidi grassi degli acidi grassi plasmatici

L'arricchimento di ¹³C dei esteri metilici degli acidi grassi della formula e dei fosfolipidi plasmatici è stato determinato con uno spettrometro di massa a rapporto isotopico Delta Xplus IRMS (Thermo Electron Corporation, Germany) collegato ad un gascromatografo HP 6890 (Hewlett Packard, Milano, Italia) e all'interfaccia GC Combustion III che, grazie ad un forno di ossidazione posto a 960°C, è in grado di convertire gli esteri metilici, precedentemente separati in colonna gascromatografica, in CO₂. Dalla misura contemporanea delle massa m/z 44 e m/z 45 corrispondenti rispettivamente a ¹²CO₂ e ¹³CO₂ è possibile misurare il δ¹³C corretto per Pee Dee Belemnite (PDB) carbonato (40).

La seguente formula è stata usata per calcolare il δ¹³C

$$\delta^{13}=[(R_x-R_s)-1] \times 1000$$

R_x = rapporto isotopico del campione

R_s = rapporto isotopico dello standard di riferimento

Lo standard di riferimento per il ^{13}C è il PDB con $^{13}\text{C}:^{12}\text{C}$ di 0.0112372

Tutti i campioni sono stati analizzati in duplicato o in triplicato.

La percentuale di sintesi endogena è stata calcolata usando la seguente formula:

$$\% \text{ endogenous synthesis} = 100 - \left[\left(\frac{A - C}{A - B} \right) * 100 \right]$$

A = $\delta^{13}\text{C}$ degli acidi grassi essenziali (LA o ALA)

B = $\delta^{13}\text{C}$ degli acidi LCP (AA o DHA) presenti nella dieta

C = $\delta^{13}\text{C}$ degli acidi LCP (AA o DHA) presenti nei fosfolipidi plasmatici

La sintesi assoluta di AA e DHA (espressa in mg/Kg/d) è stata calcolata usando la seguente formula:

$$\text{mg synthesis} = (D \times E \times F) / 10000$$

D = quantità giornaliera di AA e DHA introdotta con la dieta (in mg/Kg/d)

E = coefficiente di assorbimento intestinale (in %)

F = sintesi endogena

Analisi statistica

I dati sono espressi come medie e deviazione standard.

Le caratteristiche cliniche dei due gruppi e le composizioni delle due formule sono state paragonate con il test T di Student per dati appaiati.

La quantità degli acidi grassi plasmatici, l'arricchimento isotopico, la percentuale e la sintesi assoluta di AA e DHA sono state paragonate usando l'ANOVA a una o due vie.

Per l'analisi post-hoc è stato usato il Bonferroni.

Per i calcoli e l'analisi statistica sono stati utilizzati Microsoft Excel 2000 (microsoft Corp, Redmond, WA) e SPSS (versione 13.0; SPSS Inc, Chicago, IL).

RISULTATI

Caratteristiche della formula

La composizione in acidi grassi della formula è riportata in tabella 1. Nella formula no-LCP AA e DHA non sono rilevabili, nella formula LCP sono rispettivamente lo 0.84% e lo 0.64% in peso degli acidi grassi totali.

Eccetto AA e DHA non sono state rivelate differenze significative nell'arricchimento isotopico ^{13}C degli acidi grassi delle due formule. Questa informazione ci conferma che le due formule sono identiche ad eccezione per l'aggiunta, nella formula LCP, di DHASCO e ARASCO.

L'arricchimento in ^{13}C di LA e ALA era simile mentre era significativamente diverso dall'arricchimento di AA e DHA (per entrambi $p < 0.01$). L'arricchimento di AA non era significativamente diverso da quello di DHA ($p = 0.12$).

Caratteristiche cliniche dei bambini

Le caratteristiche cliniche dei bambini partecipanti allo studio sono riportate nella tabella 2. Non ci sono differenze tra i gruppi né alla nascita né durante lo studio. Tutti i bambini sono stati nutriti esclusivamente con le formule preparate per lo studio, nessun altro nutriente è stato introdotto durante lo studio, questo è stato verificato dai medici ad ogni visita di follow-up. Tutti i bambini hanno avuto, durante i 7 mesi dello studio, una crescita normale e non è stata notata nessuna differenza tra i due gruppi.

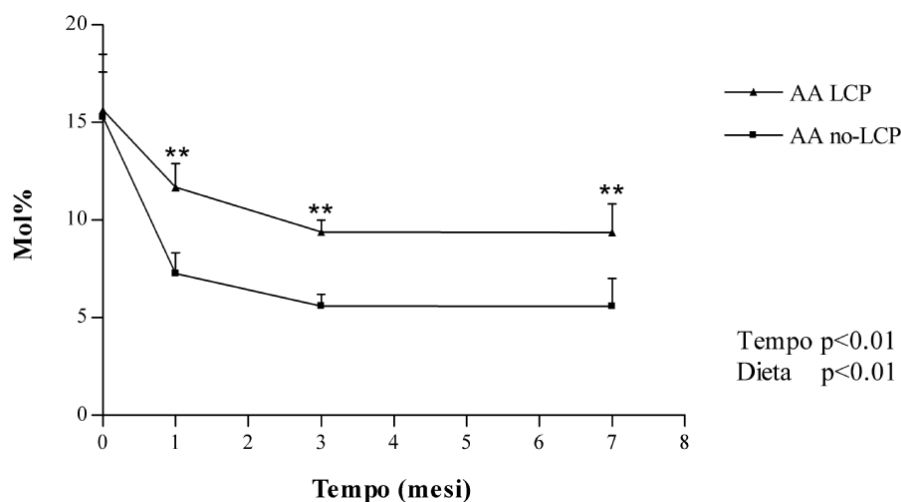
Effetto della dieta sulla composizione in acidi grassi dei fosfolipidi plasmatici

Nella figura 2 sono riportati (in mol%) la percentuale di AA e di DHA nei fosfolipidi plasmatici dei bambini dalla nascita a 7 mesi. In entrambi i gruppi AA diminuisce significativamente dalla nascita ai 7 mesi: da 15.3 ± 3.2 mol% a 5.6 ± 1.4 mol% nel gruppo no-LCP e da 15.6 ± 1.9 mol% a 9.4 ± 1.5 nel gruppo LCP (per entrambi $p < 0.01$).

Anche la quantità di DHA cambia significativamente durante lo studio: diminuisce da 3.1 ± 1.2 mol% a 1.5 ± 0.4 mol% nel gruppo no-LCP mentre aumenta da 2.9 ± 0.5 mol% a 5.1 ± 1.0 mol% nel gruppo LCP (per entrambi $p < 0.01$). Sono risultati significativi l'effetto della dieta, del tempo e anche l'interazione tra queste due variabili (per tutti $p < 0.01$).

La quantità di AA e di DHA presente nei fosfolipidi dei soggetti appartenenti al gruppo LCP era significativamente più alta di quella dei fosfolipidi del gruppo no-LCP ($p < 0.01$). Non sono state trovate differenze significative per quanto riguarda gli altri acidi grassi.

Quantità di AA nei fosfolipidi plasmatici



Quantità di DHA nei fosfolipidi plasmatici

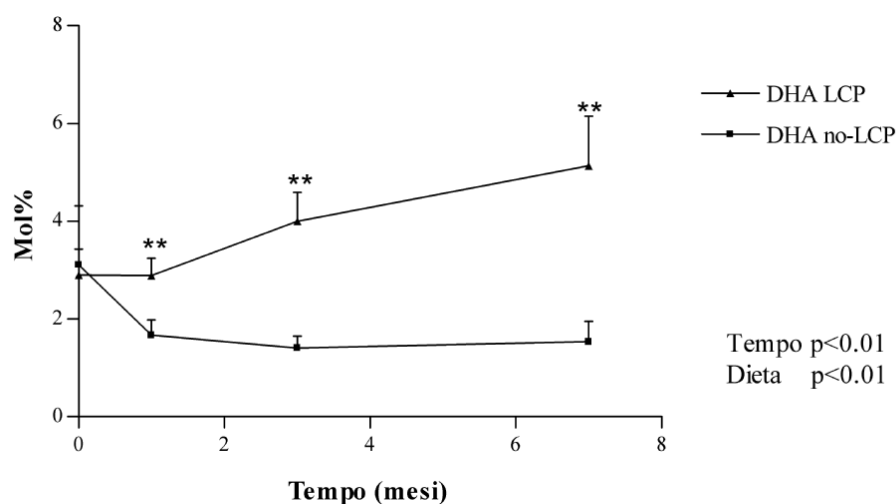


Figura 2. Mol% di AA e di ARA nei fosfolipidi plasmatici dei bambini nutriti con la formula supplementata (gruppo LCP) o non supplementata (gruppo LCP).

Acidi grassi della madre paragonati con quelli del bambino alla nascita

L'arricchimento in ^{13}C di AA, DHA, LA, ALA della madre non differiva significativamente da quello degli stessi acidi grassi nel feto. Non sono state trovate differenze significative in tutti gli altri acidi grassi.

Cambiamento dell'arricchimento isotopico durante il periodo dello studio

In Figura 3 e in Figura 4 è riportato il cambiamento dell'arricchimento in ^{13}C , di ogni singolo paziente, di AA, DHA, LA, ALA.

LA

L'arricchimento in ^{13}C di LA non era significativamente diverso nei due gruppi (Figura 3) e non è stato trovato significativamente diverso da quello della dieta.

ALA

A causa dell'esigua quantità, non è stato possibile misurare l'arricchimento in ^{13}C di ALA dai fosfolipidi plasmatici. L'arricchimento in ^{13}C è stato misurato nei trigliceridi plasmatici. Questo è stato fatto solo dopo aver visto che, in 24 campioni di plasma, l'arricchimento in ^{13}C di ALA nei trigliceridi era identico a quello di ALA nei fosfolipidi.

L'arricchimento di ALA è rimasto costante, durante tutto lo studio, in entrambi i gruppi (Figura 4)

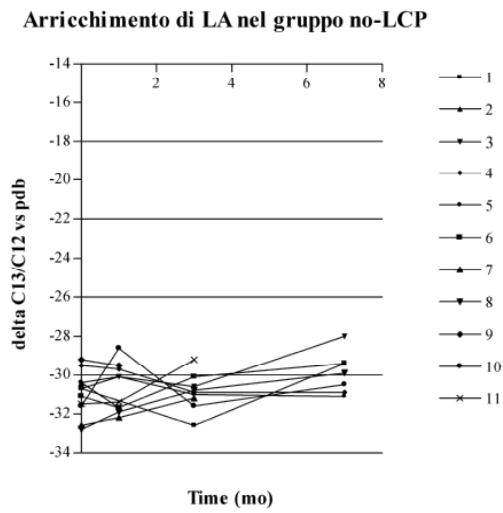
AA

L'arricchimento in ^{13}C di AA nei fosfolipidi plasmatici alla nascita non differisce nei due gruppi. Nel gruppo no-LCP l'arricchimento di AA non cambia significativamente durante i 7 mesi dello studio ($p=0.168$) (Figura 3). Nel gruppo LCP l'arricchimento in ^{13}C diventa sempre più negativo fino a che, al settimo mese, tende ad avvicinarsi al valore dell'AA presente nella dieta ($p<0.01$). La differenza nel gruppo LCP è già significativa ad un mese (-26.2 ± 1.9 ; $p<0.01$), rimane significativa paragonando i valori a 1 e 3 mesi ($p<0.01$) mentre non lo è tra 3 e 7 mesi ($p=1.000$) (Figura 2)

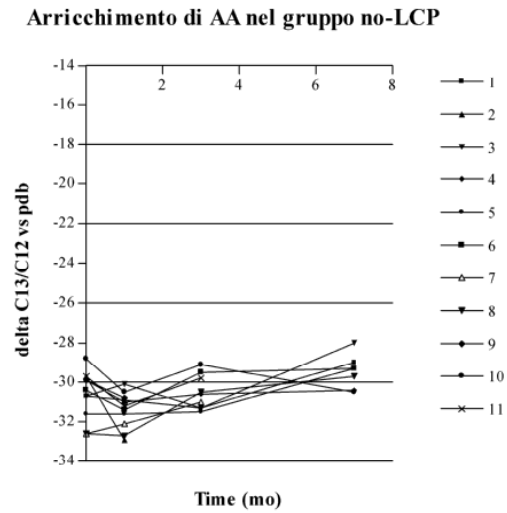
DHA

L'arricchimento in ^{13}C del DHA, alla nascita, non mostra differenze significative tra i 2 gruppi (-26.6 ± 1.7 e -29.8 ± 1.8 rispettivamente nel gruppo no-LCP e nel gruppo LCP). Nel gruppo no-LCP l'arricchimento non cambia significativamente durante tutto il periodo dello studio ($p=0.215$) (Figura 4). Nel gruppo LCP possiamo notare, attraverso i 7 mesi, un significativo ($p<0.01$) avvicinamento dell'arricchimento in ^{13}C del DHA plasmatico verso quello del DHA presente nella dieta. La differenza è significativa a 1 mese (-23.6 ± 2.5 ; $p<0.01$) e tra 1 e 3 mesi ($p<0.01$), non è invece stata trovata nessuna differenza tra 3 e 7 mesi (Figura 4).

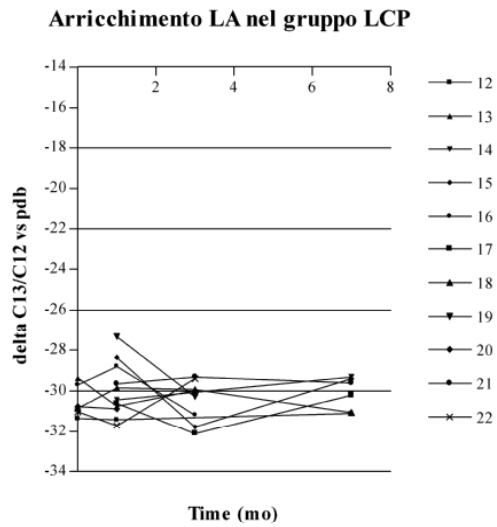
Panel A



Panel B



Panel C



Panel D

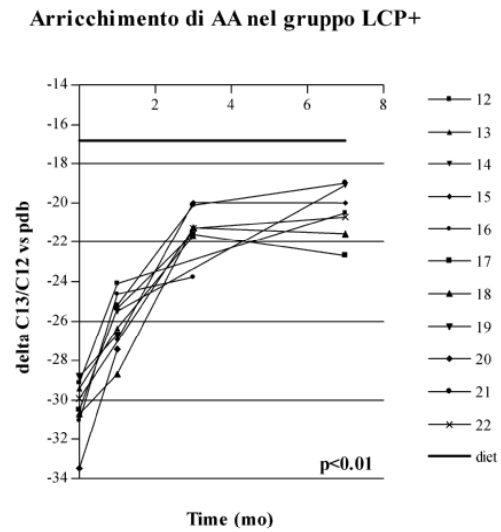
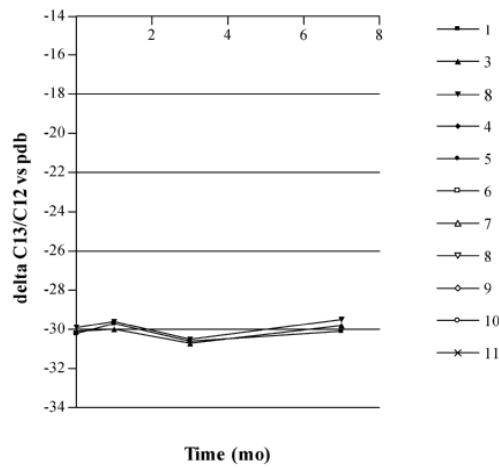


Figura 3. Arricchimento di LA e AA presenti nei fosfolipidi plasmatici. Ogni simbolo rappresenta un soggetto diverso.

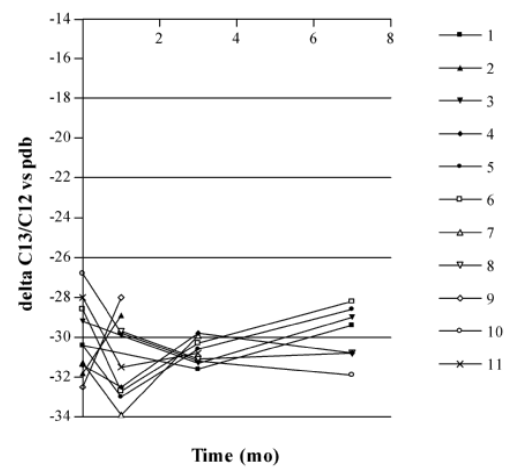
Panel A

Arricchimento di ALA nel gruppo no-LCP



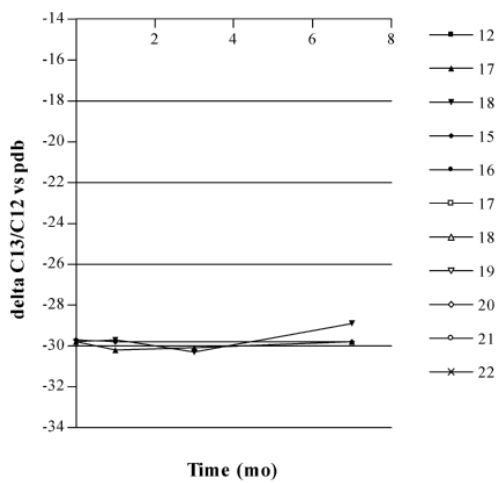
Panel B

Arricchimento di DHA nel gruppo no-LCP



Panel C

Arricchimento di ALA nel gruppo LCP



Panel D

Arricchimento di DHA nel gruppo LCP

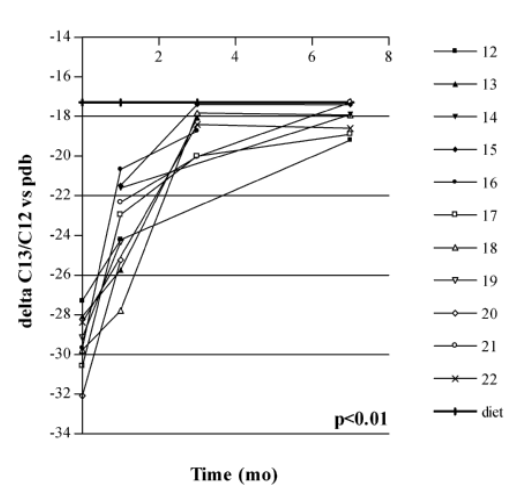


Figura 4. Arricchimento di ALA e DHA presenti nei fosfolipidi plasmatici. Ogni simbolo rappresenta un soggetto diverso.

Stima della sintesi endogena di AA e DHA

In Figura 4 possiamo vedere le percentuali di sintesi endogena di AA e DHA. C'è un significativo effetto dovuto dal tempo e una differenza significativa nella sintesi sia di AA che di DHA ($p < 0.01$ per entrambi) ma non ci sono interazioni tra le due variabili ($p = 0.852$).

La sintesi assoluta dei due LCP è stata calcolata dalla percentuale dell'assorbimento intestinale la quale era stata precedentemente misurata, negli stessi bambini ad un mese di vita, dal nostro laboratorio (38) (Figura 5). Lo stesso dato è stato usato anche per i calcoli a 3 e a 7 mesi. La sintesi assoluta di AA è di 27 ± 4 (range 20-32), 14 ± 4 (10-22) e 12 ± 4 (range 7-18) mg/Kg/giorno rispettivamente a 1,3 e 7 mesi (Figura 4). La sintesi assoluta di DHA è di 13 ± 4 (range 8-21), 3 ± 2 (range 0.8-7) e 2 ± 2 (0.2-5) mg/Kg/giorno rispettivamente a 1, 3 e 7 mesi (Figura 5). Il tempo agisce in modo significativo, è significativa anche la differenza nella sintesi, durante lo studio, sia di AA che di DHA ($p < 0.01$ per entrambi), non è significativa l'interazione tra le due variabili ($p = 0.256$).

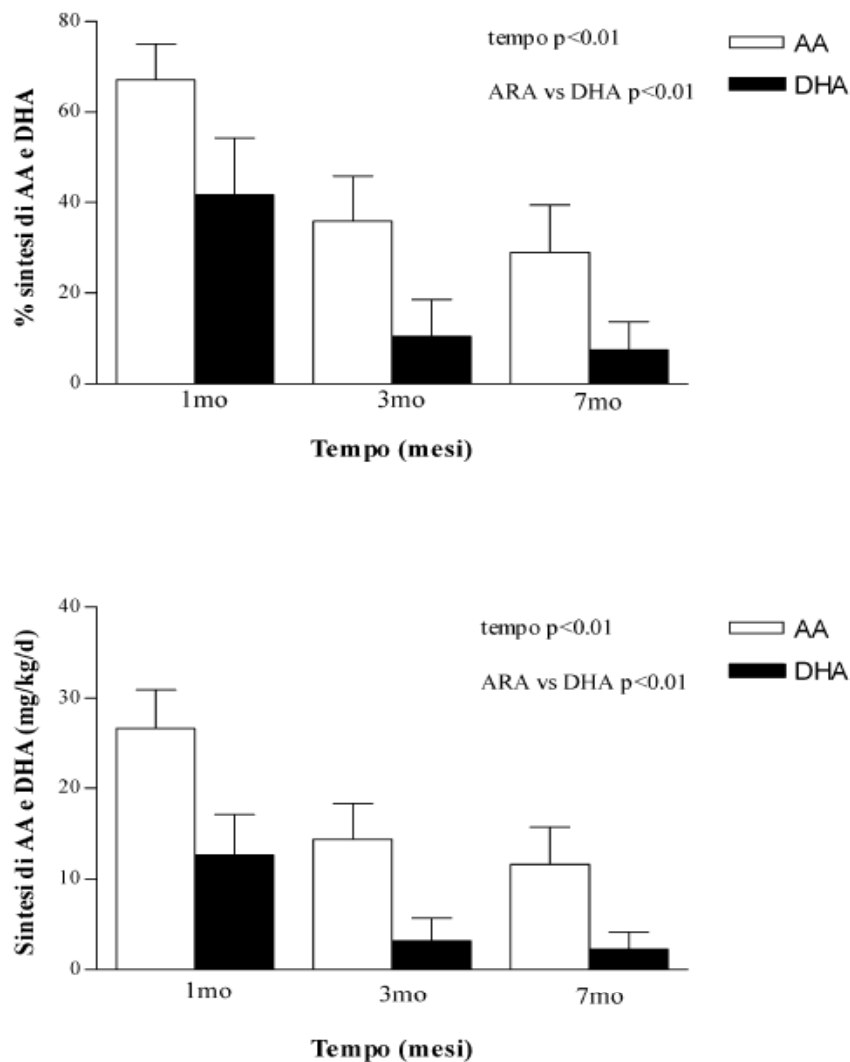


Figura 5. Sintesi, in percentuale e assoluta, di AA e di DHA nei bambini appartenenti al gruppo LCP

DISCUSSIONE

Con questo studio riportiamo la possibilità di misurare la sintesi endogena di due LCP in bambini pretermine nutriti, per un lungo periodo di tempo, con una formula arricchita con LCP. Questo approccio, usando la tecnica dell'abbondanza naturale, era stato usato in passato solo in studi "acuti" fatti per misurare il destino metabolico di alcuni nutrienti, non era mai stato usato per misurare la sintesi endogena dei nutrienti (36, 37).

Quando si studia il metabolismo lipidico, specialmente in studi brevi, possono essere ricavati solamente dati di tipo quantitativo dato che ci vuole molto tempo per raggiungere lo steady-state isotopico. I lipidi hanno un turnover lento e ci vuole molto tempo perché raggiungano l'equilibrio con i lipidi presenti nei tessuti. Per ovviare questi inconvenienti noi abbiamo applicato la tecnica dell'abbondanza naturale ad un'unica popolazione: i neonati, questo ci dava il vantaggio che fossero nutriti con la stessa dieta per un lungo periodo di tempo. Abbiamo studiato la sintesi degli LCP in quanto AA e DHA sono importanti, nei primi mesi di vita, per la crescita e per lo sviluppo del sistema nervoso centrale.

La sintesi endogena non è stata da noi calcolata, come viene fatto in altri studi, a partire dalla concentrazione plasmatici di molecole marcate e non (41, 42). Noi abbiamo usato l'arricchimento isotopico che è concettualmente simile al rapporto tracciante su tracciato. Nel nostro modello abbiamo assunto che il sistema avesse raggiunto l'equilibrio isotopico e che l'arricchimento isotopico meglio riflettesse l'apporto degli LCP presenti nella dieta nella sintesi endogena.

Il nostro metodo offre numerosi vantaggi: non è necessario avere costosi traccianti arricchiti per alterare la dieta; il numero di campioni di sangue è limitato paragonandolo a quelli necessari per altri studi (35, 41, 43) il tempo dello studio è sufficiente per creare l'equilibrio tra plasma e tessuti. Le limitazioni principali sono dovute alla necessità di avere una strumentazione costosa e di trovare nutrienti che agiscano come traccianti.

In questo studio è stato dato sufficiente tempo per correggere per il contributo dato dal rilascio, tramite lipolisi, degli LCP dai tessuti. E' difficile correggere per questo processo specialmente nei primi mesi di vita. E' stato dimostrato che, alla nascita, sono presenti depositi significativi di LCP (44), questi potrebbero dare un contributo significativo agli LCP presenti nel plasma. Se questo succedesse risulterebbe in una sovrastima della sintesi endogena di LCP. Questo è il motivo per cui abbiamo scelto di prendere il primo prelievo ad 1 mese di vita.

La sintesi endogena di LCP potrebbe essere sovrastimata se la dieta non fosse controllata e se ci fosse l'introduzione, tramite altre fonti, di LCP. Non abbiamo attentamente controllato che i bambini ricevessero solo la dieta e nessun altro nutrimento. La variazione dell'arricchimento in ^{13}C dovuto al time-lag tra la raccolta dei campioni e la somministrazione della dieta è stato ovviato nutrendo i bambini 5-6 volte al giorno. L'arricchimento isotopico è inoltre stato misurato nei fosfolipidi in quanto hanno un turnover più lento di quello dei trigliceridi (45).

Un'altra causa di sovrastima potrebbe dovuta alla diversa ossidazione dei lipidi della dieta rispetto a quelli sintetizzati a livello endogeno; non ci sono dati che supportino questa ipotesi comunque l'ossidazione degli LCP nei bambini pretermine è molto bassa (43).

Volevo adesso commentare brevemente la precisione dei nostri dati. Con la nostra strumentazione abbiamo raggiunto una precisione analitica dello $0.3^0/_{00}$ che si traduce in un errore del 2.3% e del 2.4% nella sintesi endogena rispettivamente di AA e di DHA. L'errore biologico dovuto alla raccolta dei campioni dovrebbe contare per $\leq 1.5\%$ mentre l'errore dovuto alla stima della quantità di dieta introdotta per $\leq 3\%$. L'errore maggiore è dovuto al coefficiente di assorbimento intestinale, questo è dovuto all'imprecisione degli studi di bilancio metabolico. Dato che AA e DHA sono ottenuti da LA e ALA tramite una reazione di allungamento (1 acetil CoA per AA e 2 acetil CoA per DHA) è possibile che il cambiamento nell'arricchimento isotopico sia dovuto all'aggiunta di atomi di carbonio. Questo processo ha comunque un effetto non significativo nei nostri calcoli. Anche se assumessimo che tutte le molecole di Acetil Coa usate per la sintesi degli LCP derivino da prodotti di piante C3 si avrebbe un cambiamento nell'arricchimento solamente dello $0.2^0/_{00}$ - $0.6^0/_{00}$. Non abbiamo inoltre osservato cambiamenti nell'arricchimento isotopico nel gruppo no-LCPO durante il periodo dello studio. Tutte le possibili fonti di errore sommate assieme potrebbero portare ad un errore di 3-4 mg/Kg/giorno per AA e di 1-2 mg/Kg/giorno per il DHA. Questo valore è molto più piccolo della differenza che noi abbiamo trovato tra i due gruppi.

Considerazioni cliniche

Il maggior risultato di questo studio è che la sintesi di LCP alla nascita è importante e che decresce con l'età. La sintesi media di AA diminuisce da circa 27 mg/Kg/giorno a 1 mese a 12 mg/Kg/giorno a 7 mesi e che quella di DHA diminuisce da 13 mg/Kg/giorno ad 1 mese a 2 mg/Kg/giorno a 7 mesi. Questo studio prevedeva, per 7

mesi, un introito giornaliero di AA e di DHA pari, rispettivamente, a 40 mg/Kg/giorno e 30 mg/Kg/giorno. L'informazione che la sintesi di LCP diminuisce con l'età è nuova e non sono mai state fatte, nello stesso soggetto, misure ripetute della sintesi endogena di LCP. Studi precedenti avevano dimostrato che, appena dopo la nascita, la sintesi era maggiore nei bambini pretermine rispetto che nei bambini a termine (46).

Devono essere fatti ulteriori studi per vedere se la sintesi bassa a 7 mesi sia dovuta alla crescita o se, la supplementazione con la dieta, ne riduca la sintesi.

Con questo studio riportiamo una nuova tecnica che ci permette di misurare la sintesi di due LCP per un lungo periodo di tempo. La sintesi di AA risulta significativamente più alta di quella di DHA ed entrambe diminuiscono con il tempo.

BIBLIOGRAFIA

1. Marszalek JR, Lodish HF 2005 Docosahexaenoic acid, fatty acid-interacting proteins, and neuronal function: breastmilk and fish are good for you. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21:633-657.
2. Gerster H 1998 Can adults adequately convert alpha-linolenic acid (18:3n-3) to eicosapentaenoic acid (20:5n-3) and docosahexaenoic acid (22:6n-3)? *Int J Vitam Nutr Res* 68:159-173.
3. Burdge G 2004 Alpha-linolenic acid metabolism in men and women: nutritional and biological implications. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 7:137-144.
4. Vermunt SH, Mensink RP, Simonis MM, Hornstra G 2000 Effects of dietary alpha-linolenic acid on the conversion and oxidation of ¹³C-alpha-linolenic acid. *Lipids* 35:137-142.
5. Burdge GC, Wootton SA 2002 Conversion of alpha-linolenic acid to eicosapentaenoic, docosapentaenoic and docosahexaenoic acids in young women. *Br J Nutr* 88:411-420.
6. Burdge GC, Finnegan YE, Minihane AM, Williams CM, Wootton SA 2003 Effect of altered dietary n-3 fatty acid intake upon plasma lipid fatty acid composition, conversion of [¹³C]alpha-linolenic acid to longer-chain fatty acids and partitioning towards beta-oxidation in older men. *Br J Nutr* 90:311-321.
7. Burdge GC, Jones AE, Wootton SA 2002 Eicosapentaenoic and docosapentaenoic acids are the principal products of alpha-linolenic acid metabolism in young men. *Br J Nutr* 88:355-363.
8. Pawlosky RJ, Hibbeln JR, Lin Y, Goodson S, Riggs P, Sebring N, Brown GL, Salem N, Jr. 2003 Effects of beef- and fish-based diets on the kinetics of n-3 fatty acid metabolism in human subjects. *Am J Clin Nutr* 77:565-572.
9. Goyens PL, Spilker ME, Zock PL, Katan MB, Mensink RP 2005 Compartmental modeling to quantify alpha-linolenic acid conversion after longer term intake of multiple tracer boluses. *J Lipid Res* 46:1474-1483.
10. Nettleton JA 1991 Omega-3 fatty acids: comparison of plant and seafood sources in human nutrition. *J Am Diet Assoc* 91:331-337.
11. Emken EA, Adlof RO, Gulley RM 1994 Dietary linoleic acid influences desaturation and acylation of deuterium-labeled linoleic and linolenic acids in young adult males. *Biochim Biophys Acta* 1213:277-288.

12. Hussein N, Ah-Sing E, Wilkinson P, Leach C, Griffin BA, Millward DJ 2005 Long-chain conversion of [¹³C]linoleic acid and alpha-linolenic acid in response to marked changes in their dietary intake in men. *J Lipid Res* 46:269-280.
13. Giusto NM, Pasquare SJ, Salvador GA, Castagnet PI, Roque ME, Ilincheta de Boschero MG 2000 Lipid metabolism in vertebrate retinal rod outer segments. *Prog Lipid Res* 39:315-391.
14. Sastry PS 1985 Lipids of nervous tissue: composition and metabolism. *Prog Lipid Res* 24:69-176.
15. Clandinin MT, Van Aerde JE, Merkel KL, Harris CL, Springer MA, Hansen JW, Diersen-Schade DA 2005 Growth and development of preterm infants fed infant formulas containing docosahexaenoic acid and arachidonic acid. *J Pediatr* 146:461-468.
16. McMahon B, Godson C 2004 Lipoxins: endogenous regulators of inflammation. *Am J Physiol Renal Physiol* 286:F189-201.
17. Karp CL, Flick LM, Park KW, Softic S, Greer TM, Keledjian R, Yang R, Uddin J, Guggino WB, Atabani SF, Belkaid Y, Xu Y, Whitsett JA, Accurso FJ, Wills-Karp M, Petasis NA 2004 Defective lipoxin-mediated anti-inflammatory activity in the cystic fibrosis airway. *Nat Immunol* 5:388-392.
18. Celik G, Misirligil Z 2004 Lipoxins in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 114:992.
19. Bagga D, Wang L, Farias-Eisner R, Glaspy JA, Reddy ST 2003 Differential effects of prostaglandin derived from omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids on COX-2 expression and IL-6 secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:1751-1756.
20. Robinson JG, Stone NJ 2006 Antiatherosclerotic and antithrombotic effects of omega-3 fatty acids. *Am J Cardiol* 98:39i-49i.
21. Serhan CN 2005 Novel eicosanoid and docosanoid mediators: resolvins, docosatrienes, and neuroprotectins. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 8:115-121.
22. Litman BJ, Niu SL, Polozova A, Mitchell DC 2001 The role of docosahexaenoic acid containing phospholipids in modulating G protein-coupled signaling pathways: visual transduction. *J Mol Neurosci* 16:237-242; discussion 279-284.
23. Kitajka K, Puskas LG, Zvara A, Hackler L, Jr., Barcelo-Coblijn G, Yeo YK, Farkas T 2002 The role of n-3 polyunsaturated fatty acids in brain: modulation of rat brain gene expression by dietary n-3 fatty acids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:2619-2624.

24. Pakala R, Sheng WL, Benedict CR 2000 Vascular smooth muscle cells preloaded with eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid fail to respond to serotonin stimulation. *Atherosclerosis* 153:47-57.
25. Schmitz G, Langmann T 2005 Transcriptional regulatory networks in lipid metabolism control ABCA1 expression. *Biochim Biophys Acta* 1735:1-19.
26. Innis SM 2007 Dietary (n-3) fatty acids and brain development. *J Nutr* 137:855-859.
27. Jensen CL, Voigt RG, Prager TC, Zou YL, Fraley JK, Rozelle JC, Turcich MR, Llorente AM, Anderson RE, Heird WC 2005 Effects of maternal docosahexaenoic acid intake on visual function and neurodevelopment in breastfed term infants. *Am J Clin Nutr* 82:125-132.
28. Smithers LG, Gibson RA, 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. *Am J Clin Nutr* 88:1049-1056.
29. Hoffman DR, Birch EE, Castaneda YS, Fawcett SL, Wheaton DH, Birch DG, Uauy R 2003 Visual function in breast-fed term infants weaned to formula with or without long-chain polyunsaturates at 4 to 6 months: a randomized clinical trial. *J Pediatr* 142:669-677.
30. Unay B, Sarici SU, Ulas UH, Akin R, Alpay F, Gokcay E 2004 Nutritional effects on auditory brainstem maturation in healthy term infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 89:F177-179.
31. Vedin I, Cederholm T, Freund Levi Y, Basun H, Garlind A, Faxen Irving G, Jonhagen ME, Vessby B, Wahlund LO, Palmblad J 2008 Effects of docosahexaenoic acid-rich n-3 fatty acid supplementation on cytokine release from blood mononuclear leukocytes: the OmegAD study. *Am J Clin Nutr* 87:1616-1622.
32. Field CJ, Van Aerde JE, Robinson LE, Clandinin MT 2008 Effect of providing a formula supplemented with long-chain polyunsaturated fatty acids on immunity in full-term neonates. *Br J Nutr* 99:91-99.
33. Innis SM 1992 Human milk and formula fatty acids. *J Pediatr* 120:S56-61.
34. Clandinin MT, Chappell JE, Heim T, Swyer PR, Chance GW 1981 Fatty acid utilization in perinatal de novo synthesis of tissues. *Early Hum Dev* 5:355-366.
35. Carnielli VP, Wattimena DJ, Luijendijk IH, Boerlage A, Degenhart HJ, Sauer PJ 1996 The very low birth weight premature infant is capable of synthesizing arachidonic and docosahexaenoic acids from linoleic and linolenic acids. *Pediatr Res* 40:169-174.

36. Demmelmair H, von Schenck U, Behrendt E, Sauerwald T, Koletzko B 1995 Estimation of arachidonic acid synthesis in full term neonates using natural variation of ^{13}C content. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 21:31-36.
37. Rambal C, Pachiardi C, Normand S, Riou JP, Louisot P, Martin A 1992 Use of compounds naturally labeled with stable isotopes for the study of the metabolism of glycoprotein neutral sugars by gas-liquid chromatography-isotope-ratio mass spectrometry. Technical validation in the rat. *Carbohydr Res* 236:29-37.
38. Carnielli VP, Verlato G, Pederzini F, Luijendijk I, Boerlage A, Pedrotti D, Sauer PJ 1998 Intestinal absorption of long-chain polyunsaturated fatty acids in preterm infants fed breast milk or formula. *Am J Clin Nutr* 67:97-103.
39. Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH 1957 A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* 226:497-509.
40. Craig H 1957 Isotopic standards for carbon and oxygen correction factors for mass-spectrometric analysis of carbon dioxide. *Geochim Cosmochim Acta* 12:133-149.
41. Pawlosky RJ, Lin YH, Llanos A, Mena P, Uauy R, Salem N, Jr. 2006 Compartmental analyses of plasma ^{13}C - and ^2H -labeled n-6 fatty acids arising from oral administrations of ^{13}C -U-18:2n-6 and ^2H 5-20:3n-6 in newborn infants. *Pediatr Res* 60:327-333.
42. Llanos A, Lin Y, Mena P, Salem N, Jr., Uauy R 2005 Infants with intrauterine growth restriction have impaired formation of docosahexaenoic acid in early neonatal life: a stable isotope study. *Pediatr Res* 58:735-740.
43. Mayes C, Burdge GC, Bingham A, Murphy JL, Tubman R, Wootton SA 2006 Variation in [^{13}C] alpha linolenic acid absorption, beta-oxidation and conversion to docosahexaenoic acid in the pre-term infant fed a DHA-enriched formula. *Pediatr Res* 59:271-275.
44. Foreman-van Drongelen MM, van Houwelingen AC, Kester AD, Hasaart TH, Blanco CE, Hornstra G 1995 Long-chain polyunsaturated fatty acids in preterm infants: status at birth and its influence on postnatal levels. *J Pediatr* 126:611-618.
45. Arab L 2003 Biomarkers of fat and fatty acid intake. *J Nutr* 133 Suppl 3:925S-932S.
46. Uauy R, Mena P, Wegher B, Nieto S, Salem N, Jr. 2000 Long chain polyunsaturated fatty acid formation in neonates: effect of gestational age and intrauterine growth. *Pediatr Res* 47:127-135.

CAPITOLO 3

MISURA DEL METABOLISMO DI SP-B E DI DSPC IN VIVO NELL'UOMO USANDO LA TECNICA DEGLI ISOTOPI STABILI

INTRODUZIONE

Il surfattante polmonare (PS) è una miscela complessa di lipidi e proteine la cui funzione primaria è quella di ridurre la tensione superficiale all'interfaccia aria-alveolo in modo da evitare il collasso degli alveoli a fine espirazione. (1).

Abbassando la tensione superficiale il PS riduce l'energia richiesta per riempire d'aria i polmoni aumentando quindi la compliance polmonare. Diminuendo il ritorno elastico, il PS riduce il rischio di collasso polmonare, come risultato la tensione superficiale a livello dei polmoni viene ridotta a valori inferiori a 10 cm H₂O .

In aggiunta alla classica funzione di ridurre la tensione superficiale, il PS possiede altre funzioni che lo rendono fisiologicamente indispensabile.

Queste funzioni sono riassunte in tabella 1.

Correlate alla tensione superficiale	Non correlate alla tensione superficiale
Mantenimento di un'elevata area di scambio	Difesa specifica e non-specifica da agenti esterni
Aumento della compliance polmonare durante l'inspirazione	Barriera contro gli agenti patogeni
Stabilizzazione degli alveoli durante l'espirazione	Attività antibatterica/antivirale
Stabilizzazione delle vie aeree	Rilassamento muscolatura liscia
Effetto anti-edema	
Agente anti-adesione	
Agevolazione trasporto mucociliare	
Rimozione di particolato	

Deficienze o disfunzioni del PS causano gravi problemi respiratori. Il maggior problema causato dalla deficienza del PS è la Sindrome neonatale da Distress Respiratorio (RDS) dovuta a prematurità (2). I bambini prematuri affetti da RDS mostrano difficoltà respiratoria, diminuita compliance polmonare, collasso alveolare con ridotta capacità funzionale residua, scarsi scambi gassosi ed edema interstiziale diffuso. L'incidenza

attuale di RDS nei prematuri diminuisce con l'età gestazionale. Viene stimato che l'RDS affligga, nei paesi sviluppati, il 10% dei bambini prematuri (3).

Sintomi simili a quelli dell'RDS si ritrovano nel danno acuto polmonare (ALI) e nella sua forma più severa: la Sindrome Acuta da Distress Respiratorio (ARDS) (4). Negli USA, ogni anno, l'ARDS colpisce circa 150000 persone e ha un tasso di mortalità del 30-40%. (5). La patogenesi dell'ARDS non è ancora ben conosciuta ma una delle cause principali sembra essere l'inibizione del surfattante dovuta ad una perdita di sostanze inibitorie (es: proteine sieriche, emoglobina e alcuni lipidi) nello spazio alveolare, questa perdita può essere dovuta ad una grave infiammazione polmonare, a traumi, a tossicità dovuta all'ossigeno o a danno da radiazioni (4, 5).

La terapia con surfattante esogeno nei bambini prematuri con RDS migliora di molto sia la funzionalità respiratoria sia la prognosi (6), la stessa terapia mostra invece effetti limitati all'aspetto respiratorio nei pazienti affetti da ARDS, non si hanno invece effetti sulla sopravvivenza (7-9). Nella terapia con surfattant dell'ARDS gli scambi gassosi migliorano ma l'effetto generale dipende dalla dose, dal tempo di somministrazione e dal tipo di surfattante usato (4, 5) .

Taut F e il suo gruppo di ricerca (6) hanno recentemente rianalizzato i dati ottenuti da 5 studi multicentrici nei quali pazienti con ARDS avevano ricevuto surfattante contenente la proteina specifica C del surfattante ricombinante (rSP-C) (Venticute). Se si prendevano i dati dell'intera popolazione si notava un miglioramento dell'ossigenazione ($p=0.002$) ma nessun effetto sulla mortalità (32.6%). Un'analisi post-hoc ha rivelato che due sottogruppi di pazienti, quelli con ARDS dovuta a polmonite o aspirazione, avevano beneficiato della terapia con un miglioramento sia dell'ossigenazione ($p=0.0008$) sia della mortalità ($p=0.018$).

Metabolismo del surfattante polmonare

Usando la microscopia elettronica Weibel e il suo gruppo (10, 11) hanno dimostrato che la superficie degli alveoli è rivestita da un sottilissimo strato acquoso, questo strato è essenziale per il metabolismo del PS in quanto provvede un medium per la secrezione, per le trasformazioni morfologiche e la struttura tridimensionale, e per il riciclo del surfattante (2).

PS è sintetizzato dalle cellule epiteliali polmonari di tipo II, processato e impacchettato nei corpi lamellari. Il PS viene quindi secreto nella fase acquosa che riveste gli alveoli dove i corpi lamellari subiscono una trasformazione morfologica che porta alla

formazione dei tubuli di mielina. La formazione dei tubuli dipende dalla presenza di apoproteine del surfattante e del calcio (12, 13).

I tubuli di mielina sono composti da tubuli allungati costituiti principalmente da fosfolipidi e da proteine e hanno una dimensione che può variare dai nanometri ai micron (14, 15).

I componenti del surfattante sono quindi rilasciati dai tubuli di mielina per formare un film superficiale attivo all'interfaccia aria-acqua negli alveoli. Dopo aver espletato la sua funzione fisiologica il surfattante viene rilasciato sotto forma di piccole vescicole unilamellari, alcune di queste vengono captate dai macrofagi alveolari mentre la gran parte viene endocitata dalle cellule alveolari di tipo II; queste cellule riciclano parte dei componenti del surfattante nei corpi lamellari. Il turnover stimato del PS è sorprendentemente breve, varia tra 4 e 11 ore (16).

Composizione del surfattante

Il surfattante è costituito dal 90% di lipidi e dal 10% circa di proteine specifiche (Figura 1).

Dei lipidi circa il 10-20% sono lipidi neutri (costituiti principalmente dal colesterolo) mentre il restante 80-90% è rappresentato dai fosfolipidi (PLs). La fosfatidilcolina (PC) costituisce l'80% dei PLs e nel 60% contiene due acidi grassi saturi. Questa PC viene definita PC disatura (DSPC), l'acido grasso che più frequentemente compone la DSPC è l'acido palmitico. In questo caso la DSPC prende il nome di dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC).

I fosfolipidi acidi rappresentano circa l'8-15% dei PLs e sono il fosfatidilglicerolo (PG) e il fosfatidilinositolo (PI). In percentuali minori troviamo anche fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilserina (PS) e sfingomielina. (17).

Insieme ai lipidi il surfattante contiene anche 4 proteine specifiche chiamate proteine del surfattante (SP)-A, SP-B, SP-C (18) e SP-D (19). SP-A (PM 26-38 KDa) e SP-D (43KDa) sono glicoproteine grandi, multimeriche e idrofiliche. Fanno parte della famiglia delle collectine che sono proteine immunitarie dipendenti dal calcio. SP-B (PM 8.7 KDa) e SP-C (4.2 KDa) sono invece piccole e molto idrofobiche. Tra queste proteine specifiche SP-A è la più abbondante e rappresenta il 5% in peso sulla percentuale dei PL, SP-D è lo 0.5%, SP-C e SP-B assieme costituiscono approssimativamente il 2%.

I componenti principali del surfattante sono sintetizzati da due tipi di cellule: le cellule alveolari di tipo II che produce i lipidi del surfattante e tutte e 4 le proteine specifiche (20) e le cellule di Clara delle vie aeree che sintetizzano anch'esse le proteine del surfattante ma non producono lipidi (21).

DPPC, PG, SP-B e SP-C giocano un ruolo essenziale nel ridurre la tensione superficiale all'interfaccia aria-liquido nel polmone (22).

SP-A e SP-D sono implicate nel prevenire l'edema alveolare (23) e nella difesa contro infezioni e infiammazioni.

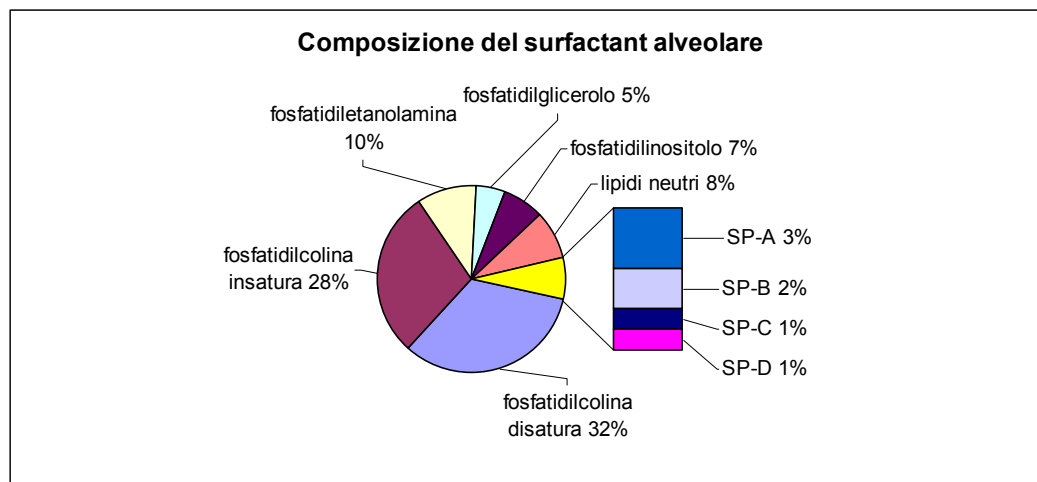


Figura 1. Composizione del surfattante alveolare.

DSPC

La DSPC, grazie al suo aspetto anfipatico (*Figura 2*), è la componente del surfattante che può ridurre vicino allo zero la tensione superficiale nell'interfaccia aria-liquido negli alveoli (1); il suo assorbimento è facilitato dalle fosfatidilcoline insature e dalle proteine idrofobiche del surfattante. La fosfatidilcolina viene sintetizzata nel reticolo endoplasmatico dagli pneumociti di tipo II. Una reazione di acilazione-deacilazione nelle cellule di tipo II converte la fosfatidilcolina insatura in DSPC prima che i lipidi e le proteine lipofiliiche SP-B e SP-C vengano assemblate in corpi lamellari (24). La quantità di DSPC nei polmoni di feti umani aumenta contemporaneamente con la comparsa dei corpi lamellari, circa alla 22^o settimana di gestazione (25). Nel polmone malato, la percentuale di saturazione della fosfatidilcolina può diminuire attraverso due meccanismi (26): a) le fosfatidilcoline insature dal plasma e dalle membrane dei globuli rossi possono contaminare il surfactante; b) la capacità delle cellule di tipo II di sintetizzare e secernere surfattante normale può essere ridotta.

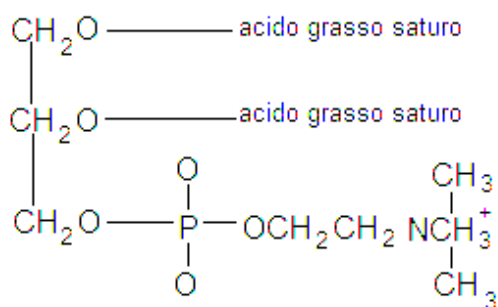


Figura 2. Struttura della fosfatidilcolina disatura

SP-B

La SP-B umana è un piccolo peptide anfipatico di 79 aminoacidi (aa) prodotto, attraverso un processo proteolitico, a partire da un precursore di 381 aa. (27, 28). Essa è codificata da un singolo gene (chiamato SFTPB) posizionato sul cromosoma 2. La SP-B è prodotta in modo predominante dalle cellule dell'epitelio alveolare di tipo II, è sintetizzata come un precursore proteico che viene glicosilato e trasportato dal reticolo endoplasmatico all'apparato di Golgi, quindi ai corpi multivescicolari e infine viene impacchettato nei corpi lamellari. Il processo proteolitico, del precursore della SP-B, avviene durante il trasferimento dai corpi multivescicolari ai corpi lamellari dove la SP-B attiva viene immagazzinata con la SP-C e i PLs (29). Il contenuto dei corpi lamellari viene secreto nello spazio aereo dove interagisce con la SP-A per formare i tubuli di mielina dai quali si formerà il film di surfattante che ricopre gli alveoli. Le regioni cationiche della SP-B sono saldamente associate alle teste polari dei PLs attraverso dei domini anfipatici ad elica che creano facce idrofiliche e idrofobiche che ancorano la SP-B alla superficie lipidica Figura 2.

La SP-B interagisce con le vescicole lipidiche causandone la lisi e la fusione (30). Questo processo porta rapidamente alla formazione di foglietti di PLs a partire dalle vescicole lipidiche, questa attività è necessaria sia per l'impacchettamento delle vescicole lipidiche in corpi multivescicolari durante la formazione dei corpi lamellari, sia per la formazione di multistrati lipidici nell'alveolo.

La SP-B extracellulare gioca un ruolo fondamentale nell'omeostasi del surfattante promuovendo l'assorbimento dei lipidi a livello del film superficiale e migliorando la loro stabilità durante i processi di compressione ed espansione che avvengono nel ciclo respiratorio.

Riassumendo le più importanti funzioni di SP-B sono quella di incrementare la quantità di PLs che vengono assorbiti all'interfaccia aria-acqua e quella di essere coinvolta nella formazione dei tubuli di mielina assieme alla SP-A e al calcio. Il deficit di SP-B nei neonati e negli animali comporta anche variazioni nel metabolismo di altre componenti del surfattante suggerendo un ulteriore ruolo della SP-B negli spazi aerei. Tali variazioni secondarie includono la formazione di corpi lamellari marcatamente anomali e l'accumulo di peptidi SP-C processati in modo aberrante (31).

I livelli di SP-B sono bassi nel bambino pretermine con Sindrome da Distress Respiratorio (RDS) e negli adulti con ARDS (32, 33).

Inibizione del surfattante

L'inibizione o l'inattivazione del surfattante si riferisce a quei meccanismi che diminuiscono o annullano l'attività superficiale del surfattante. Molte sostanze sono state identificate come inibitori del surfattante. I più importanti fattori di inibizione sono: proteine plasmatiche, membrane fosfolipidiche sature, lisofosfolipidi, acidi grassi liberi, meconio e livelli alti di colesterolo (34). L'inibizione del surfattante può inoltre derivare dalla degradazione dei lipidi del surfattante per opera delle fosfolipasi o delle proteine del surfattante da parte delle proteasi. Questi agenti degradativi, normalmente presenti nei polmoni a bassi livelli, possono aumentare durante infezioni microbiche e, soprattutto, durante le infezioni polmonari per secrezione da parte dei leucociti e delle cellule di tipo II (6, 35, 36). La funzionalità del surfattante può essere inficiata anche dalla presenza di specie reattive dell'ossigeno (36, 37) e di inquinanti (38).

Il danno polmonare nell'ARDS è originato da un'attivazione sistemica dei neutrofili circolanti (39); i neutrofili attivati aderiscono all'endotelio vascolare nei capillari polmonari e rilasciano poi il loro contenuto dei loro granuli citoplasmatici, danneggiando in tal modo l'endotelio e provocando un'essudazione di proteine plasmatiche nello spazio alveolare. Albumina, fibrinogeno ed emoglobina possono inibire il PS per adsorbimento competitivo (40-44). Queste proteine quando vengono mescolate con il PS competono con i PL per l'adsorbimento all'interfaccia aria-acqua in quanto, anche se di grandi dimensioni, sono solubili in acqua e quindi riescono facilmente a raggiungere l'interfaccia per diffusione molecolare. Le proteine, una volta raggiunta l'interfaccia, creano barriere elettrostatiche e/o steriche che impediscono l'avvicinarsi dei PL (45, 46). L'inibizione del surfattante dipende dal rapporto proteine plasmatiche/surfattante (44). Rennard et al (47) e Ishizika hanno stimato una

concentrazione di albumina nel surfattante di 3.7-4.9 mg/ml (circa il 10% del valore plasmatici).

La funzionalità del surfattante viene diminuita anche in presenza di lisofosfolipidi, questi PL contengono un singolo acido grasso per molecola e vengono prodotti dalla fosfolipasi A2 che viene secreta dai globuli bianchi e dalle cellule di tipo II soprattutto durante ALI/ARDS (48).

Meccanismi genetici di deficit di surfattante

Il primo difetto genetico causa di deficit del surfattante ad essere riconosciuto è stato il deficit ereditario di SP-B, è stato identificato in un neonato a termine che presentava segni clinici di RDS non responsivo della terapia (49). I neonati con deficit ereditario di SP-B presentano quadri radiologici sovrapponibili a quelli dei neonati con RDS, il disturbo respiratorio risulta essere progressivo e porta a morte per insufficienza respiratoria entro 3-6 mesi; l'unico trattamento efficace è il trapianto polmonare (50). Alcune mutazioni portano alla produzione di una proSP-B che non è in grado di essere processata in modo efficace a formare SP-B matura, e questo può portare a deficit parziali associati ad una maggiore sopravvivenza. (51).

Il deficit di ABCA3 è l'errore congenito del metabolismo del surfattante di più recente scoperta, ma potrebbe risultare il più comune difetto genetico associato alla produzione del surfattante. ABCA3 è un membro della famiglia delle cassette leganti l'ATP, proteine transmembrana responsabili del trasporto di sostanze attraverso le membrane biologiche e che sono state correlate a diverse malattie genetiche nell'uomo (52). La sottoclasse ABCA è spesso coinvolta nel trasporto dei lipidi e la ABCA3 è altamente espressa all'interno delle cellule alveolari di tipo II sui corpi lamellari. L'espressione proteica di ABCA3 aumenta appena prima della nascita ed è up-regolata dai glucocorticoidi (53).

La mutazione di ABCA3 porta, nei neonati, un deficit grave di surfattante con un fenotipo simile a quello del deficit di SP-B (54).

Studi recenti con topi Knock-out per il gene per l'ABCA3 hanno dimostrato una diminuzione, nei polmoni, di PC e di PG esterificati con l'acido palmitico (55). Altri studi hanno dimostrato come l'espressione di ABCA3 sia indotta dall'IL-6 con un pathway che include STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription 3), PI3K, AKT, SCAP e SREBP (56, 57).

Alterazioni del metabolismo del surfattante nell'ARDS/ALI

L'ARDS è una condizione di edema polmonare non congestizio associato ad ipossiemia, definita secondo i criteri di Bernard et al (58), come:

- insufficienza respiratoria ad esordio acuto;
- $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ ratio < 200 mmHg o compreso tra 200 e 300 mmHg, indipendentemente dal livello di PEEP usato, rispettivamente per ARDS e per ALI;
- infiltrati polmonari bilaterali visibili all'Rx torace in proiezione frontale;
- pressione polmonare endocapillare (wedge) < 18 mmHg quando misurata o non evidenza clinica di ipertensione in atrio sinistro o di patologia polmonare cronica.

Una riduzione della compliance polmonare è presente nella maggior parte dei pazienti con ARDS e ALI, ad indicare che una disregolazione del surfattante gioca un ruolo fondamentale nel dispiegarsi del quadro morboso (58).

Studi clinici che misurano il contenuto e la composizione dei PL nel broncolavaggio (BAL) di soggetti con ARDS o ALI (33, 59-61) hanno riportato tre importanti risultati:

1. In due dei quattro studi il contenuto di PL è ridotto
2. Si ha una significativa alterazione della distribuzione relativa delle classi fosfolipidiche, questo include una marcata diminuzione di PG (circa dell'80% in tre studi) e un aumento compensatorio della classi fosfolipidiche minori (PI, PE, PS e sfingomieline). Il contenuto di PC è solo moderatamente ridotto durante il decorso clinico della malattia.
3. La quantità di acido palmitico, l'acido grasso maggiormente presente nella PC, risulta ridotto dell'80% rispetto ai valori di controllo, mentre si ha un aumento del contenuto di acidi grassi insaturi (62). La quantità di DPPC risulta drammaticamente ridotta (circa metà rispetto ai valori di controllo).

Le proteine specifiche SP-A, SP-B e SP-C del surfattante sono anche ridotte nel BAL di soggetti con ARDS o ALI (63, 64).

Uno studio recente (65) ha descritto i cambiamenti della composizione del surfattante durante il decorso dell'ARDS. All'esordio dell'ARDS si aveva una significativa diminuzione SP-A, SP-B, SP-C, PG e DPPC. A 7 giorni dall'intubazione il BAL dei soggetti con ARDS mostrava un miglioramento nella composizione del surfattante con un aumento progressivo di PG, PC (e soprattutto DPPC che però non raggiungeva il

livello dei controlli), SP-A, SP-B e SP-C. Ha inoltre osservato una correlazione significativa tra il rapporto P_{aO_2}/F_{iO_2} e la quantità sia di DPPC sia di SP-C.

Con questo studio vogliamo descrivere un nuovo metodo per lo studio della cinetica del surfattante in vivo nell'uomo tramite l'uso di isotopi stabili non radioattivi (66-71). L'infusione endovenosa di substrati marcati con isotopi stabili consente di studiare la sintesi del surfattante: i precursori marcati sono captati dalle cellule alveolari di tipo II e utilizzati per la sintesi delle componenti del surfattante. Il surfattante viene poi secreto negli spazi alveolari e può quindi essere raccolto tramite aspirati tracheali in serie; la misura in spettrometria di massa della concentrazione delle molecole marcate ci fornisce informazioni sulla loro cinetica e metabolismo.

In questo studio abbiamo migliorato la resa della separazione della SP-B per la sua successiva analisi, abbiamo quindi misurato la sintesi ed il turnover di due componenti principali del surfattante, la SP-B e la DSPC, infondendo due loro precursori metabolici. Come precursore metabolico per la sintesi della DSPC abbiamo utilizzato l'acqua deuterata (67) mentre per l'SP-B abbiamo usato la leucina marcata con ^{13}C .

OBIETTIVO DELLO STUDIO

Misurare la sintesi ed il turnover dei lipidi e della proteina specifica B del surfattante nei pazienti con ARDS o ALI e in controlli confrontabili per l'età.

MATERIALI E METODI

Sono stati reclutati per lo studio pazienti con ARDS o ALI e soggetti di controllo, reclutati presso le Terapie Intensive del Dipartimento di Anestesia e Rianimazione dell'Università di Padova.

Il progetto dello studio è stato approvato dal Comitato Etico locale e il consenso informato è stato ottenuto per tutti i pazienti studiati.

Il progetto dello studio prevede che il consenso informato sia chiesto al paziente stesso, qualora possibile (ad esempio a tutti i controlli o a quei pazienti che sono ricoverati nelle terapie intensive con un grado di coscienza tale da poter raccogliere un consenso informato e che si aggravavano in un secondo momento). Nel caso in cui il paziente non fosse in grado di esprimersi personalmente è previsto che il consenso sia concesso dal medico curante. Dopo valutazione circa l'opportunità di arruolare il paziente nello studio in base alle caratteristiche cliniche e agli eventuali rischi che questo può comportare.

PAZIENTI

Criteri di inclusione per i soggetti con ARDS/ALI:

1. Soggetti con ARDS o ALI definita secondo Bernard et al (58)
 - Insufficienza respiratoria ad esordio acuto
 - $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ ratio < 200 mmHg o compreso tra 200 e 300 mmHg, indipendentemente dal livello di PEEP usato, rispettivamente per ARDS e per ALI
 - Pressione polmonare endocapillare (wedge) < 18 mmHg quando misurata o non evidenza clinica di ipertensione in atrio sinistro
2. Inizio dell'ARDS o ALI < 96 ore
3. Condizioni emodinamiche stabili definite come una pressione arteriosa sistolica entro il 95° percentile anche se con infusione costante di isotropi ma senza richiesta di boli di fluidi da almeno 6 ore prima dell'inizio dello studio
4. Consenso informato scritto
5. Presenza di una linea arteriosa e venosa inserita a scopo di monitoraggio clinico.

I controlli sono soggetti senza malattia polmonare che presumibilmente richiedono ventilazione meccanica per almeno 5 giorni (pazienti con grave trauma cranico, pazienti

in coma o che richiedono ventilazione meccanica dopo interventi chirurgici maggiori), e saranno appaiati per età, peso e sesso ai pazienti selezionati con ARDS.

Criteri di esclusione per entrambe le categorie dei pazienti:

1. Insufficienza epatica: transaminasi (AST, ALT) > 3 volte i valori di riferimento o fattore V < 20%
2. Insufficienza renale: creatina > 2 volte i valori normali
3. Presenza di convulsioni
4. Richiesta di sangue o derivati (plasma, piastrine, emazia) durante l'infusione dell'isotopo
5. Uso di emulsioni lipidiche endovena durante l'infusione degli isotopi.

DISEGNO DELLO STUDIO

Tutti i pazienti hanno ricevuto un'infusione endovenosa costante di leucina marcata in una posizione con ^{13}C , dissolta in soluzione fisiologica. A questa si è aggiunta la somministrazione di $^2\text{H}_2\text{O}$ in bolo endovena, su via venosa dedicata, al tempo 0 dello studio e con successivi rabbocchi ai tempi 12, 24 e 36 ore dall'inizio dello studio per raggiungere e mantenere l'equilibrio isotopico; la dose somministrata in bolo è stata calcolata in base al peso corporeo del soggetto (0.5 ml/Kg di peso corporeo), mentre la dose dei successivi rabbocchi corrispondeva allo 0.03125% dell'introito dei fluidi delle 12 ore precedenti al rabbocco stesso.

L'infusione endovenosa del tracciante è stata eseguita insieme alle infusioni standard. La raccolta dei campioni non ha comportato alcuna manovra aggiuntiva per il paziente: gli aspirati tracheali da analizzare sono eseguiti routinariamente nei pazienti intubati circa ogni 4 ore per mantenere pervio il tubo endotracheale; i campioni di sangue (1 ml di sangue intero) sono stati eseguiti dalla linea arteriosa già in sede per il monitoraggio clinico.

Per tutta la durata dello studio sono stati raccolti parametri vitali ogni 2 ore, i parametri ventilatori ogni 6 ore e i parametri degli emogasanalisi eseguiti al paziente su indicazione clinica. Inoltre sono stati raccolti i risultati degli esami ematochimici e culturali eseguiti per una completa valutazione della storia clinica del soggetto.

Sono stati raccolti campioni di aspirato tracheale sequenzialmente dal tempo basale (prima della somministrazione del tracciante) fino alle 72 ore ogni 6 ore e successivamente ogni 24 ore per altri 6 giorni o fino all'estubazione. In parallelo, sono

stati raccolti un campione di urine con le stesse modalità temporali degli aspirati tracheali (TA) e 1 ml di sangue con la cadenza temporale sopra indicata fino alle 72 ore.

ANALISI DEI CAMPIONI

Dopo il prelievo gli aspirati tracheali e il sangue sono stati centrifugati, per 10 minuti, rispettivamente a 500 e 1500 g e conservati a -80°C fino all'analisi; le urine sono state conservate a -20°C senza necessità di centrifugazione.

Analisi degli aspirati tracheali

Per l'estrazione dei lipidi e delle proteine idrofobiche del surfattante è stata usata un'estrazione Bligh and Dyer acidificata (72) in modo da ottenere un maggior recupero di SP-B e di SP-C.

La metodica prevede di estrarre circa 1 ml di TA, previa aggiunta di pentadecanoil fosfatidilcolina come standard interno, con una quantità doppia (2 ml) della seguente miscela: metanolo/cloroformio/acido cloridrico in rapporto 2:3: 0.05N. Si agita per 10 minuti e si centrifuga per 10 minuti a 1000g. Viene recuperata la fase organica, contenente PL, SP-B e SP-C mentre la fase acquosa viene estratta un'altra volta con lo stesso solvente. Le due fasi organiche vengono unite e portate a secco sotto azoto. Il residuo viene ripreso con un volume di cloroformio corrispondente al volume iniziale del TA.

Contemporaneamente vengono estratti, senza aggiunta dello standard interno, 100µl di TA per il successivo dosaggio dei fosfori..

Dosaggio dei fosfori nella fase organica del TA

I fosfori vengono dosati secondo la metodica di Bartlett (73) per piccole quantità di fosforo, questo ci consente di usare una piccola quantità di TA (100µl). Il campione, 100ul dell'estratto organico ripreso in cloroformio, viene portato a secco sotto flusso di azoto, aggiunto di 300µl di H₂SO₄ 10N e messo in stufa a 200°C per 1 ora. Dopo che il campione si è raffreddato si aggiungono 5 gocce di acqua ossigenata e si rimette in stufa per 30 minuti. Al campione portato a temperatura ambiente si aggiungono 0.65 ml di acqua milli Q, 0.2 ml di una soluzione al 5% di molibdato di ammonio e 50µl del reattivo di Fiske SubbaRow. La soluzione viene scaldata a bagno maria a 100°C per 10 minuti. L'assorbanza viene letta a 830 nm in microcuvette. La concentrazione viene

ricavata estrapolandola da una curva di calibrazione da 1 a 2 µg di fosforo. Per calcolare la quantità di fosfolipidi si moltiplica la quantità di fosfori per 25.

Isolamento di DSPC e di SP-B da TA

Aliquote di fase cloroformica contenenti 200µg di fosfolipidi (per non eccedere la capacità massima della resina) sono state applicate su una colonnina Bond Elute contenente 100mg di resina (Supelco, Milano, Italia) preconditionata con 3-5 ml di cloroformio. Dopo essere state caricate le colonnine sono state eluite sequenzialmente con 3ml di una miscela di cloroformio/metanolo/acido acetico nei seguenti rapporti:

1. 20:1:0
2. 9:1:0
3. 4:1:0
4. 4:1:0.025
5. 3:2:0
6. 1:4:0
7. 1:9:0

E' stato precedentemente pubblicato dal nostro gruppo (69) che con la frazione 2 escono i fosfolipidi e che con la frazione 3 e 4 esce l'SP-B. Le due frazioni (3 e 4) messe assieme contengono il 60% circa della quantità totale di SP-B che è risultata essere pura e non contaminata da altre proteine.

Isolamento della DSPC dalla frazione dei PL

La frazione 2, contenente i fosfolipidi, eluita dalle Bond Elute è stata portata a secco, e ripresa con 100µl di cloroformio. Il campione è stato ossidato con tetrossido di osmio (74) e la DSPC è stata isolata dagli estratti lipidici con cromatografia su strato sottile (TLC) utilizzando come fase mobile una miscela di cloroformio/metanolo/cloruro di potassio/trietilammina (40:12:33:8:24).

Gli acidi grassi della DSPC sono stati metilati aggiungendo al campione 3ml di HCl-metanolo 3N, i campioni sono stati incubati a 100°C per 60 minuti e, dopo raffreddamento, il pH è stato neutralizzato con l'aggiunta di 2.5 ml di K₂CO₃ al 10%. Gli esteri metilici degli acidi grassi così ottenuti sono stati estratti con 200µl di esano, trasferiti in vial ed iniettati al gascromatografo, in colonna Ultra 2 (25m, 0.20 id, 0.33 micron; J&W Agilent Technologies, Milano, Italia) per ottenere la loro separazione ed identificazione quantitativa (67).

Analisi in GC-IRMS dell'arricchimento della DSPC

L'arricchimento del palmitato della DSPC è stato misurato al GC-IRMS (67, 71). Gli esteri metilici sono stati iniettati in colonna Ultra 2 (25m, 0.20 id, 0.33 micron; J&W Agilent Technologies, Milano, Italia) e separati con una rampa che parte da 120°C e poi, a 15°C/min raggiunge i 300°C per rimanerci 1 minuto.

I risultati sono stati espressi in atom percent excess (MPE) di palmitato con la seguente formula (75, 76)

$$(\text{Incremento di delta nella DSPC})/\text{ora} \cdot 24 / (\text{delta delle urine} \cdot 0.647059)$$

Dove 0.647059 è il fattore di correzione per la incorporazione massima di deuteri in una molecola di palmitato. Ogni campione è stato analizzato in triplicato.

Isolamento e derivatizzazione della leucina dall' SP-B

La frazioni 3 e 4 sono state unite, portate a secco e idrolizzate a 100°C per 24 ore con 0.5 ml di HCl 6N. Gli aminoacidi ottenuti sono poi stati derivatizzati nei loro derivati N-acetyl-n-propilici (77).

Analisi in GC-MS della leucina dell' SP-B

I campioni con la leucina derivatizzata sono stati iniettati in modalità splitless in una colonna capillare HP-5 MS (60m, 0.25 id, 0.25 micron; J&W Agilent Technologies, Milano, Italia). Gli arricchimenti sono misurati con un GC-MS (Voyager, Thermoquest, Milano, Italia) e sono stati espressi in mol percent excess (MPE) in riferimento ad una curva di calibrazione per 1^{13}C -leucina.

Arricchimento plasmatico della leucina

Cento microlitri di plasma sono stati deproteinizzati con acido sulfosalicilico (6% p/p) e gli aminoacidi plasmatici sono stati derivatizzati secondo Husek (78). L'arricchimento plasmatici della leucina è stato misurato con le stesse modalità di quello della leucina dell' SP-B.

Arricchimento urinario di $^2\text{H}_2\text{O}$

Cento microlitri di urina sono stati deproteinizzati con 3mg di acido sulfosalicilico, il campione, lasciato in ghiaccio per 10 minuti, è stato centrifugato per 10 minuti a 2100 g,

il surnatante è stato trasferito in una vial; 0.1µl del campione sono stati iniettati al TC-EA/IRMS (Thermo Finnigan MAT, Brema, Germania) in triplicato.

I risultati sono stati espressi come δ ‰ per ogni campione tenendo conto della diluizione. Tali valori sono poi stati trasformati in APE in base ad una curva di calibrazione (70).

Tutti i risultati sono stati espressi in MPE (arricchimento palmitato DSPC e arricchimento $^2\text{H}_2\text{O}$) o arricchimento leucina SP-B e leucina plasmatici) che rappresentano, rispettivamente, l'aumento percentuale molecole (MPE) di tracciante (^2H -palmitato e di ^{13}C -leucina) presenti nella DSPC e nella leucina.

CALCOLI

I seguenti parametri della DSPC e della SP-B del surfattante sono stati calcolati con l'uso dell'acqua deuterata e della leucina come traccianti:

- a. Fractional synthesis rate (FSR), rappresenta la frazione in percentuale di SP-B e DSPC marcate, sintetizzate a partire dal loro pool totale (espressa come percentuale sintesi/giorno). Si ottiene dividendo la pendenza dell'incremento lineare dell'arricchimento dei traccianti per lo steady state dell'arricchimento dei traccianti per lo steady state dell'arricchimento plasmatico dei rispettivi traccianti (66, 67, 70, 71).
- b. Tempo di secrezione (ST), definito come il tempo intercorso tra l'inizio dell'infusione dei 2 traccianti e la loro prima comparsa misurabile nel prodotto arricchito. Si calcola estrapolando sull'asse delle x la retta di regressione lineare della porzione ascendente della curva di arricchimento isotopico nel tempo (66, 67, 70, 71).
- c. Tempo di picco (PT), è l'intervallo di tempo in cui l'arricchimento isotopico della DSPC e della SP-B del surfattante dopo l'inizio dell'infusione isotopica (66, 67, 70, 71).
- d. Emivita (HL), è l'intervallo di tempo in cui l'arricchimento isotopico della DSPC o della SP-B si dimezza, ed è stata calcolata dalla fase monoesponenziale della curva di decadimento nel tempo (66, 67, 70, 71).

Le variabili cliniche sono espresse come valori individuali e come mediana e range interquartile.

RISULTATI

Abbiamo studiato 9 pazienti con ARDS/ALI e 7 soggetti di controllo.

La Tabella 1 mostra le caratteristiche cliniche e i parametri ventilatori dei pazienti presi in esame.

Tabella I. Caratteristiche dei pazienti studiati: dati espressi come mediana e range interquartile

	ARDS n=6	CONTROLLI n=9	p
Maschi/Femmine (numero)	4/2	4/5	
Età (anni)	53±17	48±25	0,82
Peso corporeo (Kg)	80±17	65±17	0,07
Intubazione all'inizio dello studio (giorni)	3±1	19±25	0,28
Intubazione totale (giorni)	18±7	91±177	0,40
Durata dello studio (giorni)	7±1	8±2	0,75
Sopravvivenza a 30 giorni	100%	100%	
PIP all'inizio dello studio (cmH ₂ O)	21±5	13±4	0,03
PIP media durante lo studio(cmH ₂ O)	20±5	13±4	0,06
PEEP all'inizio dello studio(cmH ₂ O)	9±3	2±1	<0,01
PEEP media durante lo studio(cmH ₂ O)	9±2	3±0	<0,01
PaO ₂ /FiO ₂ all'inizio dello studio	194±68	416±95	<0,01
PaO ₂ /FiO ₂ media durante lo studio	228±45	407±63	<0,01
AaDO ₂ * all'inizio dello studio (mmHg)	307±123	54±38	<0,01
AaDO ₂ media durante lo studio (mmHg)	220±63	48±30	<0,01

*AaDO₂=Alveolar-arterial oxygen gradient

L'età media è comparabile nei due gruppi di pazienti, così come il peso corporeo. Tra gli ARDS, 8 sono di tipo secondario (3 insorti in seguito a politrauma e 5 in seguito a complicanze dopo intervento chirurgico) e 1 è di tipo primitivo; tra i controlli, 2 sono stati ricoverati per politrauma, 3 per emorragia cerebrale e 1 per overdose da stupefacenti. La sopravvivenza a 30 giorni dal termine dello studio è risultata essere del 100%, sia tra i pazienti con ARDS sia tra i soggetti di controllo.

Tutti i pazienti con ARDS erano in ventilazione meccanica, mentre 3 dei controlli erano in respiro spontaneo attraverso la tracheostomia; i pazienti con ARDS sono stati intubati per 3 ± 1 giorni prima dell'inizio dello studio, così come indicato nei criteri di inclusione. Gli indici di ossigenazione, derivati dai parametri ventilatori e dalla PaO_2 risultano essere diversi nei due gruppi, come atteso dal disegno dello studio. La figura 3 riporta la curva della cinetica di arricchimento della SP-B e della DSPC di un soggetto di controllo.

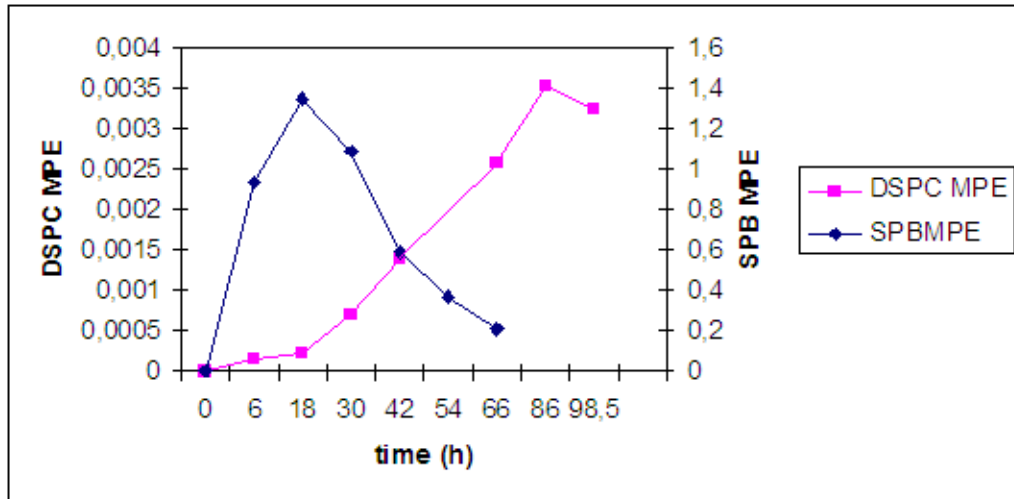


Figura 3. Curve di arricchimento isotopico della DSPC SP-B del surfactant polmonare in un soggetto di controllo.

La figura 4 riporta la curva della cinetica di arricchimento della SP-B e della DSPC di un paziente con ARDS.

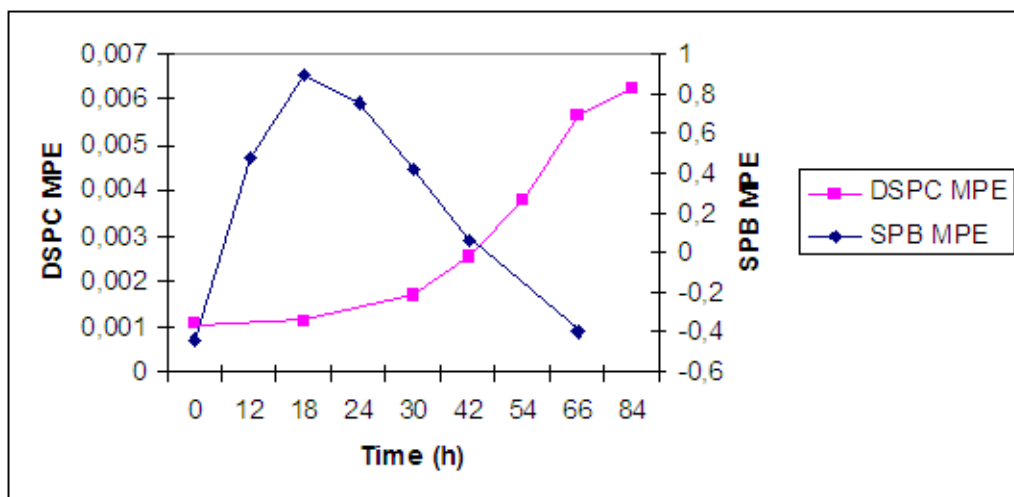


Figura 4. Curve di arricchimento isotopico della DSPC e SP-B del surfactant polmonare in un paziente con ARDS.

In tabella II sono riportati i valori di FSR, ST, PTe HL di SP-B e di DSPC, espressi come mediana e range interquartile.

Tabella II. Cinetica della SP-B e della DSPC del surfactant polmonare.

	DSPC	
	ARDS	Polmone normale
FSR (%/day)	3.90 [2.96-5.43]	3.35 [2.74-4.20]
ST (h)	10.10 [6.87-18.52]	16.07 [14.10-25.03]
PT (h)	84 [73-104]	78 [72-102]
	SP-B	
	ARDS	Polmone normale
FSR (%/day)	50 [32-64]	50 [37-70]
ST (h)	5.93 [3.27-6.24]	6.41 [4.72-6.51]
PT (h)	24 [18-24]	19.2 [23.5-24.0]
HL (h)	6.54 [5.82-13.15]	6.89 [5.59-8.54]

FSR=frazione di sintesi
ST=tempo di secrezione

PT=tempo di picco
HL=emivita

La FSR della DSPC espressa in percentuale nelle 24 ore presenta una mediana pari a 3.90 [2.96-5.43]/%die e 3.35 [2.74-4.20]/%die rispettivamente nei soggetti con ARDS o ALI e senza patologia polmonare.

Il tempo intercorso dall'inizio dello studio, e quindi dal bolo di $^2\text{H}_2\text{O}$, alla comparsa del tracciante nella DSPC (ST) presenta una mediana pari a 10.10 [6.87-18.52] ore e 16.07 [14.10-25.03] ore rispettivamente nei pazienti con ARDS o ALI e senza patologia polmonare.

Il massimo arricchimento isotopico della DSPC (PT), espresso come ore dall'inizio dello studio, presenta in tutti i soggetti con ARDS o ALI un valore di 84 [73-104] ore, nei soggetti senza patologia polmonare invece il valore medio è pari a 78 [72-102] ore.

La FSR media della SP-B è pari a 50 [32-64]/%die e 50 [37-70]/%die rispettivamente nei soggetti con ARDS o ALI e senza patologia polmonare.

L'ST della SP-B presenta un valore medio pari a 5.93 [3.27-6.24] ore nei pazienti con ARDS o ALI e 6.41 19.2 [23.5-24.0] ore nei soggetti senza patologia polmonare.

Il PT della SP-B si ha dopo 24 [18-24] ore nei soggetti con ARDS o ALI, e dopo $28,8 \pm 8,9$ ore in quelli senza patologia polmonare.

L'emivita della SP-B è pari a 6.54 [5.82-13.15] ore e 6.89 [5.59-8.54] ore rispettivamente nei pazienti con ARDS o ALI e nei soggetti senza patologia polmonare.

DISCUSSIONE

In questo lavoro abbiamo studiato, per la prima volta, dati sulla cinetica e la sintesi della SP-B e della DSPC misurate con isotopi stabili *in vivo* nell'adulto. Per il ruolo di primaria importanza che la SP-B e la DSPC svolgono nel mantenimento della funzione del surfactant (1, 24), noi crediamo che questa metodica di studio possa diventare uno strumento utile ed importante che permetterà di acquisire nuove e preziose informazioni sul ruolo di DSPC e SP-B nello studio della fisiopatologia polmonare nell'uomo.

È ben noto, da studi su modelli animali e da studi in vivo nell'uomo, che in corso di ARDS il surfactant va incontro a un processo di inattivazione (61, 79, 80). I meccanismi conosciuti che contribuiscono all'inattivazione del surfactant sono l'edema proteinaceo alveolare, l'idrolisi dei fosfolipidi del surfactant da parte della fosfolipasi A₂ secretoria liberata dai macrofagi e dai leucociti neutrofilo nello spazio alveolare, la distruzione delle cellule alveolari di tipo II e il danno specifico alle proteine del surfactant da parte delle proteasi rilasciate dai leucociti neutrofilo (4, 81, 82).

Le alterazioni delle caratteristiche biofisiche e della composizione biochimica del surfactant riportate da molti studi hanno suggerito l'uso di surfactant esogeno come terapia nell'ARDS nel tentativo di supplirne la carenza in corso di ARDS e di convertire l'inattivazione del surfactant. I risultati di trials clinici che hanno trattato con surfactant soggetti con ARDS hanno fornito dati contrastanti (83, 84). Questi risultati suggeriscono che altri meccanismi patogenetici oltre alla carenza di surfactant innescano il danno polmonare e perpetuano l'inattivazione del surfactant.

Per tale motivo la misura della cinetica delle componenti specifiche del surfactant costituisce un mezzo insostituibile per studiare la patogenesi del danno polmonare.

I risultati indicano che i processi metabolici della DSPC e della SP-B hanno un diverso andamento nell'ARDS ma anche nei soggetti di controllo. Mentre la produzione di DSPC è un processo lento che richiede alcuni giorni per un completo rinnovo del pool, la produzione di SP-B è un processo estremamente rapido e il rinnovo del pool avviene in non più di 24 h.

La cinetica della DSPC nei soggetti con ARDS è risultata inferiore solo dello 0.3% per giorno rispetto al gruppo di controllo, suggerendo che il processo di sintesi e secrezione della maggior componente fosfolipidica del surfactant non è inibito durante la fase acuta dell'ARDS. E' comunque dimostrato che il pool della DSPC delle vie aeree è circa 10 volte inferiore rispetto a soggetti senza malattia polmonare (nei pazienti con ARDS è 0,16 vs 1,31 mg/kg nei soggetti di controllo) (85). Se questo fosse vero anche nei nostri pazienti la sintesi della DSPC sarebbe molto inferiore rispetto ai controlli, per una minor diluizione isotopica della DSPC-Palmitato deuterata. Ulteriori studi con l'uso di isotopi stabili per via endovenosa ed endotracheale sono necessari per confermare questa ipotesi (86). In ogni caso un minor pool-size di DSPC presente nei polmoni dei pazienti con ARDS è anche dovuto ad un'inattivazione della stessa a causa del processo infiammatorio. Questo è stato dimostrato in modelli animali con il riscontro di un'aumentata attività della fosfolipasi A2 e dell'acyl-CoA:lisofosfolipid-aciltransferasi in topi con complicazioni polmonari da peritonite sperimentale (80); probabili cause possono essere l'aumento della perossidazione degli acidi grassi e la produzione di metaboliti tossici dell'ossigeno da parte dei macrofagi alveolari e dei granulociti neutrofilici (87-89).

Dal confronto dei dati relativi alla cinetica della SP-B nei soggetti con polmone normale e con ARDS o ALI si può notare solo una modesta diminuzione del tempo di secrezione nei soggetti con ARDS, mentre la FSR, l'emivita e il picco di maggior arricchimento sono sostanzialmente paragonabili nei due gruppi.

E' ben noto però che nel BAL di questi soggetti il pool di SP-B è molto basso (61, 79). Perciò la FSR potrebbe essere più bassa in valore assoluto perché il tracciante viene diluito con un pool di SP-B minore. La diminuzione del pool-size di SP-B nei pazienti con ARDS può essere dovuta ad una diminuzione della sintesi della pro-SP-B: durante il processo infiammatorio acuto, infatti, la sintesi della pro-SP-B è inibita, come dimostrato da studi su modelli animali che correlano un'aumentata attività dell'ossido nitrico sintasi 2 (NOS2) (90) e un'aumentata espressione di TNF- α , IL-1 α , IL-6 e IFN- α (91) con una diminuita espressione di SP-B nel BAL di topi con ALI esposti all'endotossina polisaccaridica (LPS); è da notare però che in questi lavori viene stimata solo l'espressione dell'mRNA dell'SP-B, e questo non permette di comprendere se a valle di questo processo vi siano dei meccanismi di compenso alla diminuita espressione

genica. Il nostro studio invece valuta la produzione del prodotto finale, cioè dell'SP-B dimerica secreta e presente sulla superficie alveolare.

Si può inoltre ipotizzare che la proteina SP-B nell'ARDS/ALI sia ridotta non tanto per un'inibizione del processo metabolico cellulare, bensì per l'inattivazione/lisi dell'SP-B matura sulla superficie alveolare, che può essere attaccata da enzimi litici o da radicali liberi dell'ossigeno secreti dalle cellule infiammatorie (37).

Limiti dello studio

Sicuramente il numero di pazienti studiati è troppo piccolo per poter fare qualsiasi considerazione clinica basata sull'evidenza. Il principale messaggio sorretto dalla mia tesi vuole essere che è possibile misurare la cinetica della DSPC e della SP-B *in vivo* nell'uomo con la tecnica che si avvale dell'uso di isotopi stabili, e inoltre che risultati ripetibili e confrontabili possono essere ottenuti nello stesso tipo di pazienti.

Per questa tesi non ci è stato possibile analizzare gli indici infiammatori per valutare il grado di infiammazione polmonare; studi futuri saranno indirizzati a dimostrare nell'uomo la correlazione diretta tra i meccanismi di flogosi polmonare e le alterazioni nella cinetica del surfactant.

BIBLIOGRAFIA

1. Goerke J 1998 Pulmonary surfactant: functions and molecular composition. *Biochim Biophys Acta* 1408:79-89.
2. Notter R 2000 Lung surfactants. Basic science and clinical applications. Marcel Dekker Inc. New York.
3. Martin JA, Hamilton BE, Ventura SJ, Menacker F, Park MM 2002 Births: final data for 2000. *Natl Vital Stat Rep* 50:1-101.
4. Ware LB, Matthay MA 2000 The acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 342:1334-1349.
5. McIntyre RC, Jr., Pulido EJ, Bensard DD, Shames BD, Abraham E 2000 Thirty years of clinical trials in acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med* 28:3314-3331.
6. Gunther A, Ruppert C, Schmidt R, Markart P, Grimminger F, Walmrath D, Seeger W 2001 Surfactant alteration and replacement in acute respiratory distress syndrome. *Respir Res* 2:353-364.
7. Lewis JF, Veldhuizen R 2003 The role of exogenous surfactant in the treatment of acute lung injury. *Annu Rev Physiol* 65:613-642.
8. Lewis JF, Veldhuizen RA 2006 The future of surfactant therapy during ALI/ARDS. *Semin Respir Crit Care Med* 27:377-388.
9. Haitisma JJ, Papadakos PJ, Lachmann B 2004 Surfactant therapy for acute lung injury/acute respiratory distress syndrome. *Curr Opin Crit Care* 10:18-22.
10. Weibel ER, Gil J 1968 Electron microscopic demonstration of an extracellular duplex lining layer of alveoli. *Respir Physiol* 4:42-57.
11. Untersee P, Gil J, Weibel ER 1971 Visualization of extracellular lining layer of lung alveoli by freeze-etching. *Respir Physiol* 13:171-185.
12. Poulain FR, Allen L, Williams MC, Hamilton RL, Hawgood S 1992 Effects of surfactant apolipoproteins on liposome structure: implications for tubular myelin formation. *Am J Physiol* 262:L730-739.
13. Benson BJ, Hawgood S, Williams MC 1984 Role of apoprotein and calcium ions in surfactant function. *Exp Lung Res* 6:223-236.
14. Nag K, Munro JG, Hearn SA, Rasmusson J, Petersen NO, Possmayer F 1999 Correlated atomic force and transmission electron microscopy of nanotubular structures in pulmonary surfactant. *J Struct Biol* 126:1-15.

15. Williams MC 1982 Ultrastructure of tubular myelin and lamellar bodies in fast-frozen adult rat lung. *Exp Lung Res* 4:37-46.
16. Baritussio AG, Magoon MW, Goerke J, Clements JA 1981 Precursor-product relationship between rabbit type II cell lamellar bodies and alveolar surface-active material. Surfactant turnover time. *Biochim Biophys Acta* 666:382-393.
17. Veldhuizen R, Possmayer F 2004 Phospholipid metabolism in lung surfactant. *Subcell Biochem* 37:359-388.
18. Possmayer F 1988 A proposed nomenclature for pulmonary surfactant-associated proteins. *Am Rev Respir Dis* 138:990-998.
19. Persson A, Chang D, Rust K, Moxley M, Longmore W, Crouch E 1989 Purification and biochemical characterization of CP4 (SP-D), a collagenous surfactant-associated protein. *Biochemistry* 28:6361-6367.
20. Wright JR, Clements JA 1987 Metabolism and turnover of lung surfactant. *Am Rev Respir Dis* 136:426-444.
21. Voorhout WF, Veenendaal T, Kuroki Y, Ogasawara Y, van Golde LM, Geuze HJ 1992 Immunocytochemical localization of surfactant protein D (SP-D) in type II cells, Clara cells, and alveolar macrophages of rat lung. *J Histochem Cytochem* 40:1589-1597.
22. Creuwels LA, van Golde LM, Haagsman HP 1997 The pulmonary surfactant system: biochemical and clinical aspects. *Lung* 175:1-39.
23. Nieman GF, Bredenberg CE 1985 High surface tension pulmonary edema induced by detergent aerosol. *J Appl Physiol* 58:129-136.
24. Weaver TE 1998 Synthesis, processing and secretion of surfactant proteins B and C. *Biochim Biophys Acta* 1408:173-179.
25. Hack M, Wright LL, Shankaran S, Tyson JE, Horbar JD, Bauer CR, Younes N 1995 Very-low-birth-weight outcomes of the National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Network, November 1989 to October 1990. *Am J Obstet Gynecol* 172:457-464.
26. Jobe A 1998 Surfactant-edema interactions. The pathogenesis and treatment of pulmonary edema. Armond Futura Publishing:113-131.
27. Glasser SW, Korfhagen TR, Weaver T, Pilot-Matias T, Fox JL, Whitsett JA 1987 cDNA and deduced amino acid sequence of human pulmonary surfactant-associated proteolipid SPL(Phe). *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:4007-4011.

28. Weaver TE, Whitsett JA 1989 Processing of hydrophobic pulmonary surfactant protein B in rat type II cells. *Am J Physiol* 257:L100-108.
29. Weaver TE, Conkright JJ 2001 Function of surfactant proteins B and C. *Annu Rev Physiol* 63:555-578.
30. Hawgood S, Derrick M, Poulain F 1998 Structure and properties of surfactant protein B. *Biochim Biophys Acta* 1408:150-160.
31. deMello DE, Heyman S, Phelps DS, Hamvas A, Noguee L, Cole S, Colten HR 1994 Ultrastructure of lung in surfactant protein B deficiency. *Am J Respir Cell Mol Biol* 11:230-239.
32. Pryhuber GS, Hull WM, Fink I, McMahan MJ, Whitsett JA 1991 Ontogeny of surfactant proteins A and B in human amniotic fluid as indices of fetal lung maturity. *Pediatr Res* 30:597-605.
33. Gregory TJ, Longmore WJ, Moxley MA, Whitsett JA, Reed CR, Fowler AA, 3rd, Hudson LD, Maunder RJ, Crim C, Hyers TM 1991 Surfactant chemical composition and biophysical activity in acute respiratory distress syndrome. *J Clin Invest* 88:1976-1981.
34. Frerking I, Gunther A, Seeger W, Pison U 2001 Pulmonary surfactant: functions, abnormalities and therapeutic options. *Intensive Care Med* 27:1699-1717.
35. Spragg R 2007 Surfactant for acute lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* 37:377-378.
36. Griese M, Beck J 1999 The interaction of phosphatidylcholine with alveolar type II pneumocytes is dependent on its physical state. *Exp Lung Res* 25:577-594.
37. Manzanares D, Rodriguez-Capote K, Liu S, Haines T, Ramos Y, Zhao L, Doherty-Kirby A, Lajoie G, Possmayer F 2007 Modification of tryptophan and methionine residues is implicated in the oxidative inactivation of surfactant protein B. *Biochemistry* 46:5604-5615.
38. Bakshi MS, Zhao L, Smith R, Possmayer F, Petersen NO 2008 Metal nanoparticle pollutants interfere with pulmonary surfactant function in vitro. *Biophys J* 94:855-868.
39. Windsor AC, Mullen PG, Fowler AA, Sugerman HJ 1993 Role of the neutrophil in adult respiratory distress syndrome. *Br J Surg* 80:10-17.

40. Turcotte JG, Sacco AM, Steim JM, Tabak SA, Notter RH 1977 Chemical synthesis and surface properties of an analog of the pulmonary surfactant dipalmitoyl phosphatidylcholine. *Biochim Biophys Acta* 488:235-248.
41. Holm BA, Notter RH, Finkelstein JN 1985 Surface property changes from interactions of albumin with natural lung surfactant and extracted lung lipids. *Chem Phys Lipids* 38:287-298.
42. Holm BA, Enhorning G, Notter RH 1988 A biophysical mechanism by which plasma proteins inhibit lung surfactant activity. *Chem Phys Lipids* 49:49-55.
43. Holm BA, Venkitaraman AR, Enhorning G, Notter RH 1990 Biophysical inhibition of synthetic lung surfactants. *Chem Phys Lipids* 52:243-250.
44. Holm BA, Wang Z, Notter RH 1999 Multiple mechanisms of lung surfactant inhibition. *Pediatr Res* 46:85-93.
45. Zasadzinski JA, Alig TF, Alonso C, de la Serna JB, Perez-Gil J, Taeusch HW 2005 Inhibition of pulmonary surfactant adsorption by serum and the mechanisms of reversal by hydrophilic polymers: theory. *Biophys J* 89:1621-1629.
46. Taeusch HW, de la Serna JB, Perez-Gil J, Alonso C, Zasadzinski JA 2005 Inactivation of pulmonary surfactant due to serum-inhibited adsorption and reversal by hydrophilic polymers: experimental. *Biophys J* 89:1769-1779.
47. Rennard SI, Basset G, Lecossier D, O'Donnell KM, Pinkston P, Martin PG, Crystal RG 1986 Estimation of volume of epithelial lining fluid recovered by lavage using urea as marker of dilution. *J Appl Physiol* 60:532-538.
48. Offenstadt G, Pinta P, Masliah J, Alcindor LG, Hericord P, Amstutz P 1981 Phospholipase and pro-phospholipase activities in bronchoalveolar lavage fluid in severe acute pulmonary disease with or without ARDS. *Intensive Care Med* 7:285-290.
49. Nogee LM, de Mello DE, Dehner LP, Colten HR 1993 Brief report: deficiency of pulmonary surfactant protein B in congenital alveolar proteinosis. *N Engl J Med* 328:406-410.
50. Hamvas A, Nogee LM, Mallory GB, Jr., Spray TL, Huddleston CB, August A, Dehner LP, deMello DE, Moxley M, Nelson R, Cole FS, Colten HR 1997 Lung transplantation for treatment of infants with surfactant protein B deficiency. *J Pediatr* 130:231-239.

51. Dunbar AE, 3rd, Wert SE, Ikegami M, Whitsett JA, Hamvas A, White FV, Piedboeuf B, Jobin C, Guttentag S, Nogee LM 2000 Prolonged survival in hereditary surfactant protein B (SP-B) deficiency associated with a novel splicing mutation. *Pediatr Res* 48:275-282.
52. Dean M, Rzhetsky A, Allikmets R 2001 The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res* 11:1156-1166.
53. Yamano G, Funahashi H, Kawanami O, Zhao LX, Ban N, Uchida Y, Morohoshi T, Ogawa J, Shioda S, Inagaki N 2001 ABCA3 is a lamellar body membrane protein in human lung alveolar type II cells. *FEBS Lett* 508:221-225.
54. Shulenin S, Nogee LM, Annilo T, Wert SE, Whitsett JA, Dean M 2004 ABCA3 gene mutations in newborns with fatal surfactant deficiency. *N Engl J Med* 350:1296-1303.
55. Ban N, Matsumura Y, Sakai H, Takanezawa Y, Sasaki M, Arai H, Inagaki N 2007 ABCA3 as a lipid transporter in pulmonary surfactant biogenesis. *J Biol Chem* 282:9628-9634.
56. Matsuzaki Y, Besnard V, Clark JC, Xu Y, Wert SE, Ikegami M, Whitsett JA 2008 STAT3 regulates ABCA3 expression and influences lamellar body formation in alveolar type II cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 38:551-558.
57. Xu Y, Ikegami M, Wang Y, Matsuzaki Y, Whitsett JA 2007 Gene expression and biological processes influenced by deletion of Stat3 in pulmonary type II epithelial cells. *BMC Genomics* 8:455.
58. Bernard GR, Artigas A, Brigham KL, Carlet J, Falke K, Hudson L, Lamy M, Legall JR, Morris A, Spragg R 1994 The American-European Consensus Conference on ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. *Am J Respir Crit Care Med* 149:818-824.
59. Hallman M, Spragg R, Harrell JH, Moser KM, Gluck L 1982 Evidence of lung surfactant abnormality in respiratory failure. Study of bronchoalveolar lavage phospholipids, surface activity, phospholipase activity, and plasma myoinositol. *J Clin Invest* 70:673-683.
60. Pison U, Seeger W, Buchhorn R, Joka T, Brand M, Obertacke U, Neuhof H, Schmit-Neuerburg KP 1989 Surfactant abnormalities in patients with respiratory failure after multiple trauma. *Am Rev Respir Dis* 140:1033-1039.
61. Gunther A, Siebert C, Schmidt R, Ziegler S, Grimminger F, Yabut M, Temmesfeld B, Walmrath D, Morr H, Seeger W 1996 Surfactant alterations in

- severe pneumonia, acute respiratory distress syndrome, and cardiogenic lung edema. *Am J Respir Crit Care Med* 153:176-184.
62. Schmidt R, Meier U, Yabut-Perez M, Walmrath D, Grimminger F, Seeger W, Gunther A 2001 Alteration of fatty acid profiles in different pulmonary surfactant phospholipids in acute respiratory distress syndrome and severe pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 163:95-100.
 63. Greene KE, Wright JR, Steinberg KP, Ruzinski JT, Caldwell E, Wong WB, Hull W, Whitsett JA, Akino T, Kuroki Y, Nagae H, Hudson LD, Martin TR 1999 Serial changes in surfactant-associated proteins in lung and serum before and after onset of ARDS. *Am J Respir Crit Care Med* 160:1843-1850.
 64. Gunther A, Schmidt R, Feustel A, Meier U, Pucker C, Ermert M, Seeger W 1999 Surfactant subtype conversion is related to loss of surfactant apoprotein B and surface activity in large surfactant aggregates. Experimental and clinical studies. *Am J Respir Crit Care Med* 159:244-251.
 65. Schmidt R, Markart P, Ruppert C, Wygrecka M, Kuchenbuch T, Walmrath D, Seeger W, Guenther A 2007 Time-dependent changes in pulmonary surfactant function and composition in acute respiratory distress syndrome due to pneumonia or aspiration. *Respir Res* 8:55.
 66. Bunt JE, Zimmermann LJ, Wattimena JL, van Beek RH, Sauer PJ, Carnielli VP 1998 Endogenous surfactant turnover in preterm infants measured with stable isotopes. *Am J Respir Crit Care Med* 157:810-814.
 67. Cogo PE, Carnielli VP, Bunt JE, Badon T, Giordano G, Zacchello F, Sauer PJ, Zimmermann LJ 1999 Endogenous surfactant metabolism in critically ill infants measured with stable isotope labeled fatty acids. *Pediatr Res* 45:242-246.
 68. Torresin M, Zimmermann LJ, Cogo PE, Cavicchioli P, Badon T, Giordano G, Zacchello F, Sauer PJ, Carnielli VP 2000 Exogenous surfactant kinetics in infant respiratory distress syndrome: A novel method with stable isotopes. *Am J Respir Crit Care Med* 161:1584-1589.
 69. Cogo P, Baritussio A, Rosso F, Gucciardi A, Moretti V, Badon T, Duner E, Zimmermann L, Carnielli VP 2005 Surfactant-associated protein B kinetics in vivo in newborn infants by stable isotopes. *Pediatr Res* 57:519-522.
 70. Cogo PE, Gucciardi A, Traldi U, Hilker AW, Verlato G, Carnielli V 2005 Measurement of pulmonary surfactant disaturated-phosphatidylcholine synthesis

- in human infants using deuterium incorporation from body water. *J Mass Spectrom* 40:876-881.
71. Cogo PE, Zimmermann LJ, Rosso F, Tormena F, Gamba P, Verlato G, Baritussio A, Carnielli VP 2002 Surfactant synthesis and kinetics in infants with congenital diaphragmatic hernia. *Am J Respir Crit Care Med* 166:154-158.
 72. Paschen C, Griese M 2005 Quantitation of surfactant protein B by HPLC in bronchoalveolar lavage fluid. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 814:325-330.
 73. Bartlett G 1958 Phosphorus assay in column chromatography. *J Biol Chem* 253:466-468.
 74. Mason RJ, Nellenbogen J, Clements JA 1976 Isolation of disaturated phosphatidylcholine with osmium tetroxide. *J Lipid Res* 17:281-284.
 75. Jones PJ 1996 Tracing lipogenesis in humans using deuterated water. *Can J Physiol Pharmacol* 74:755-760.
 76. Ajie HO, Connor MJ, Lee WN, Bassilian S, Bergner EA, Byerley LO 1995 In vivo study of the biosynthesis of long-chain fatty acids using deuterated water. *Am J Physiol* 269:E247-252.
 77. Metges CC, Petzke KJ, Hennig U 1996 Gas chromatography/combustion/isotope ratio mass spectrometric comparison of N-acetyl- and N-pivaloyl amino acid esters to measure ¹⁵N isotopic abundances in physiological samples: a pilot study on amino acid synthesis in the upper gastro-intestinal tract of minipigs. *J Mass Spectrom* 31:367-376.
 78. Husek P 1991 Amino acid derivatization and analysis in five minutes. *FEBS Lett* 280:354-356.
 79. Nakos G, Kitsioulis EI, Tsangaris I, Lekka ME 1998 Bronchoalveolar lavage fluid characteristics of early intermediate and late phases of ARDS. Alterations in leukocytes, proteins, PAF and surfactant components. *Intensive Care Med* 24:296-303.
 80. Lazarov S, Yanev E, Momchilova A, Markovska T, Ivanova L, Pankov R 2007 Alterations of the composition and metabolism of pulmonary surfactant phospholipids induced by experimental peritonitis in rats. *Chem Biol Interact* 169:73-79.
 81. Fisher AB, Dodia C 2001 Lysosomal-type PLA2 and turnover of alveolar DPPC. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 280:L748-754.

82. Baker CS, Evans TW, Randle BJ, Haslam PL 1999 Damage to surfactant-specific protein in acute respiratory distress syndrome. *Lancet* 353:1232-1237.
83. Spragg RG, Lewis JF, Wurst W, Hafner D, Baughman RP, Wewers MD, Marsh JJ 2003 Treatment of acute respiratory distress syndrome with recombinant surfactant protein C surfactant. *Am J Respir Crit Care Med* 167:1562-1566.
84. Wiswell TE, Smith RM, Katz LB, Mastroianni L, Wong DY, Willms D, Heard S, Wilson M, Hite RD, Anzueto A, Revak SD, Cochrane CG 1999 Bronchopulmonary segmental lavage with Surfaxin (KL(4)-surfactant) for acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 160:1188-1195.
85. Cogo PE, Toffolo GM, Ori C, Vianello A, Chierici M, Gucciardi A, Cobelli C, Baritussio A, Carnielli VP 2007 Surfactant disaturated-phosphatidylcholine kinetics in acute respiratory distress syndrome by stable isotopes and a two compartment model. *Respir Res* 8:13.
86. Cogo PE, Zimmermann LJ, Verlato G, Midrio P, Gucciardi A, Ori C, Carnielli VP 2004 A dual stable isotope tracer method for the measurement of surfactant disaturated-phosphatidylcholine net synthesis in infants with congenital diaphragmatic hernia. *Pediatr Res* 56:184-190.
87. Matute-Bello G, Liles WC, Radella F, 2nd, Steinberg KP, Ruzinski JT, Jonas M, Chi EY, Hudson LD, Martin TR 1997 Neutrophil apoptosis in the acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 156:1969-1977.
88. Larosa SP 2002 Sepsis: menu of new approaches replaces one therapy for all. *Cleve Clin J Med* 69:65-73.
89. von Wichert P, Temmesfeld M, Meyer W 1981 Influence of septic shock upon phosphatidylcholine remodeling mechanism in rat lung. *Biochim Biophys Acta* 664:487-497.
90. Baron RM, Carvajal IM, Fredenburgh LE, Liu X, Porrata Y, Cullivan ML, Haley KJ, Sonna LA, De Sanctis GT, Ingenito EP, Perrella MA 2004 Nitric oxide synthase-2 down-regulates surfactant protein-B expression and enhances endotoxin-induced lung injury in mice. *Faseb J* 18:1276-1278.
91. Ingenito EP, Mora R, Cullivan ML, Marzan Y, Haley KJ, Mark L, Sonna LA 2001 Decreased surfactant protein-B expression and surfactant dysfunction in a murine model of acute lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* 25:35-44.

