



**UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA**

DOTTORATO DI RICERCA XIV Ciclo
Curriculum:
SCIENZE BIOLOGICHE E CLINICHE SPECIALISTICHE

**CINETICA E METABOLISMO DEGLI STEROLI VEGETALI
NEL NEONATO PRETERMINE**

Dottorando:
Dott. Daniele Pupillo

Relatore:
Chiar.^{mo} Prof. Virgilio P. Carnielli

Triennio 2012-2015

INDICE

1. INTRODUZIONE	pag. 5
1.1 La nutrizione Parenterale nel Bambino Pretermine	pag. 5
1.2 I Fitosteroli	pag. 7
1.3 Assorbimento intestinale e concentrazioni plasmatiche dei fitosteroli	pag. 8
1.4 Distribuzione ed escrezione plasmatica dei fitosteroli	pag. 11
1.5 Attività benefiche dei fitosteroli	pag. 12
1.6 Effetti indesiderati dei fitosteroli	pag. 14
1.7. Tecniche Analitico-Strumentali	pag. 16
1.7.a Gascromatografia	pag. 16
1.7.b Spettrometria di massa	pag. 17
BIBLIOGRAFIA	pag. 21
OBIETTIVO DELLA TESI	pag. 26
2. L'ESTERIFICAZIONE DEI FITOSTEROLI È FORTEMENTE RIDOTTA NEI NEONATI PREMATURI CHE RICEVONO NUTRIZIONE PARENTERALE	pag. 27
2.1 Materiali e metodi	pag. 28
2.1.a Bambini pretermine	pag. 28
2.1.b Adulti	pag. 28
2.1.c Raccolta e conservazione dei campioni	pag. 29
2.1.d Metodi analitici	pag. 29
2.1.e Analisi statistica	pag. 31

2.2 Risultati	pag. 31
2.3 Discussioni	pag. 33

BIBLIOGRAFIA	pag. 40
---------------------	----------------

3. CINETICA DEL METABOLISMO DEI FITOSTEROLI NEI NEONATI PREMATURI CHE ASSUMONO EMULSIONI LIPICHE A BASE DI OLIO DI SOIA PER VIA ENDOVENOSA	pag. 43
---	----------------

3.1 Materiali e metodi	pag. 44
3.1.a Disegno dello studio	pag. 44
3.1.b Caratteristiche dei Pazienti	pag. 44
3.1.c Analisi chimica dei Pazienti	pag. 46
3.1.d Analisi statistica	pag. 47
3.1.e Analisi Farmacocinetica	pag. 48

3.2 Risultati	pag. 49
3.2.a Valori di emivita nei pazienti senza colestasi	pag. 49
3.2.b Valori di emivita nei pazienti con colestasi	pag. 51

3.3 Discussioni	pag. 52
------------------------	----------------

BIBLIOGRAFIA	pag. 59
---------------------	----------------

1. INTRODUZIONE

1.1 La nutrizione Parenterale nel Bambino Pretermine

Il 93% delle nascite ha un normale esito fisiologico che è definito “a termine”, cioè il parto avviene solo dopo il compimento della 37^a settimana di gestazione. A volte durante il periodo della gravidanza possono insorgere diverse circostanze che condizionano il normale sviluppo della gravidanza come ad esempio gemellarità (12%), morti fetali (3%), malformazioni (14%), problematiche sconosciute (6%), parto pretermine spontaneo (55%) e iatrogeno (20%), cioè effettuato per indicazione medica in seguito a patologie materne o gravidiche che richiedono l'interruzione della gravidanza. In queste circostanze, che si manifestano in circa il 7% dei casi, si hanno delle nascite definite pretermine. Il 20% dei bambini pretermine, nascono con un peso molto basso (VLBW, Very Low Birth Weight Infants: <1500 g) o estremamente basso (ELBW, Extremely Low Birth Weight: <1000 g). Fortunatamente il continuo studio e progresso delle cure in ambito neonatologico unitamente ad un crescente interesse nei confronti dell'aspetto nutrizionale, ha permesso di aumentare la sopravvivenza dei neonati con basso peso alla nascita.

A questi pazienti, già dalla nascita, sono somministrati dei nutrienti bilanciati tramite la nutrizione parenterale (NP) per garantire un corretto sviluppo e che in futuro, permetta loro, di riuscire a tollerare la nutrizione enterale (NE).

Si ricorre alla nutrizione parenterale quando nel bambino prematuro, a causa della sua immaturità, non si sono sviluppate tutte le funzioni intestinali che garantiscono un corretto assorbimento dei nutrienti (malassorbimento), nei casi di necrosi intestinale in cui è richiesto un intervento chirurgico seguito da un periodo di “riposo intestinale” minimizzando i movimenti peristaltici per salvaguardare l'anastomosi termino-terminale. Bisogna specificare che la NP è accompagnata dalla minimal enteral feeding (MEF) cioè una nutrizione enterale minima, indispensabile per lo sviluppo delle normali funzioni fisiologiche e peristaltiche intestinali, infatti, la MEF migliora lo sviluppo del tratto gastrointestinale, la liberazione di ormoni intestinali e la motilità dell'intestino (1).

L'alimentazione enterale nei bambini VLBW inizia con l'assunzione del latte materno somministrato fin dal primo giorno di vita, se le condizioni cliniche lo consentono, con un volume di 1-2 ml ogni sei ore. La quota enterale sarà progressivamente aumentata.

Questa, in seguito, sostituirà la NP divenendo l'unica fonte energetica del neonato. Da ciò possiamo comprendere come la NP, nel neonato pretermine, sia di fondamentale importanza per la sua sopravvivenza. Questa tecnica nutritiva è stata introdotta nel 1960 e consente di somministrare i vari nutrienti bypassando l'assorbimento intestinale. Nei pretermine la soluzione ipertonica di nutrienti è infusa a velocità costante attraverso i vasi percutanei o tramite quelli ombelicali centrali. Tale scelta è in funzione dello stato di salute o secondo le esigenze di ogni paziente, considerando che non vi sono differenze clinicamente rilevanti tra le due somministrazioni (2).

Le nutrizioni parenterali contengono sia macronutrienti (glucosio, lipidi, amminoacidi) sia micronutrienti (vitamine e microelementi). Le emulsioni lipidiche utilizzate nella composizione delle nutrizioni parenterali costituiscono un'importante fonte energetica necessaria alla crescita del paziente, limitando l'apporto di glucosio e proteine. Esse forniscono principalmente acidi grassi a media e lunga catena, tra cui in particolare l'acido linoleico (LA) e linolenico (ALA), precursori degli acidi grassi polinsaturi a lunga catena (LC-PUFA). L'apporto lipidico di queste emulsioni deriva da diverse fonti vegetali come ad esempio l'olio di oliva, l'olio di soia con o senza trigliceridi a media catena, oppure l'olio di pesce contenente LC-PUFA.

Se da un lato la nutrizione parenterale svolge un ruolo salvavita in quei pazienti che non possono essere alimentati per via enterale (3-6), dall'altro possono insorgere delle complicanze come, ad esempio, la colestasi associata alla nutrizione parenterale (PNAC) (5, 7-12), oppure nei pazienti in cui tale nutrizione viene prolungata nel tempo possono insorgere stati patologici come sepsi, cirrosi, disfunzioni epatiche e coagulopatia (13). Un'altra complicanza che può essere successiva alla PNAC è il danno epatico associato alla nutrizione parenterale (PNALD). Questa ha un'etiologia poco chiara (14), ma è comune nei neonati pretermine (15, 16). Le cause possono essere multifattoriali, come la durata della nutrizione parenterale, la prematurità, la sepsi, il basso peso alla nascita o la presenza

dei fitosteroli (FS) (15, 17).

1.2 I Fitosteroli

I fitosteroli, o steroli vegetali, sono molecole lipidiche di origine vegetale. Questi non sono sintetizzati dall'uomo, ma vengono assunti dalla dieta. L'olio di soia, oliva e girasole sono ricchi di fitosteroli, altre fonti sono la frutta a guscio, i cereali, i fagioli e i chicchi di grano. Tra i vegetali possiamo annoverare i broccoli, cavolini di Bruxelles, cavolfiori, olive verdi e nere (Tabella 1). Pur essendo di origine vegetale, i fitosteroli sono chimicamente molto simili al colesterolo, infatti, condividono la stessa struttura chimica di base, lo Sterolo.

Lo sterolo è un composto policiclico formato da 4 anelli condensati: tre a 6 atomi di carbonio e uno a 5 atomi di carbonio. Questa struttura è chimicamente definita Ciclopentanoperidrofenantrene (**Figura 1**).

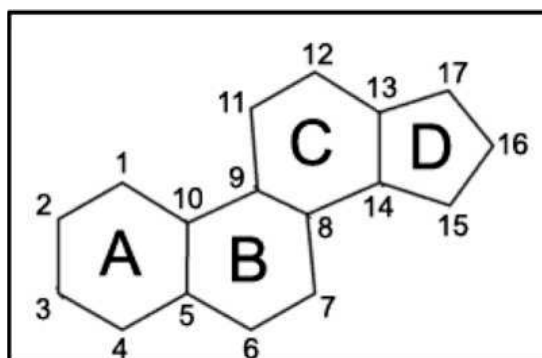


Figura 1: Struttura dello Sterolo.

Presenta una caratteristica funzione alcolica in posizione 3 sull'anello A, una catena ramificata in posizione C17 dell'anello D e rappresenta il precursore degli steroidi. Sono lipidi anfipatici sintetizzati dall'acetil-CoA. Secondo la loro origine vegetale o animale, vengono classificati rispettivamente come fitosteroli o zoosteroli. Tra i principali zoosteroli ritroviamo il colesterolo e alcuni ormoni steroidei (derivanti dalla vitamina D3 come il Colecalciferolo), mentre, i fitosteroli più comuni e riscontrabili nell'uomo, sebbene siano

una famiglia molto numerosa che conta più di 250 tipi diversi, sono il campesterolo (CA), stigmasterolo (ST) e β -sitosterolo (SI) (**Figura 2**).

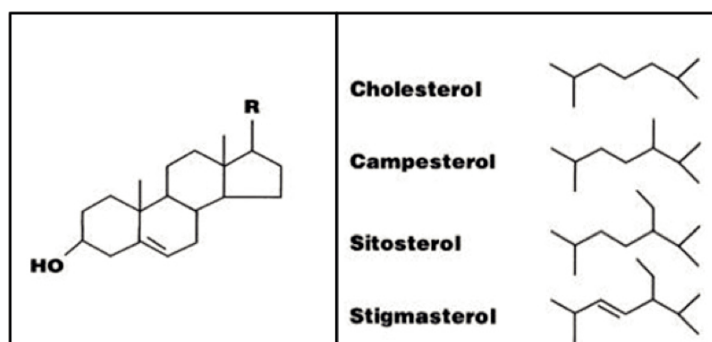


Figura 2: Struttura dei Fitosteroli e del Colesterolo.

I fitosteroli sono costituiti da 4 anelli condensati e da una lunga catena laterale flessibile in corrispondenza dell'atomo di carbonio C-17. Presentano una caratteristica funzione alcolica in posizione 3 sull'anello A (**Figura 1**). I fitostanoli, gli analoghi saturi, hanno una struttura simile a quella dei fitosteroli, ma sono privi del doppio legame tra 5 e 6 nell'anello B. Dal colesterolo differiscono per la presenza di gruppi metilici o etilici nella catena laterale in corrispondenza del carbonio C-24. L'apporto dietetico degli steroli vegetali non è lo stesso per tutti e tre, infatti, il β -sitosterolo ha un contributo del 65%, il campesterolo del 30% e infine lo stigmasterolo con un 3% (18). Il tasso di assorbimento dei fitosteroli ingeriti con la dieta è molto basso in condizioni normali, con valori tra i 150-350 mg/die con una dieta onnivora, a 500 mg/die in una dieta vegetariana (19). I valori di fitostanoli rimangono invece molto più bassi 50 mg/die (20).

1.3 Assorbimento intestinale e concentrazioni plasmatiche dei fitosteroli

Come detto in precedenza, i fitosteroli e il colesterolo hanno una struttura simile. Questa somiglianza, tuttavia, non si mantiene quando si valuta il loro assorbimento in seguito ad assunzione orale. Tenuto conto delle differenze fisiologiche esistenti da individuo a individuo, il colesterolo è assorbito con una percentuale che va dal 20% all'80%, mentre l'assorbimento netto dei fitosteroli è di circa il 2-5%, con un'eliminazione pari al 95%. Da

ciò è facilmente intuibile che i livelli plasmatici di fitosteroli siano molto bassi (0,10-0,14% rispetto al colesterolo). I fitostanoli vengono assorbiti in modo ancora meno efficiente ed i loro livelli ematici sono pari a un decimo di quelli dei fitosteroli (21). Studi recenti hanno dimostrato che, in condizioni normali, il tasso di assorbimento intestinale di FS è inversamente proporzionale alla lunghezza della catena laterale (22).

I fitosteroli e il colesterolo che raggiungono l'intestino tenue, sono introdotti o con la dieta, o attraverso il circolo entero-epatico. Questi, in seguito, sono solubilizzati in micelle miste (insieme a fosfolipidi, acidi grassi e acidi biliari) dopo l'idrolisi degli esteri promossa dalle lipasi pancreatiche. Quest'ultimo processo è fondamentale per la solubilizzazione degli steroli nella loro forma libera all'interno delle micelle. All'interno delle micelle, gli steroli e le altre componenti idrofobiche, attraversano lentamente la barriera acquosa che riveste la membrana apicale degli enterociti (orletto a spazzola), procedendone all'interno. La micella quindi penetra l'enterocita con diffusione passiva attraverso la membrana portando la forma libera del colesterolo e dei fitosteroli al loro interno. Sia il colesterolo sia i FS, possono entrare all'interno dell'enterocita, anche tramite il trasportatore di membrana recentemente scoperto, Niemann-Pick C1 Like 1 Protein (NPC1L1). Questo ha la stessa affinità per i FS e per il colesterolo ed è responsabile dell'entrata delle molecole idrofobiche all'interno dell'enterocita (23). NPC1L1 è altamente espresso a livello intestinale, con una concentrazione massima nell'area prossimale dell'intestino del ratto dove l'assorbimento è elevato, e pressoché scarsa a livello dell'ileo, seguendo così, un gradiente decrescente lungo l'asse gastro-colico (24). Nell'uomo, a differenza del ratto, NPC1L1, è altamente espresso a livello epatico e intestinale. Il suo ruolo potrebbe essere quello di veicolare il colesterolo presente nella bile all'interno degli epatociti. L'ipotesi è che la funzione del trasportatore NPC1L1, nel fegato, sia di protezione dell'organismo da un'eccessiva perdita di colesterolo con la bile. In particolare la presenza di NPC1L1 sulla membrana canalicolare può modulare finemente l'escrezione del colesterolo nella bile, controbilanciando l'azione opposta dei trasportatori ABCG5/G8 (24). Quindi NPC1L1 media l'afflusso di colesterolo in entrata, mentre i trasportatori ABCG5/G8 regolano il deflusso, in uscita, del colesterolo. Mutazioni nel gene NPC1, codificante per l'omonima

proteina, possono indurre l'insorgenza di una rara patologia autosomica recessiva che prende il nome di malattia di Niemann-Pick di tipo C. Questa patologia promuove un importante sviluppo di disturbi neurologici progressivi e, a livello biochimico, fa sì che vi sia un accumulo di lipidi a livello endosomiale e lisosomiale (colesterolo, sfingolipidi, gangliosidi) nel sistema nervoso e nel fegato. Tale accumulo lipidico è tossico per le cellule neuronali a dimostrazione delle manifestazioni principalmente neurologiche di tale patologia (24). Una volta entrati nell'enterocita una piccola aliquota di colesterolo è utilizzata dagli enterociti, mentre la maggior parte viene esterificata ad opera dell'enzima AcilCoA-Colesterolo Acil-Transferasi-2 (ACAT2), ed incorporata all'interno dei chilomicroni insieme alle apolipoproteine e i triacilgliceroli. La catena laterale dei FS è responsabile della loro secrezione selettiva dall'enterocita nel lumen intestinale, mediata dai trasportatori trans-membrana, ABCG5 e ABCG8, adenosina trifosfato dipendenti (ATP binding-cassette ABC) (25). Questi trasportatori ABC, accoppiati alla proteina G, sono proteine di membrana impiegati nel trasporto attivo. Per svolgere le loro funzioni fisiologiche devono formare tra loro un eterodimero (ABCG5-ABCG8). L'espressione dei geni ABCG5 e ABCG8 è regolata dal contenuto intracellulare di colesterolo e/o di derivati ossidati del colesterolo (ossisteroli) (24). La trascrizione di questi trasportatori attivi è mediata dal recettore epatico Liver X (LXR). La funzione del complesso ABCG5-ABCG8, è quella di promuovere l'efflusso dei FS e del colesterolo. Il colesterolo e i FS non esterificati sono pompate direttamente nel lume intestinale ed eliminati in questo modo dall'enterocita. Studi recenti suggeriscono che ABCG5 e ABCG8 giocano un ruolo fondamentale nel fegato regolando la secrezione biliare degli steroli (FS e colesterolo) (26). È dimostrato, infatti, che i fitosteroli non sono metabolizzati ad acidi biliari nel fegato e che la velocità di escrezione è opposta a quella di assorbimento (20, 21, 27). ABCG5 e ABCG8 svolgono, da un lato, un ruolo di "difesa" nei confronti del colesterolo e degli steroli vegetali presenti negli alimenti, riducendo il loro assorbimento e quindi l'ingresso nell'organismo, dall'altro mediano la secrezione biliare dei FS che sono entrati nel torrente circolatorio e del colesterolo. Questa è una delle principali vie attraverso cui il colesterolo endogeno è eliminato dall'organismo, evitando quindi l'eccessivo accumulo di colesterolo

intraepatico. Dobbiamo evidenziare che all'interno dell'enterocita, una piccola aliquota di FS è esterificata dalle ACAT, incorporata nei chilomicroni insieme al colesterolo e quindi assorbita. L'esterificazione intestinale di steroli operata da ACAT è molto meno efficiente per i FS rispetto al colesterolo (26). Di conseguenza, i livelli plasmatici di FS nell'uomo sono normalmente circa lo 0,5% rispetto a quelli del colesterolo, a causa sia della sintesi endogena nel fegato del colesterolo sia dell'assorbimento meno efficiente dei FS nell'intestino tenue. Gli stanoli vegetali hanno concentrazioni plasmatiche dello 0,05% se confrontate a quelle del colesterolo (27).

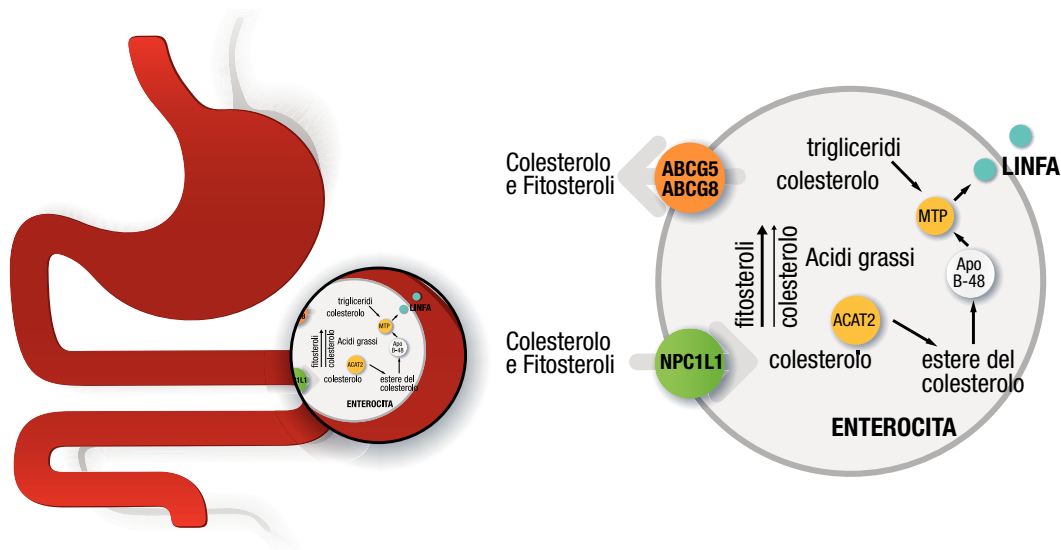


Figura 3: Uptake enterocitario degli steroli assunti con la dieta.

1.4 Distribuzione ed escrezione plasmatica dei fitosteroli

I FS e il colesterolo una volta esterificati da ACAT all'interno dell'enterocita vengono internalizzati nei chilomicroni. Recentemente è stato dimostrato che gli enterociti assemblano non solo chilomicroni ma anche lipoproteine ad alta densità (HDL). Esistono quindi meccanismi multipli che possono essere suddivisi sommariamente in: vie dipendenti da ApoB (chilomicroni) e vie indipendenti da ApoB (HDL). Tali vie sono tra loro complementari e probabilmente agiscono di concerto assicurando un efficiente trasporto dei lipidi assorbiti. Una volta all'interno del torrente circolatorio, i FS sono trasportati al fegato tramite chilomicroni, come il colesterolo. In modelli sperimentali,

tuttavia, solo il 12% dei FS (rispetto al 70-80% del colesterolo assorbito) sono trasportati in forma esterificata nei chilomicroni e quindi assorbiti. Una volta raggiunto il fegato, il colesterolo e i FS sono secreti nel sangue all'interno di lipoproteine, le VLDL insieme a un enzima glicoproteico, LCAT (lecitina-colesterolo acetil-tranferasi). Questo enzima catalizza l'aggiunta di acidi grassi polinsaturi agli steroli liberi promuovendo in questo modo la conversione delle VLDL in LDL. Oltre a questa funzione nota come β -attività, LCAT è coinvolto nell'esterificazione degli steroli liberi delle HDL garantendo così il gradiente lipoproteina-cellula necessario per il trasporto inverso del colesterolo (α -attività). Un'aliquota di colesterolo e FS contenuta nelle VLDL si trova in forma esterificata ad opera dell'enzima ACAT2 epatico.

La percentuale di FS e di colesterolo esterificato in VLDL e LDL è essenzialmente identica. Le HDL, al contrario, hanno un maggiore rapporto di FS/colesterolo rispetto alle LDL e VLDL, suggerendo che i FS sono preferenzialmente trasportati da queste particelle (HDL) (26). Considerando che l'associazione FS-HDL sembra essere selettivamente secreta nella bile e che, il rapporto FS/colesterolo, è solitamente superiore nella bile che nel plasma, questi dati indicano che le lipoproteine HDL svolgono un ruolo importante nella rimozione di FS dal corpo (28). A livello cellulare, i FS vengono stoccati nel citoplasma o incorporati nella membrana cellulare. Questi svolgono un ruolo funzionale sconosciuto a livello biologico (26). L'escrezione dei FS assorbiti è rapida e avviene principalmente attraverso il percorso biliare, mentre una frazione minore viene escreta attraverso l'epidermide. I dati sulla biosintesi degli acidi biliari a partire dai FS sono contrastanti. Studi recenti indicano che, dopo aver perso la loro catena laterale, i FS sono catabolizzati, come il colesterolo, nei diversi organi (26).

1.5 Attività benefiche dei fitosteroli

Il primo effetto benefico conosciuto fin dagli anni cinquanta risiede nel loro effetto ipocolesterolemizzante (29). I primi studi furono eseguiti da Pollak che osservò come la somministrazione di sitosterolo poteva ridurre l'assorbimento del colesterolo (30). In

seguito, negli anni settanta, Grundy dimostrò che una dose pari a 3g/die, aveva un effetto ipocolesterolemizzante analogo a quello ottenuto, negli anni precedenti, somministrando una dose massiva di FS (10-20g/die) (31). Recenti studi hanno dimostrato che, l'effetto della riduzione del colesterolo è dose-dipendente ed ha un andamento curvilineo. Gli steroli e stanoli vegetali, con la loro maggiore idrofobicità, sono incorporati più efficacemente del colesterolo nelle micelle miste che si formano nel lumen intestinale. La riduzione della concentrazione di colesterolo micellare ha come conseguenza una minore captazione del colesterolo da parte dell'enterocita. I fitosteroli interferiscono con i normali meccanismi responsabili dell'omeostasi intracellulare del colesterolo, che dipende da vari fattori fra cui l'attività dei trasportatori ABCG5/G8, la cui attivazione porta all'efflusso dei FS e del colesterolo dall'enterocita e quindi alla loro eliminazione nelle feci (26). Diversi lavori hanno evidenziato che il consumo di 1g di FS giornaliero può ridurre il colesterolo con effetto clinicamente rilevabile (32, 33). Alla luce di questi dati si è infine determinato che, la dose raccomandata di fitosteroli è di 2g/die, per ottenere una riduzione significativa di colesterolo. Non ci sono differenze se i FS vengono assunti in unica somministrazione o se l'apporto sia frazionato in più dosi durante l'arco della giornata (34-36). Secondariamente i FS riducono il rischio d'infarto e d'ischemia riducendo l'assorbimento di colesterolo. Diversi studi hanno evidenziato la correlazione esistente tra alti valori di colesterolo (>240mg/dL) e l'insorgenza di tali patologie che sono tra le maggiori cause di morte nei paesi industrializzati. Studi di tossicità, condotti su diversi modelli animali (ratti, cani, conigli) con miscele di fitosteroli o fitostanoli di varia origine, non hanno evidenziato nessun effetto tossicologico rilevante, a parte alcune modifiche minori in parametri ematologici e clinico-chimici.

Steroli e stanoli non sono risultati genotossici né negli studi condotti in vitro né nei ratti in vivo. Non c'è inoltre evidenza di effetti teratogeni sia per gli steroli sia per gli stanoli (33).

In particolare, il Comitato Scientifico per l'Alimentazione (SCF) della Comunità Europea prima e il Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA) dell'European Food Safety Authority (EFSA) poi, hanno stabilito che il consumo di fitosteroli può considerarsi sicuro purché gli alimenti contenenti fitosteroli non siano consumati in quantità tali da

fornire più di 3 g/die (37).

1.6 Effetti indesiderati dei fitosteroli

I fitosteroli non hanno solo effetti benefici, diversi articoli evidenziano infatti il loro ruolo nell'insorgenza di diverse patologie, come la colestasi (7, 19, 38, 39), specialmente nei bambini pretermine soggetti a lunghi periodi di nutrizione parenterale. Sebbene le conoscenze riguardo al metabolismo delle emulsioni lipidiche somministrate a livello parenterale siano limitate nel bambino pretermine, è noto che, come si accennava in precedenza, uno degli effetti avversi dei FS sia l'insorgenza della PNAC. La colestasi può insorgere in seguito ad un difetto della secrezione biliare o a causa dell'ostruzione meccanica dei canali biliari. La colestasi può presentarsi in forma intraepatica o extraepatica, generando un ostacolo al deflusso della bile con conseguente riassorbimento e accumulo nel sangue di bilirubina, determinando così lo stato itterico e la ritenzione dei sali biliari con conseguente prurito. La ritenzione di bilirubina produce un ittero a iperbilirubinemia mista con emissione di pigmenti biliari coniugati nelle urine; le feci spesso sono acromiche perché una scarsa quantità di bilirubina raggiunge l'intestino. Il prurito è spesso imputato agli elevati livelli di sali biliari circolanti, ma la correlazione è scarsa e la sua patogenesi rimane oscura (40). L'aggravarsi della PNAC comporta infiammazione a livello epatico e, in seguito, possono insorgere altre complicazioni che generano la PNALD. La sua eziologia non è ancora chiara (15), è comune nei prematuri sottoposti a NP (16) e la sua insorgenza ha cause multifattoriali, come la durata della parenterale, il basso peso alla nascita, sepsi e prematurità (15). Anche i FS sembrerebbero attivamente coinvolti nel generare la PNALD (14, 17). Come spiegato in precedenza, il nostro organismo, a livello intestinale, è dotato di un meccanismo tale da eliminare quasi completamente (per più del 95%) gli steroli assunti con la dieta. La somministrazione parenterale degli steroli, bypassa questo meccanismo di eliminazione. Ciò comporta un aumento della concentrazione di FS nel sangue, causando stress epatico, e deteriorando i normali meccanismi di escrezione (9, 10). Alti livelli plasmatici di fitosteroli possono indurre un effetto tossico, infatti lo stigmasterolo, ma non

il β -sitosterolo e il campesterolo, può antagonizzare il recettore nucleare FXR degli acidi biliari con un meccanismo dose-dipendente, provocando una riduzione dell'espressione dei geni e delle proteine coinvolte nell'escrezione della bilirubina e degli acidi biliari, causando la ritenzione di questi e inducendo così danno epatico, sepsi, coagulopatia e morte (13, 14, 17). I sitosterolemici, cioè pazienti affetti da una mutazione a carico dei trasportatori ABCG5/G8, non sono in grado di eliminare gli steroli. Secondo alcuni studi, i fitosteroli, in determinate circostanze, non soltanto risulterebbero inefficaci per la riduzione del rischio cardiovascolare, ma addirittura potrebbero favorire i processi aterosclerotici con conseguente aumento del rischio di incorrere in patologie quali ictus, infarto miocardico e altre patologie di tipo cardiovascolare. Alti livelli di fitosteroli circolanti possono indurre patologie cardiovascolari (41). Non solo i FS sono responsabili dell'insorgenza di alcuni effetti indesiderati, ma anche il veicolo in cui sono disciolti ha degli effetti avversi, infatti, la soia, può generare episodi d'ipersensibilità e fenomeni allergici (37). I FS possono anche inibire l'enzima colesterolo 7 α -idrossilasi che catalizza la conversione del colesterolo in acidi biliari (42-44).

1.7 Tecniche analitico-strumentali

1.7.a Gascromatografia

La gas-cromatografia (GC) è una tecnica analitica ad alto potere risolutivo, che consente la separazione delle sostanze sfruttando le loro proprietà chimico-fisiche come la temperatura di ebollizione, la polarità e le dimensioni delle molecole. Questa tecnica utilizza una fase stazionaria (solida o liquida) e una fase mobile, cioè un gas di trasporto inerte, generalmente elio (He) o azoto (N₂). La separazione avviene grazie alla diversa affinità degli analiti presenti nel campione, di ripartirsi tra la fase stazionaria e quella mobile. Variando la temperatura, ogni componente del campione, si ripartisce in maniera differente tra la fase stazionaria e la fase vapore, venendo quindi eluito in tempi diversi. L'introduzione della miscela nella colonna cromatografica richiede la vaporizzazione del campione in esame. Se le sostanze non sono sufficientemente volatili, è necessario, prima dell'introduzione del campione nel gas cromatografo, derivatizzarle in modo da modificare la polarità delle molecole, abbassandone il punto di ebollizione. Un gas cromatografo è composto da diverse parti, in ordine troviamo per primo l'iniettore che nel nostro laboratorio è accoppiato ad un autocampionatore. Una volta lanciata la sequenza dal computer, mediante la compilazione dell'apposito spazio dedicato presente nel software in dotazione, l'autocampionatore preleva la vial corrispondente, la porta all'iniettore che provvede ad iniettarla. Il campione entra in una camera (liner) ad alta temperatura (250-280°C) dove, prima di entrare in colonna, passa allo stato gassoso. Quindi i diversi composti contenuti nel campione sono spinti dal gas carrier all'interno della colonna ed eluiranno in tempi differenti in base alle loro caratteristiche chimico-fisiche, e quindi alla loro capacità di interagire con la fase stazionaria, prima di raggiungere il sistema di rivelazione. Quelli più frequentemente associati ad un gas-cromatografo sono: rivelatori a ionizzazione di fiamma (FID) o spettrometri di massa (MS).

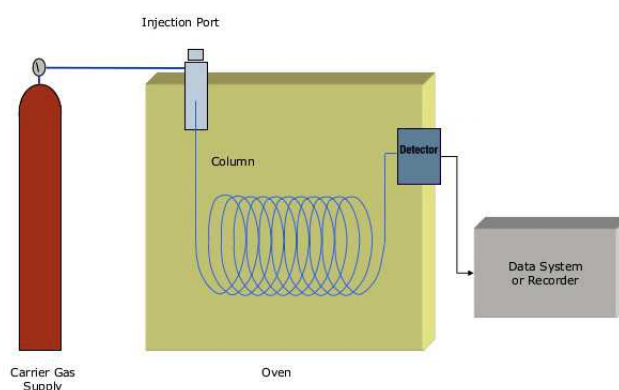


Figura 4: Schema di un gas cromatografo.

1.7.b Spettrometria di massa

È una tecnica analitica che permette di separare una miscela di ioni in funzione del loro rapporto massa/carica sfruttando campi magnetici statici o oscillanti. Questa miscela è ottenuta colpendo le molecole contenute nel campione con un fascio di elettroni all'interno della sorgente di ionizzazione. La sorgente a impatto elettronico (EI), opera sotto vuoto spinta alla pressione di 10^{-6} mmHg, ed ha all'interno un filamento di tungsteno incandescente che emette un fascio di elettroni. Questi accelerati verso un anodo posto dalla parte opposta al filamento, acquistano un'elevata energia (circa 70eV). Quando questi elettroni vengono a contatto con la sfera elettronica di una molecola le trasferiscono la loro energia, provocando l'espulsione di un elettrone con formazione di un radical-catione (ione molecolare) $M+^{\bullet}$. Tutti gli ioni positivi vengono respinti da una piastra, tenuta ad un potenziale positivo, verso una serie di piastre forate, a potenziale positivo crescente, dette piastre acceleratrici. Nel loro tragitto gli ioni subiscono un'accelerazione. Gli ioni neutri che si formano non sono rilevati.

Questo tipo di ionizzazione è definita *hard*; gli ioni vengono generati ad un livello energetico molto alto e si possono avere frammentazioni estese dello ione molecolare. Il campione arriva quindi all'analizzatore che è costituito da quattro barre cilindriche metalliche, lunghe circa 20 cm, che delimitano il "cammino" percorso dagli ioni

provenienti dalla camera di ionizzazione e diretti al detector. Le barre sono mantenute ad un potenziale elettromagnetico oscillante, di modo che quando le due barre verticali hanno un potenziale positivo, quelle orizzontali abbiano un potenziale negativo, e viceversa. Gli ioni positivi, accelerati dalle piastre, entrano nel tunnel delimitato dalle barre e sono respinti dai poli positivi e attratti da quelli negativi. Gli ioni, con un rapporto m/z tale da acquisire un'energia cinetica che renda il loro moto sinusoidale, escono dal tunnel formato dalle barre cilindriche e arrivano al detector. Come detector si usa un fotomoltiplicatore elettronico, costituito da una serie di elettrodi a cascata. Quando uno ione arriva sul primo elettrodo, questo emette un fascio di elettroni che vanno a colpire il secondo elettrodo, il quale a sua volta emette una quantità maggiore di elettroni e andrà a colpire il successivo e così via. Il risultato è una forte amplificazione del segnale che viene poi digitalizzato ed elaborato dal calcolatore dello spettrometro per la presentazione dello spettro di massa.

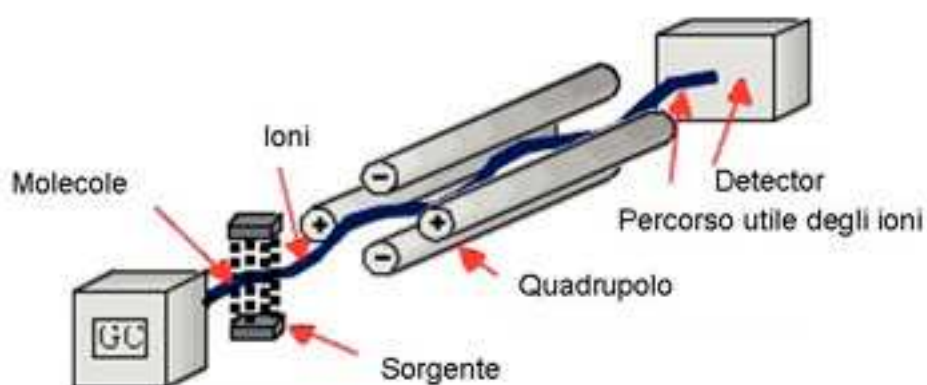


Figura 5: Elementi di uno spettrometro di massa.

Tabella 1. Contenuto medio di steroli e stanoli vegetali* in vari alimenti (mg/100g).

Alimento	Steroli/stanoli totali (mg/100g)*
Grassi e olii	
Margarina	217 (92 - 721)
Olio di arachide	258
Olio di colza	668
Olio di germe di grano	919
Olio di girasole	411
Olio di mais	909
Olio di oliva	154
Olio di palma	39
Olio di soia	320
Olio di vinaccioli	215
Frutta a guscio e semi	
Arachidi	104
Mandorle	183
Nocciole	138
Noci	127
Pistacchi	276
Semi di sesamo	360
Semi di girasole	300
Cereali	
Frumento	69
Frumento (farina)	28
Frumento (farina integrale)	70
Frumento (crusca)	200
Frumento (pane)	44
Frumento (pane integrale)	86
Frumento (germe)	344
Grano saraceno (farina)	99
Mais (farina)	52
Riso	30
Riso (farina)	23
Segale	69
Segale (farina)	86
Corn flakes	22
Muesli	63
Riso soffiato	20
Crackers	67

Alimento	Steroli/stanoli totali (mg/100g)*
Frutta	
Ananas	17
Anguria	1
Arance	24
Clementine	16
Fichi	22
Frutti della passione	44
Limoni	18
Kiwi	9
Mele	13
Melone	2
Pere	12
Pesche	15
Pompelmo	18
Vegetali	
Broccoli	39
Carote	16
Cavolini di Bruxelles	43
Cavolfiore	40
Cipolle	8
Finocchi	10
Funghi	18
Olive, verdi	35
Olive, nere	50
Patate (bollite)	4
Peperoni, verdi	7
Pomodori	5
Porri	8
Sedani	17

BIBLIOGRAFIA

1. Lucas A, Bloom SR, Aynsley-Green A. Gut hormones and 'minimal enteral feeding'. *Acta paediatrica Scandinavica*. 1986;75(5): 719-23.
2. Shulman RJ, Pokorny WJ, Martin CG, Pettitt R, Baldaia L, Roney D. Comparison of percutaneous and surgical placement of central venous catheters in neonates. *Journal of pediatric surgery*. 1986;21(4): 348-50.
3. Dudrick SJ, Wilmore DW, Vars HM, Rhoads JE. Long-term total parenteral nutrition with growth, development, and positive nitrogen balance. *Surgery*. 1968;64(1): 134-42.
4. Irving M. Intestinal failure. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2000;15 Suppl: G26-9.
5. Feng Q. [Risk factors for parenteral nutrition-associated cholestasis in neonates]. *Zhongguo dang dai er ke za zhi = Chinese journal of contemporary pediatrics*. 2014;16(7): 670-3.
6. Mirtallo J, Canada T, Johnson D, Kumpf V, Petersen C, Sacks G, et al. Safe practices for parenteral nutrition. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. 2004;28(6): S39-70.
7. Bindl L, Lutjohann D, Buderus S, Lentze MJ, v Bergmann K. High plasma levels of phytosterols in patients on parenteral nutrition: a marker of liver dysfunction. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2000;31(3): 313-6.
8. D'Apolito O, Pianese P, Salvia G, Campanozzi A, Pettoello-Mantovani M, Dello Russo A, et al. Plasma levels of conjugated bile acids in newborns after a short period of parenteral nutrition. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. 2010;34(5): 538-41.
9. Nghiem-Rao TH, Tunc I, Mavis AM, Cao Y, Polzin EM, Firary MF, et al. Kinetics of phytosterol metabolism in neonates receiving parenteral nutrition. *Pediatr Res*. 2015;78(2): 181-9.
10. Pianese P, Salvia G, Campanozzi A, D'Apolito O, Dello Russo A, Pettoello-Mantovani M, et al. Sterol profiling in red blood cell membranes and plasma of newborns receiving total

- parenteral nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2008;47(5): 645-51.
11. Teitelbaum DH, Tracy T. Parenteral nutrition-associated cholestasis. *Semin Pediatr Surg.* 2001;10(2): 72-80.
 12. Kelly DA. Liver complications of pediatric parenteral nutrition-epidemiology. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif).* 1998;14(1): 153-7.
 13. Carter BA, Taylor OA, Prendergast DR, Zimmerman TL, Von Furstenberg R, Moore DD, et al. Stigmasterol, a soy lipid-derived phytosterol, is an antagonist of the bile acid nuclear receptor FXR. *Pediatr Res.* 2007;62(3): 301-6.
 14. Zaloga GP. Phytosterols, Lipid Administration, and Liver Disease During Parenteral Nutrition. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 2015;39(1 Suppl): 39s-60s.
 15. Kurvinen A, Nissinen MJ, Andersson S, Korhonen P, Ruuska T, Taimisto M, et al. Parenteral plant sterols and intestinal failure-associated liver disease in neonates. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2012;54(6): 803-11.
 16. Premkumar MH, Carter BA, Hawthorne KM, King K, Abrams SA. High rates of resolution of cholestasis in parenteral nutrition-associated liver disease with fish oil-based lipid emulsion monotherapy. *J Pediatr.* 2013;162(4): 793-8.e1.
 17. El Kasmi KC, Anderson AL, Devereaux MW, Vue PM, Zhang W, Setchell KD, et al. Phytosterols promote liver injury and Kupffer cell activation in parenteral nutrition-associated liver disease. *Sci Transl Med.* 2013;5(206): 206ra137.
 18. Patel MD, Thompson PD. Phytosterols and vascular disease. *Atherosclerosis.* 2006;186(1): 12-9.
 19. Llop JM, Virgili N, Moreno-Villares JM, Garcia-Peris P, Serrano T, Forga M, et al. Phytosterolemia in parenteral nutrition patients: implications for liver disease development. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif).* 2008;24(11-12): 1145-52.
 20. von Bergmann K, Sudhop T, Lutjohann D. Cholesterol and plant sterol absorption: recent insights. *The American journal of cardiology.* 2005;96(1a): 10d-4d.
 21. Ostlund RE, Jr. Phytosterols and cholesterol metabolism. *Current opinion in lipidology.* 2004;15(1): 37-41.

22. Heinemann T, Axtmann G, von Bergmann K. Comparison of intestinal absorption of cholesterol with different plant sterols in man. *European journal of clinical investigation*. 1993;23(12): 827-31.
23. Davis HR, Jr., Altmann SW. Niemann-Pick C1 Like 1 (NPC1L1) an intestinal sterol transporter. *Biochimica et biophysica acta*. 2009;1791(7): 679-83.
24. Letizia Bocchi SC. Nuove acquisizioni sui meccanismi di assorbimento intestinale del colesterolo Dipartimento di Scienze Biomediche, Università di Modena e Reggio Emilia, Modena.
Available from: http://www.sisalombardia.it/sisa_novitaletteratura_201005/pta6_1_assorbimento_intestinale_cholesterolo.pdf.
25. Fernandez ML, Vega-Lopez S. Efficacy and safety of sitosterol in the management of blood cholesterol levels. *Cardiovascular drug reviews*. 2005;23(1): 57-70.
26. Marangoni F, Poli A. Phytosterols and cardiovascular health. *Pharmacological research*. 2010;61(3): 193-9.
27. de Jong A, Plat J, Mensink RP. Metabolic effects of plant sterols and stanols (Review). *The Journal of nutritional biochemistry*. 2003;14(7): 362-9.
28. Plat J, Mensink RP. Plant stanol and sterol esters in the control of blood cholesterol levels: mechanism and safety aspects. *The American journal of cardiology*. 2005;96(1a): 15d-22d.
29. Ellegard LH, Andersson SW, Normen AL, Andersson HA. Dietary plant sterols and cholesterol metabolism. *Nutr Rev*. 2007;65(1): 39-45.
30. Pollak OJ. Reduction of blood cholesterol in man. *Circulation*. 1953;7(5): 702-6.
31. Grundy SM, Mok HY. Determination of cholesterol absorption in man by intestinal perfusion. *Journal of lipid research*. 1977;18(2): 263-71.
32. Hallikainen MA, Sarkkinen ES, Uusitupa MI. Plant stanol esters affect serum cholesterol concentrations of hypercholesterolemic men and women in a dose-dependent manner. *The Journal of nutrition*. 2000;130(4): 767-76.
33. Katan MB, Grundy SM, Jones P, Law M, Miettinen T, Paoletti R. Efficacy and safety of plant stanols and sterols in the management of blood cholesterol levels.

- Mayo Clinic proceedings. 2003;78(8): 965-78.
34. Plat J, van Onselen EN, van Heugten MM, Mensink RP. Effects on serum lipids, lipoproteins and fat soluble antioxidant concentrations of consumption frequency of margarines and shortenings enriched with plant stanol esters. *European journal of clinical nutrition*. 2000;54(9): 671-7.
35. Matvienko OA, Lewis DS, Swanson M, Arndt B, Rainwater DL, Stewart J, et al. A single daily dose of soybean phytosterols in ground beef decreases serum total cholesterol and LDL cholesterol in young, mildly hypercholesterolemic men. *The American journal of clinical nutrition*. 2002;76(1): 57-64.
36. Volpe R, Niittynen L, Korpela R, Sirtori C, Bucci A, Fraone N, et al. Effects of yoghurt enriched with plant sterols on serum lipids in patients with moderate hypercholesterolaemia. *The British journal of nutrition*. 2001;86(2): 233-9.
37. Roberta di Benedetto SG, Roberta Masella e Paolo Aureli Efficacia e sicurezza d'uso degli alimenti contenenti fitosteroli Centro Nazionale per la Qualità degli Alimenti e per i Rischi Alimentari- Istituto Superiore di Sanità, Viale Regina Elena 299, 00161 Roma2007. Available from: http://alimentazione.fimmg.org/approfondimenti_mese/2008/fitosteroli.pdf.
38. Iyer KR, Spitz L, Clayton P. BAPS prize lecture: New insight into mechanisms of parenteral nutrition-associated cholestasis: role of plant sterols. *British Association of Paediatric Surgeons. Journal of pediatric surgery*. 1998;33(1): 1-6.
39. Clayton PT, Whitfield P, Iyer K. The role of phytosterols in the pathogenesis of liver complications of pediatric parenteral nutrition. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif)*. 1998;14(1): 158-64.
40. MSD. Malattie del fegato e delle Vie Biliari. Available from: <http://www.msd-italia.it/altre/manuale/sez04/0380385.html>.
41. Ajagbe BO, Othman RA, Myrie SB. Plant Sterols, Stanols, and Sitosterolemia. *J AOAC Int*. 2015;98(3): 716-23.
42. Arnon R, Yoshimura T, Reiss A, Budai K, Lefkowitz JH, Javitt NB. Cholesterol 7-hydroxylase knockout mouse: a model for monohydroxy bile acid-related neonatal

- cholestasis. *Gastroenterology*. 1998;115(5): 1223-8.
43. Shefer S, Salen G, Nguyen L, Batta AK, Packin V, Tint GS, et al. Competitive inhibition of bile acid synthesis by endogenous cholestanol and sitosterol in sitosterolemia with xanthomatosis. Effect on cholesterol 7 alpha-hydroxylase. *The Journal of clinical investigation*. 1988;82(6): 1833-9.
44. Setchell KD, Schwarz M, O'Connell NC, Lund EG, Davis DL, Lathe R, et al. Identification of a new inborn error in bile acid synthesis: mutation of the oxysterol 7alpha-hydroxylase gene causes severe neonatal liver disease. *The Journal of clinical investigation*. 1998;102(9): 1690-703.

OBIETTIVO DELLA TESI

Secondo quanto emerso nelle sezioni precedenti, la comprensione del metabolismo dei FS nei pretermine in NP è importante per garantire una crescita sana dei neonati durante le prime fasi di vita. Ad oggi le informazioni sul metabolismo dei FS sono limitate e le uniche fonti bibliografiche disponibili evidenziano una correlazione diretta tra una elevata concentrazione di FS nel plasma e l'insorgenza di PNAC nei neonati. Inoltre, alte concentrazioni plasmatiche di FS sono state registrate in soggetti affetti da sitosterolemia, una patologia caratterizzata da xantoma, aterosclerosi, trombocitopenia e anemia emolitica.

In questo lavoro di tesi abbiamo studiato il metabolismo dei FS nei neonati prematuri (età gestazionale <32 settimane) con basso peso alla nascita (peso alla nascita <1250g) focalizzando la nostra attenzione sull'eliminazione di queste sostanze tossiche dall'organismo:

1-*Esterificazione dei fitosteroli*: processo catalizzato da LCAT e ACAT che ha lo scopo di rendere le molecole a base sterolica più lipofile e quindi più facilmente eliminabili attraverso la bile.

2-*Clearance plasmatica dei fitosteroli*: misurazione del tempo di dimezzamento dei FS nel plasma dopo la sospensione dell'assunzione di lipidi per via parenterale.

2. L'ESTERIFICAZIONE DEI FITOSTEROLI È FORTEMENTE RIDOTTA NEI NEONATI PREMATURI CHE RICEVONO NUTRIZIONE PARENTERALE

Sono presenti in letteratura molti studi che evidenziano l'associazione esistente tra le concentrazioni plasmatiche di fitosteroli e la gravità della PNAC (1-7). Sebbene vi siano diversi studi pubblicati, questi hanno fornito dati solo sui fitosteroli plasmatici totali (1, 8, 9), ma non sono disponibili informazioni riguardanti i fitosteroli liberi ed esterificati (F-Phy e E-Phy) negli esseri umani e negli animali durante la NP. I F-Phy e E-Phy sono stati misurati nei soggetti sani e nei pazienti con ipertrigliceridemia, sitosterolemia e sindrome di Smith-Lemli-Opitz (10-12).

Durante la NP una grande quantità di fitosteroli viene fornita attraverso la somministrazione per via endovenosa delle emulsioni lipidiche (LE) che sono miscele di oli vegetali e quindi sono ricche di fitosteroli (13). Ad oggi le informazioni sul metabolismo dei fitosteroli nell'uomo sono limitate ma sembrerebbe che i fitosteroli liberi a livello endovenoso, subiscano lo stesso processo di esterificazione del colesterolo alimentare o di quello sintetizzato a livello endogeno. Il colesterolo è esterificato negli esseri umani da due enzimi: lecitina-colesterolo acil-trasferasi (LCAT; EC 2.3.1.43) e acil-CoA-colesterolo aciltrasferasi (ACAT; EC 2.3.1.26).

LCAT è presente in concentrazioni più elevate nel plasma rispetto che nei tessuti, e trasferisce principalmente gli acidi grassi dalla posizione 2 della lecitina al colesterolo (14-16). ACAT è una proteina di membrana che catalizza una reazione in cui l'acido grasso di una molecola di acil-CoA è esterificato nel colesterolo (17). La specificità di LCAT e ACAT verso l'accettore di acile (substrato degli steroli) è stata riportata in diversi studi (18-21).

Lo scopo di questa prima parte dello studio è quello di misurare l'esterificazione dei fitosteroli e del colesterolo nei neonati pretermine in NP (P-NP) e confrontarla con adulti in NP (A-PN) e con un gruppo di controllo di adulti (A-Ctrl) in dieta libera.

2.1 MATERIALI E METODI

2.1.a Bambini pretermine

I neonati con un peso alla nascita (BW) tra 500g e 1249g, che hanno ricevuto regolarmente la NP dalla prima ora di vita, sono stati arruolati tra il gennaio 2008 e il dicembre 2012, presso l'Unità di Terapia Intensiva Neonatale (TIN) del "G. Salesi", Ospedale dei bambini di Ancona. Entrambi i sessi sono stati inclusi nello studio; i criteri di esclusione considerati sono stati: presenza di gravi malformazioni, anomalie congenite del metabolismo e grave sepsi congenita. I bambini prematuri sono stati avviati alla NP contenente glucosio, aminoacidi e lipidi dopo circa un'ora dalla nascita, secondo le linee guida TIN locali. Sono stati reclutati 184 neonati prematuri con un peso alla nascita inferiore a 1250g ma tuttavia il plasma necessario per eseguire l'analisi era sufficiente solo per 82 di essi. Questi bambini esaminati hanno ricevuto quotidianamente per via endovenosa (IV) una delle 5 LEs come parte della loro NP (**Tabella 1**). Le LEs sono state infuse seguendo le linee guida della TIN e saranno spiegate in dettaglio nel paragrafo 3.1.b. L'età gestazionale dei neonati pretermine era di 28.4 ± 2.4 settimane, il peso alla nascita era di $969,6 \pm 180,4$ g e hanno ricevuto la NP per 24.3 ± 9.8 giorni.

2.1.b Adulti

Sono stati studiati dodici adulti in NP (A-PN) per malnutrizione o insufficienza intestinale, di età compresa tra 43-79 anni, e 10 adulti sani, di età compresa tra 30-45 anni, in dieta libera (A-Ctrl). Entrambi i sessi sono stati inclusi e tutti i pazienti avevano una normale funzionalità epatica.

Tutti gli A-PN hanno ricevuto la stessa emulsione lipidica (MS LE) contenente 50% di olio di soia e 50% di trigliceridi a catena media. La MS LE è stata infusa ad una dose di $1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ in tutti i pazienti e la durata della NP al momento del campionamento era di 23.4 ± 2.4 giorni.

2.1.c Raccolta e conservazione dei campioni

Nei neonati pretermine, abbiamo raccolto 0,5 mL di sangue trattato con EDTA al settimo giorno, quando la NP era la principale fonte nutrizionale, mentre quella enterale era minima. In 10 neonati pretermine un secondo campione di sangue è stato raccolto anche dopo 24 ore di NP priva di grassi.

In A-PN, sono stati prelevati due campioni di sangue, il primo in corso di NP e il secondo 24 h dopo l'interruzione dei lipidi.

A-Ctrl sono stati campionati dopo digiuno notturno. Il sangue è stato immediatamente centrifugato a 3000 g e il pirogallolo è stato aggiunto al plasma prima di essere stoccato a -20 °C.

2.1.d Metodi analitici

Una volta scongelato il plasma a temperatura ambiente, 20 µl di una soluzione di 5α-colestano 0,25 mg/mL sono stati aggiunti a 200 µl di campione prima dell'estrazione totale lipidi.

Questa è stata effettuata utilizzando una versione modificata del metodo di Folch et al. (22). I lipidi estratti sono stati separati e assorbiti su una piastra con un sottile strato di gel di silice (TLC) e utilizzando eptano/etere isopropilico/acido acetico glaciale (60/40/3) come solvente di sviluppo. Gli steroli liberi ed esterificati sono stati raccolti grattando le rispettive sezioni della piastra di TLC e sono stati poi estratti con Folch (cloroformio/metanolo, 2/1). Siccome il 5α-colestano migra solo nella banda degli steroli esterificati, abbiamo aggiunto 20 µl di questo composto agli steroli liberi estratti, usandolo come standard interno per gli steroli esterificati e come uno standard esterno per gli steroli liberi.

La riproducibilità di questo metodo è stata testata mediante analisi di campioni di 5α-colestano in quintuplicato per ogni procedura di analisi. Il recovery di 5α-colestano ottenuto dopo l'estrazione dei lipidi è stato di $94.6 \pm 2.3\%$ e dopo TLC è stato del $77.0 \pm 4.4\%$.

I fitosteroli liberi ed esterificati sono stati misurati in triplicato in un campione di A-PN per valutare la riproducibilità del loro recovery. Sebbene non si potessero ottenere informazioni sulla perdita differenziale dei fitosteroli liberi rispetto a quelli esterificati, il coefficiente di variazione calcolata sul F-Phy/E-Phy è stato del 6,4% quando abbiamo analizzato un campione di A-PN in triplicato.

Gli esteri degli steroli sono stati saponificati con idrossido di potassio/metanolo (5M) e riscaldati a 60 °C per 1 ora. Gli steroli sono stati estratti dalla fase idroalcolica mediante estrazione liquido-liquido con un uguale volume di esano per 15 minuti sotto agitazione e dopo centrifugazione. Questa operazione è stata ripetuta una seconda volta aggiungendo dietiletere invece di esano. Esano e dietiletere sono stati rimossi sotto una leggera corrente di azoto. Duecento microlitri di LE diluita 20 volte, con 20 µl di 5 α -colestano, sono stati analizzati come descritto per i campioni di plasma. Gli steroli liberi ed esterificati sono stati derivatizzati usando una soluzione di bis (trimetilsilil) trifluoro-acetamide in piridina e un microlitro è stato analizzato mediante gas cromatografia-spettrometria di massa (GC-MS) (2, 3). L'analisi al GC-MS è stata eseguita con un apparato dell'Agilent Technologies (modello GC7890A / MD5975C).

Una colonna capillare con fase stazionaria apolare (HP-5MS, 30m x 0,25mm x 0,25 micron con un di spessore del film) è stata utilizzata per la separazione cromatografica. Il volume di iniezione è stato di 1 µl con temperatura dell'iniettore fissata a 250 °C. La temperatura del forno è stata programmata da 200 °C, tenuta per 1 minuto, fino a 275 °C con passo termico di 10 °C/min, passando poi a 280 °C con un passo di 0,1 °C/min e arrivando 300 °C a con un passo di 10 °C/min tenuti infine per 5 minuti. Gli spettri di massa sono stati ottenuti con una sorgente ad impatto elettronico (EI) ad una energia di elettroni di 70 eV e monitorati in un range 50 a 500 m/z (in modalità SCAN). La sorgente di ioni e l'analizzatore quadrupolo sono stati fissati rispettivamente a una temperatura di 230 °C e 150 °C.

Le concentrazioni degli steroli (mg/L) sono state ottenute dai rapporti di area del picco di ciascun composto rispetto allo standard, corretto dai loro relativi fattori di risposta (RRF) calcolato sulla base delle curve di calibrazione ottenute con quantità variabili di

colesterolo, campesterolo, stigmasterolo e β -sitosterolo e quantità fisse di 5 α -colestano (23).

F-Phy sono stati calcolati come somma di campesterolo, stigmasterolo e β -sitosterolo liberi mentre l'E-Phy come somma di campesterolo, stigmasterolo e β -sitosterolo esterificati.

2.1.e Analisi statistica

I dati sono stati espressi come media \pm SD e sono stati analizzati mediante l'ANOVA a una via per misure ripetute.

Differenze significative tra i gruppi sono state analizzate mediante l'analisi della varianza utilizzando il test di Bonferroni. È stato utilizzato il t-test per dati appaiati per evidenziare le differenze significative all'interno dei gruppi. Un valore di $P < 0.05$ è stato considerato significativo.

Una semplice analisi di regressione lineare è stata utilizzata per studiare le correlazioni tra le variabili. Tutte le analisi statistiche sono state effettuate utilizzando SPSS (v 15.0, SPSS Inc, Chicago, Illinois) e Microsoft Excel (v 2000; Microsoft Corp Redmond, Washington).

2.2 RISULTATI

Nessuna differenza significativa è stata osservata tra i cinque gruppi di 82 neonati pretermine studiati. Il contenuto di fitosteroli e di colesterolo nelle LE utilizzate sono riportati nella **Tabella 1**. Le concentrazioni e i rapporti del colesterolo plasmatico libero (FC), del colesterolo esterificato (CE), dei F-Phy e dei E-Phy sono riportati nella **Tabella 2**. FC era significativamente più alto nei P-PN rispetto agli A-PN e agli A-Ctrl, mentre la concentrazione del CE e del colesterolo totale plasmatico (FC + CE) erano significativamente più bassi nei P-PN rispetto agli A-PN e agli A-Ctrl. Il rapporto tra FC/CE era significativamente più alto nei P-PN che in entrambi i gruppi di adulti. Il valore plasmatico dei F-Phy era significativamente più alto nei P-PN che negli A-PN mentre E-Phy era più basso nei P-PN che negli A-PN. Non sono state evidenziate differenze tra

i P-PN e A-PN per quanto riguarda la concentrazione totale dei fitosteroli plasmatici (F-Phy + E-Phy). Gli A-Ctrl avevano una concentrazione dei F-Phy significativamente inferiore rispetto a quelli presenti nei P-PN e A-PN. I E-Phy degli A-Ctrl non erano diversi da quella dei P-PN. Il rapporto F-Phy/E-Phy era significativamente superiore nei P-PN rispetto ai due gruppi di adulti (A-PN e A-Ctrl).

I rapporti plasmatici FC/CE e F-Phy/E-Phy dei 82 neonati pretermine sono riportati nella **Tabella 3**. Nessuna differenza significativa è stata evidenziata nei rapporti di steroli tra i 5 gruppi di neonati pretermine.

I rapporti dei fitosteroli plasmatici liberi ed esterificati nei neonati pretermine, secondo le LE utilizzate e gli A-PN e gli A-Ctrl sono riportati nella **Tabella 4**.

I rapporti libero/esterificato del colesterolo, campesterolo e β -sitosterolo erano inferiori rispetto al rapporto libero/esterificato dello stigmasterolo in tutti e 5 gruppi di neonati pretermine (campesterolo e β -sitosterolo erano quindi più esterificati rispetto allo stigmasterolo). Il valore più basso del rapporto FC/CE è stato trovato nei gruppi MS e MSF mentre era uguale il rapporto libero/esterificato del campesterolo nel S, OS e MOSF. È stata trovata una differenza nei rapporti degli steroli liberi/esterificati in P-PN, A-PN e A-Ctrl. Il valore più basso FC/CE è stato trovato nei P-PN mentre non era statisticamente differente dal rapporto libero/esterificato del campesterolo e del β -sitosterolo negli A-PN e A-Ctrl. Il rapporto FC/CE era significativamente inferiore rispetto al rapporto F-Phy/E-Phy in tutti i gruppi studiati (0.9 ± 0.3^a vs 1.9 ± 0.5^b in P-PN, rispettivamente, $*P < 0.05$; 0.3 ± 0.1^a vs 0.6 ± 0.2^b in A-PN rispettivamente, $*P < 0.05$; 0.2 ± 0.1^a vs 0.6 ± 0.2^b in A-Ctrl rispettivamente, $*P < 0.05$).

I rapporti degli steroli liberi/esterificati prima e dopo la sospensione dell'infusione lipidica sono riportati in **Tabella 5**. Nessuna differenza significativa è stata evidenziata in P-PN e A-PN.

Nei neonati pretermine, il rapporto plasmatico F-Phy/E-Phy non era correlato con l'apporto cumulativo (dalla nascita fino ai 7 giorni di vita) dei fitosteroli ($r = 0.04$, $P = 0.74$; **Figura 1**). Tuttavia è stata trovata una correlazione positiva e significativa tra il rapporto FC/CE e il F-Phy/E-Phy ($r = 0.26$, $P = 0.02$; **Figura 2**).

2.3 DISCUSSIONI

La diminuzione dell'esterificazione del colesterolo nei neonati pretermine rispetto agli adulti e ai neonati a termine è stata evidenziata in studi precedenti. Questi dati sono in linea con i valori da noi ottenuti (24, 25). La marcata riduzione dell'esterificazione dei fitosteroli nei P-PN rispetto agli adulti è invece un dato innovativo e interessante. La diminuzione dell'esterificazione dei fitosteroli nei neonati pretermine non è stata influenzata dalla composizione delle emulsioni lipidiche (**Tabella 3**). Infatti va notato che, 30 dei pazienti P-PN hanno ricevuto la stessa emulsione lipidica utilizzata nel gruppo A-PN (n= 12) e tuttavia la differenza di esterificazione rimane altamente significativa (**Tabella 2**).

Negli adulti sani e nei sitosterolemici un valore più basso di esterificazione dei fitosteroli, rispetto a quello del colesterolo, è stato giustificato dal ridotto assorbimento intestinale dei fitosteroli rispetto a quello del colesterolo a causa dell'attività dei trasportatori ABCG5/ABCG8 (26). Nel presente studio, abbiamo descritto questa nuova evidenza in pazienti in totale NP, che hanno ricevuto quantità trascurabili di nutrizione enterale. A nostro avviso, la diversa esterificazione degli steroli dipende probabilmente dalla minore affinità di LCAT e ACAT per fitosteroli nei P-PN come suggerito da Connor et al. in pazienti sitosterolemici e con SLOS (10). In accordo con quello che Connor et al. hanno riportato sull'esterificazione dei fitosteroli plasmatici ad opera di LCAT (10), un'esterificazione superiore del campesterolo e β -sitosterolo rispetto allo stigmasterolo è stata evidenziata in tutti i bambini studiati (**Tabella 4**).

L'esterificazione dei fitosteroli nei neonati pretermine non era correlata con l'assunzione cumulativa di fitosteroli durante NP (**Figura 1**). Tuttavia, abbiamo trovato una correlazione tra il grado di esterificazione del colesterolo (FC/CE) e quella dei fitosteroli (F-Phy/E-Phy) come riportato nella **Figura 2**. I neonati prematuri che presentavano un'esterificazione superiore del colesterolo, avevano anche una maggiore esterificazione dei fitosteroli. Questo risultato supporta l'ipotesi che un'alta concentrazione plasmatica dei fitosteroli liberi in P-PN è collegata alla ridotta attività degli enzimi LCAT e ACAT piuttosto che alla scarsa attività dei trasportatori ABCG5/ABCG8 negli epatociti. Studi in vitro dimostrano

un più efficace trasporto ABCG5/ABCG8-mediato degli steroli liberi rispetto che quello degli steroli esterificati negli epatociti. Considerando il diverso sviluppo epatico tra gli adulti e i pretermine, è possibile che la differenza osservata dipenda da un ridotto numero o attività dei trasportatori ABCG5/G8 epatocitari (27). Tuttavia il nostro studio non è in grado di rispondere con chiarezza a questo quesito.

Inoltre il rapporto FC/CE e F-Phy/E-Phy non ha subito variazioni significative anche dopo la sospensione per 24 ore dei lipidi a livello endovenoso. Questo dato suggerisce che il rapporto FC/CE e F-Phy/E-Phy non è stato influenzato dal campionamento durante l'infusione di lipidi continua e che la clearance degli steroli è probabilmente lenta (28). Studi futuri potrebbero rispondere alla domanda se l'esterificazione dei fitosteroli più bassa nei neonati pretermine rispetto agli adulti è associata ad una clearance inferiore. Queste informazioni potrebbero essere importanti per la comprensione del danno epatico nei pazienti affetti da PNAC.

Purtroppo, i nostri dati non permettono di individuare alcuna associazione tra il rapporto dei fitosteroli esterificati e liberi e la PNAC nei neonati pretermine sottoposti a NP. Un consistente numero di neonati pretermine con colestasi associata a NP dovrebbe essere studiato.

In conclusione, abbiamo fornito nuovi dati sull'esterificazione dei fitosteroli marcatamente ridotta nei P-PN rispetto agli A-PN. Abbiamo dimostrato che i F-Phy plasmatici sono stati esterificati in misura minore rispetto al colesterolo nei pazienti adulti e nei P-PN e questo era indipendente dalla somministrazione endovenosa dei lipidi. Inoltre abbiamo scoperto che i neonati pretermine in grado di esterificare correttamente il colesterolo sono anche in grado di esterificare i fitosteroli. La rilevanza clinica di quanto trovato dovrà essere approfondita.

Tabella 1. Composizione delle IV LE utilizzate in questo studio^{1,2}

Variable	S	MS	MSF	OS	MOSF	*P
MCT oil (g/L)	–	100	100	–	60	–
Soybean oil (g/L)	200	100	80	40	60	–
Olive oil (g/L)	–	–	–	160	50	–
Fractionated fish oil (g/L)	–	–	20	–	30	–
Egg yolk phospholipids (g/L)	12	12	12	12	12	–
Glycerol (g/L)	22.5	25	25	22.5	25	–
Cholesterol (mg/L)						
FC	220.5±11.3 ^a	63.8±3.4 ^{bc}	51.2±2.6 ^b	78.2±3.9 ^c	213.1±10.9 ^a	0.00
CE	16.4±0.9 ^a	7.4±0.4 ^b	52.9±3.0 ^c	11.6±0.7 ^{ab}	72.0±3.9 ^d	0.00
FC+CE	237.0±12.1 ^a	71.2±3.8 ^b	104.1±5.5 ^c	89.8±4.6 ^{bc}	285.1±14.6 ^d	0.00
FC/CE	13.4±0.3 ^a	8.7±0.2 ^b	1.0±0.1 ^c	6.7±0.1 ^d	3.0±0.1 ^e	0.00
Campesterol (mg/L)						
Free	47.8±2.8 ^a	25.3±1.4 ^b	22.9±1.2 ^b	14.0±0.8 ^c	11.4±0.6 ^c	0.00
Esterified	5.8±0.3 ^a	3.7±0.2 ^b	3.2±0.2 ^b	3.4±0.2 ^b	2.6±0.1 ^c	0.00
Free+Esterified	53.6±3.1 ^a	28.9±1.6 ^b	26.1±1.4 ^b	17.4±0.9 ^c	13.9±0.7 ^c	0.00
Free/Esterified ratio	8.2±0.2 ^a	6.9±0.1 ^b	7.2±0.1 ^b	4.1±0.1 ^c	4.4±0.1 ^c	0.00
Stigmasterol (mg/L)						
Free	50.1±2.7 ^a	29.5±1.6 ^b	23.4±1.3 ^b	14.2±0.8 ^c	12.0±0.6 ^c	0.00
Esterified	4.9±0.3 ^a	2.5±0.1 ^b	2.0±0.1 ^c	2.4±0.1 ^b	2.1±0.1 ^{bc}	0.00
Free+Esterified	55.0±3.0 ^a	32.0±1.7 ^b	25.4±1.4 ^c	16.7±0.9 ^d	14.1±0.8 ^d	0.00
Free/Esterified ratio	10.2±0.2 ^a	11.9±0.2 ^b	12.0±0.2 ^b	5.8±0.1 ^c	5.8±0.1 ^c	0.00
β-Sitosterol (mg/L)						
Free	100.9±5.9 ^a	68.5±3.8 ^b	55.7±3.3 ^{bd}	121.8±6.3 ^c	47.0±2.7 ^d	0.00
Esterified	36.0±2.0 ^a	22.9±1.3 ^b	17.1±0.9 ^c	47.1±2.4 ^d	23.7±1.3 ^b	0.00
Free+Esterified	136.8±7.8 ^a	91.4±5.0 ^b	72.8±4.2 ^c	168.8±8.6 ^d	70.7±4.0 ^c	0.00
Free/Esterified ratio	2.8±0.1 ^a	3.0±0.1 ^b	3.3±0.1 ^c	2.6±0.1 ^d	2.0±0.1 ^e	0.00
Phytosterols (mg/L)						
F-Phy	198.8±3.6 ^a	123.3±4.2 ^b	102.0±1.7 ^c	150.0±6.1 ^d	70.4±1.6 ^e	0.00
E-Phy	46.7±1.4 ^a	29.0±1.2 ^b	22.3±0.7 ^c	52.9±2.5 ^d	28.3±1.1 ^b	0.00
F-Phy+E-Phy	245.5±4.0 ^a	152.3±5.3 ^b	124.3±2.0 ^c	202.9±8.5 ^d	98.8±2.5 ^e	0.00
F-Phy/E-Phy	4.3±0.1 ^a	4.3±0.1 ^a	4.6±0.1 ^c	2.8±0.1 ^d	2.5±0.1 ^e	0.00

¹S: 100% olio di soia (SO); MS: 50% trigliceridi a catena media (MCTs) and 50% SO; MSF: 50% MCTs, 40% SO e 10% olio di pesce (FO); OS: 80% olio di oliva e 20% SO; MOSF: 30% MCTs, 25% olio di oliva, 30% SO e 15% FO.

²Le emulsioni lipidiche (LEs) sono state analizzate al gas cromatografo-spettrofotometro di massa (GC-MS) del nostro laboratorio. I dati sono stati espressi come Media±SD analizzando i campioni in triplicato. I valori di ANOVA con *P<0.05 sono stati considerati significativi. Gli apici differenti indicano differenze significative tra i gruppi calcolate mediante il test di Bonferroni.

Tabella 2. Concentrazione plasmatiche degli steroli (mg/L) e rapporto liberi/esterificati^{1,2}

Variable	P-PN (n=82)	A-PN (n=12)	A-Ctrl (n=10)	*P
Cholesterol	1546.1±398.3 ^a	1894.4±227.3 ^b	1967.1±151.7 ^b	0.00
FC	609.3±178.5 ^a	449.9±95.7 ^b	356.7±59.1 ^b	0.00
CE	936.8±278.3 ^a	1444.5±218.5 ^b	1610.3±171.2 ^b	0.00
FC/CE	0.9±0.3^a	0.3±0.1^b	0.2±0.1^b	0.00
Campesterol	3.3±1.3 ^a	3.5±1.1 ^a	1.2±0.2 ^b	0.00
Free	1.9±0.8 ^a	1.2±0.2 ^b	0.5±0.2 ^b	0.00
Esterified	1.4±0.6 ^a	2.3±1.0 ^b	0.8±0.3 ^b	0.00
Free/Esterified ratio	1.3±0.5^a	0.6±0.2^b	0.7±0.5^b	0.00
Stigmasterol	4.3±1.8 ^a	3.5±1.1 ^{ab}	1.5±0.6 ^b	0.00
Free	3.4±1.5 ^a	1.8±0.6 ^b	0.7±0.2 ^b	0.00
Esterified	1.0±0.4 ^a	1.6±0.6 ^b	0.8±0.4 ^a	0.00
Free/Esterified ratio	3.6±0.7^a	1.2±0.4^b	0.9±0.3^b	0.00
β-sitosterol	7.8±2.8 ^a	8.9±4.4 ^a	1.7±0.3 ^b	0.00
Free	4.9±1.8 ^a	2.8±0.8 ^b	0.5±0.1 ^c	0.00
Esterified	2.9±1.2 ^a	6.5±3.6 ^b	1.3±0.2 ^a	0.00
Free/Esterified ratio	2.0±0.6^a	0.5±0.3^b	0.4±0.1^b	0.00
Phytosterols	15.4±5.4 ^a	16.2±6.2 ^a	4.4±0.2 ^b	0.00
F-Phy	10.2±3.8 ^a	5.8±1.5 ^b	1.6±0.3 ^c	0.00
E-Phy	5.2±1.9 ^a	10.4±4.9 ^b	2.8±0.4 ^a	0.00
Free/Esterified ratio	1.9±0.5^a	0.6±0.2^b	0.6±0.2^b	0.00

¹P-PN: bambini pretermine in nutrizione parenterale [n=82]; A-PN: adulti in nutrizione parenterale [n=12]; A-Ctrl: adulti in dieta libera [n=10].

²I dati sono espressi come Media±SD. I valori di ANOVA con *P<0.05 sono stati considerati significativi. Gli apici differenti indicano differenze significative tra i gruppi calcolate mediante il test di Bonferroni.

Tabella 3. Rapporto degli steroli plasmatici liberi/esterificati degli 82 neonati pretermine studiati che hanno ricevuto 5 differenti emulsioni lipidiche^{1,2}

Variable	S (n=10)	MS (n=30)	MSF (n=23)	OS (n=9)	MOSF (n=10)	*P
FC/CE	1.0±0.5	0.9±0.4	0.8±0.2	0.8±0.3	0.8±0.2	0.40
Free/Esterified campesterol	1.5±0.4	1.4±0.5	1.4±0.5	1.1±0.2	1.2±0.4	0.17
Free/Esterified stigmaterol	3.5±0.3	3.7±0.7	3.9±0.7	3.1±0.6	3.1±0.6	0.15
Free/Esterified β-sitosterol	2.1±0.6	2.0±0.6	2.1±0.6	1.6±0.4	1.7±0.3	0.06
F-Phy/E-Phy	2.1±0.4	1.8±0.5	2.0±0.6	1.6±0.2	1.6±0.4	0.05

¹S: 100% olio di soia (SO) [n=10]; MS: 50% trigliceridi a catena media (MCTs) and 50% SO [n=30]; MSF: 50% MCTs, 40% SO e 10% olio di pesce (FO) [n=23]; OS: 80% olio di oliva e 20% SO [n=9]; MOSF: 30% MCTs, 25% olio di oliva, 30% SO e 15% FO [n=10]. FC: colesterolo libero; EC: colesterolo esterificato; F-Phy: fitosteroli liberi; E-Phy: fitosteroli esterificati.

²I dati sono espressi come Media±SD. I valori di ANOVA con *P<0.05 sono stati considerati significativi. Gli apici differenti indicano differenze significative tra i gruppi calcolate mediante il test di Bonferroni.

Tabella 4. Rapporto degli steroli plasmatici liberi/esterificati nei A-PN, A-Ctrl e nei P-PN^{1,2}

Groups	FC/EC	Free/Esterified campesterol	Free/Esterified stigmasterol	Free/Esterified β -sitosterol	*P
S	1.0±0.5 ^a	1.5±0.4 ^{ba}	3.5±0.3 ^c	2.1±0.6 ^b	0.00
MS	0.9±0.4 ^a	1.4±0.5 ^b	3.7±0.7 ^c	2.0±0.6 ^d	0.00
MSF	0.8±0.2 ^a	1.4±0.5 ^b	3.9±0.7 ^c	2.1±0.6 ^d	0.00
OS	0.8±0.3 ^a	1.1±0.2 ^a	3.1±0.6 ^b	1.6±0.4 ^c	0.00
MOSF	0.8±0.2 ^a	1.2±0.4 ^a	3.1±0.6 ^b	1.7±0.3 ^c	0.00
P-PN	0.9±0.3 ^a	1.3±0.5 ^b	3.6±0.7 ^c	2.0±0.6 ^d	0.00
A-PN	0.3±0.1 ^a	0.6±0.1 ^a	1.2±0.4 ^b	0.5±0.3 ^a	0.00
A-Ctrl	0.2±0.1 ^a	0.7±0.5 ^{ab}	0.9±0.3 ^b	0.4±0.1 ^{ab}	0.00

¹S: 100% olio di soia (SO) [n=10]; MS: 50% trigliceridi a catena media (MCTs) and 50% SO [n=30]; MSF: 50% MCTs, 40% SO e 10% olio di pesce (FO) [n=23]; OS: 80% olio di oliva e 20% SO [n=9]; MOSF: 30% MCTs, 25% olio di oliva, 30% SO e 15% FO [n=10]. P-PN: bambini pretermine in nutrizione parenterale [n=82]; A-PN: adulti in nutrizione parenterale [n=12]; A-Ctrl: adulti in dieta libera [n=10].

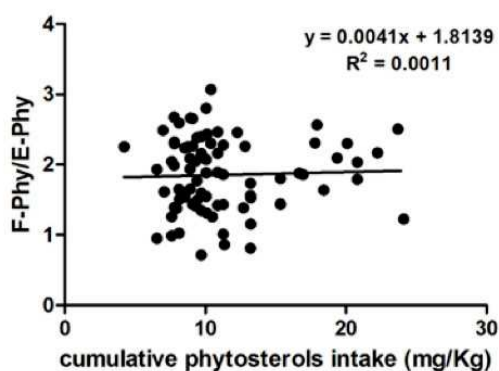
²I dati sono espressi come Media±SD. I valori di ANOVA con *P<0.05 sono stati considerati significativi. Gli apici differenti indicano differenze significative tra i gruppi calcolate mediante il test di Bonferroni.

Tabella 5. Rapporto degli steroli plasmatici liberi/esterificati nei P-PN e nei A-PN studiati durante la continua infusione della NP e 24 h dopo la sospensione della NP^{1,2}

Groups	P-PN			A-PN		
	With IV fat (n=10)	Free IV fat (n=10)	*P	With IV fat (n=12)	Free IV fat (n=12)	*P
FC/CE	0.8±0.2	0.7±0.2	0.08	0.3±0.1	0.3±0.1	0.66
Free/Esterified campesterol	1.6±0.5	1.4±0.4	0.35	0.6±0.1	0.6±0.1	0.83
Free/Esterified stigmasterol	2.3±0.3	2.5±0.8	0.60	1.2±0.4	1.2±0.5	0.24
Free/Esterified β -sitosterol	2.0±0.8	1.6±0.7	0.26	0.5±0.3	0.5±0.3	0.80
F-Phy/E-Phy	2.0±0.6	1.7±0.5	0.30	0.6±0.2	0.6±0.3	0.40

¹P-PN: bambini pretermine in nutrizione parenterale [n=10]; A-PN: adulti in nutrizione parenterale [n=12]; A-Ctrl: adulti in dieta libera [n=10]; FC: colesterolo libero; EC: colesterolo esterificato; F-Phy: fitosteroli liberi; E-Phy: fitosteroli esterificati; IV intravenoso.
²I dati sono espressi come Media±SD; il t-test con *P<0.05 è stato considerato significativo.

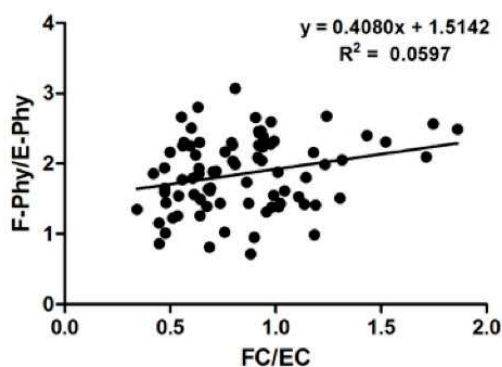
Figura 1. Analisi di regressione lineare tra i fitosteroli totali infusi e il rapporto F-Phy/E-Phy in tutti P-PN^{1,2}



¹F-Phy: fitosteroli liberi; E-Phy: fitosteroli esterificati; P-PN: bambini pretermine in nutrizione parenterale [n=82].

²La correlazione era positiva ma non significativa (r=0.004; P=0.74).

Figura 2. Analisi di regressione lineare tra i FC/EC e F-Phy/E-Phy in tutti P-PN^{1,2}



¹FC: colesterolo libero; EC: colesterolo esterificato; F-Phy: fitosteroli liberi; E-Phy: fitosteroli esterificato; P-PN: bambini pretermine in nutrizione parenterale [n=82].

²La correlazione era positiva e statisticamente significativa (r=0.026; P=0.02).

BIBLIOGRAFIA

1. Clayton PT, Bowron A, Mills KA, Massoud A, Casteels M, and Milla PJ (1993) Phytosterolemia in children with parenteral nutrition-associated cholestatic liver disease. *Gastroenterology* 105: 1806-1813
2. Whitfield PD, Clayton PT, and Muller DP (2000) Effect of intravenous lipid emulsions on hepatic cholesterol metabolism. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 30: 538-546
3. Kaufman SS, Gondolesi GE, and Fishbein TM (2003) Parenteral nutrition associated liver disease. *Semin Neonatol* 8: 375-381
4. La Scala GC, Le Coultre C, Roche BG, Bugmann P, and Belli DC (1993) The addition of lipids increases the total parenteral nutrition-associated cholestasis in the rat. *Eur J Pediatr Surg* 3: 224-227
5. Llop JM, Virgili N, Moreno-Villares JM, Garcia-Peris P, Serrano T, Forga M, Solanich J, and Pita AM (2008) Phytosterolemia in parenteral nutrition patients: implications for liver disease development. *Nutrition* 24: 1145-1152
6. Bindl L, Lutjohann D, Buderus S, Lentze MJ, and v Bergmann K (2000) High plasma levels of phytosterols in patients on parenteral nutrition: a marker of liver dysfunction. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 31: 313-316
7. Iyer KR, Spitz L, and Clayton P (1998) BAPS prize lecture: New insight into mechanisms of parenteral nutrition-associated cholestasis: role of plant sterols. *British Association of Paediatric Surgeons. J Pediatr Surg* 33: 1-6
8. Pianese P, Salvia G, Campanozzi A, D'Apolito O, Dello Russo A, Pettoello-Mantovani M, and Corso G (2008) Sterol profiling in red blood cell membranes and plasma of newborns receiving total parenteral nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 47: 645-651
9. Ellegard L, Sunesson A, and Bosaeus I (2005) High serum phytosterol levels in short bowel patients on parenteral nutrition support. *Clin Nutr* 24: 415-420
10. Lin DS, Steiner RD, Merkens LS, Pappu AS, and Connor WE (2010) The effects of

- sterol structure upon sterol esterification. *Atherosclerosis* 208: 155-160
11. Lembcke J, Ceglarek U, Fiedler GM, Baumann S, Leichtle A, and Thiery J (2005) Rapid quantification of free and esterified phytosterols in human serum using APPI-LC-MS/MS. *J Lipid Res* 46: 21-26
 12. Tilvis RS, and Miettinen TA (1986) Serum plant sterols and their relation to cholesterol absorption. *Am J Clin Nutr* 43: 92-97
 13. Savini S, D'Ascenzo R, Biagetti C, Serpentine G, Pompilio A, Bartoli A, Cogo PE, and Carnielli VP (2013) The effect of 5 intravenous lipid emulsions on plasma phytosterols in preterm infants receiving parenteral nutrition: a randomized clinical trial. *Am J Clin Nutr* 98: 312-318
 14. Sperry WM (1935) Cholesterol esterase in blood. *J Biol Chem* 111: 467-478
 15. Glomset JA (1968) The plasma lecithins:cholesterol acyltransferase reaction. *J Lipid Res* 9: 155-167
 16. Sperry WM, and Stoyanoff VA (1938) The enzymatic synthesis and hydrolysis of cholesterol esters in blood serum. *J Biol Chem* 126: 77-89
 17. Lee RG, Kelley KL, Sawyer JK, Farese RV, Jr., Parks JS, and Rudel LL (2004) Plasma cholesteryl esters provided by lecithin:cholesterol acyltransferase and acyl-coenzyme a:cholesterol acyltransferase 2 have opposite atherosclerotic potential. *Circ Res* 95: 998-1004
 18. Piran U, and Nishida T (1979) Utilization of various sterols by lecithin-cholesterol acyltransferase as acyl acceptors. *Lipids* 14: 478-482
 19. Macauley SK, Billheimer JT, and Ritter KS (1986) Sterol substrate specificity of acyl coenzyme A:cholesterol acyltransferase from the corn earworm, *Heliothis zea*. *J Lipid Res* 27: 64-71
 20. Tavani DM, Nes WR, and Billheimer JT (1982) The sterol substrate specificity of acyl CoA:cholesterol acyltransferase from rat liver. *J Lipid Res* 23: 774-781
 21. Lee RG, Shah R, Sawyer JK, Hamilton RL, Parks JS, and Rudel LL (2005) ACAT2 contributes cholesteryl esters to newly secreted VLDL, whereas LCAT adds cholesteryl ester to LDL in mice. *J Lipid Res* 46: 1205-1212

22. Folch J, Lees M, and Sloane Stanley GH (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* 226: 497-509
23. Corso G, Rossi M, De BD, Rossi I, Parenti G, and Dello RA (2002) Effects of sample storage on 7- and 8-dehydrocholesterol levels analysed on whole blood spots by gas chromatography-mass spectrometry-selected ion monitoring. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 766: 365-370
24. Papadopoulos A, Hamosh M, Chowdhry P, Scanlon JW, and Hamosh P (1988) Lecithin-cholesterol acyltransferase in newborn infants: low activity level in preterm infants. *J Pediatr* 113: 896-898
25. Jain SK (1985) Prematurity and lecithin-cholesterol acyltransferase deficiency in newborn infants. *Pediatr Res* 19: 58-60
26. Vahouny GV, Connor WE, Subramaniam S, Lin DS, and Gallo LL (1983) Comparative lymphatic absorption of sitosterol, stigmasterol, and fucosterol and differential inhibition of cholesterol absorption. *Am J Clin Nutr* 37: 805-809
27. Wang J, Sun F, Zhang DW, Ma Y, Xu F, Belani JD, Cohen JC, Hobbs HH, and Xie XS (2006) Sterol transfer by ABCG5 and ABCG8: in vitro assay and reconstitution. *J Biol Chem* 281: 27894-27904
28. Nghiem-Rao TH, Tunc I, Mavis AM, Cao Y, Polzin EM, Firary MF, Wang X, Simpson PM, and Patel SB (2015) Kinetics of phytosterol metabolism in neonates receiving parenteral nutrition. *Pediatr Res* 78: 181-189

3. CINETICA DEL METABOLISMO DEI FITOSTEROLI NEI NEONATI PREMATURI CHE ASSUMONO EMULSIONI LIPICHE A BASE DI OLIO DI SOIA PER VIA ENDOVENOSA

Le informazioni riguardanti il metabolismo dei fitosteroli nell'uomo soggetto alla nutrizione parenterale (NP) sono limitate. Diversi studi hanno riportato una relazione tra accumulo dei fitosteroli nel plasma e l'insorgenza della PNAC. In letteratura risulta che la clearance dei fitosteroli è stata misurata su soggetti sani, nei pazienti sitosterolemici e sui neonati in NP con peso alla nascita >1500g. Non sono disponibili studi riguardanti l'eliminazione plasmatica dei fitosteroli nei neonati con peso molto basso alla nascita e in quei soggetti molto prematuri (VLBW-PI) che ricevono lipidi in NP per un lungo periodo. Abbiamo misurato le concentrazioni plasmatiche del campesterolo (CA), stigmasterolo (ST), β -sitosterolo (SI) e fitosteroli totali (T-Phy) in 28 VLBW (BW: 500-1249) -VPI (età gestazionale, GA: <32 settimane) che hanno ricevuto per via endovenosa un'emulsione lipidica (LE) a base di olio di soia (SO).

Le misurazioni, sono state eseguite avvalendosi della tecnica di gascromatografia-spettrometria di massa (GC-MS), e sono state effettuate durante la NP (19.0 ± 3.4 giorni) e dopo la sospensione dell'infusione lipidica.

La clearance plasmatica dei fitosteroli è stata calcolata utilizzando una curva farmacocinetica, metodo che sarà approfondito nel capitolo 3.1.e.

Lo scopo di questa seconda parte dello studio è stato quello di valutare l'emivita plasmatica dei fitosteroli nei neonati pretermine con basso peso alla nascita che hanno ricevuto la NP per un lungo periodo.

3.1 MATERIALI E METODI

3.1.a Disegno dello studio

Lo studio multicentrico da noi svolto, è stato approvato dal comitato etico della “Azienda Ospedaliero Univesitaria Ospedali Riuniti di Ancona” avente numero di protocollo 469/DG. Il campionamento è stato svolto attraverso il consenso informato dei genitori o dei tutori legali in ottemperanza delle leggi vigenti. I Centri ospedalieri coinvolti sono la terapia intensiva neonatale (TIN) dell’ospedale pediatrico “G. Salesi” di Ancona, come centro organizzatore, e la TIN dell’Università di Padova. Lo studio ha avuto inizio nel Giugno 2014. Per prima cosa abbiamo delineato le modalità di campionamento, che dovevano rispettare i criteri etici e garantire la minor invasività possibile; in seguito abbiamo individuato i pazienti arruolabili e stabilito il volume di plasma adatto per la successiva analisi. I pazienti esclusi dallo studio avevano gravi malformazioni congenite, corio-amnionite clinica e anomalie congenite del metabolismo. Il campionamento plasmatico si è concluso nell’Ottobre 2015.

3.1.b Caratteristiche dei Pazienti

I neonati pretermine, con peso alla nascita compreso tra 500 a 1249 grammi e con età gestazionale (EG) sotto le 32 settimane, sono stati inseriti nello studio. Abbiamo reclutato 28 neonati, le cui caratteristiche cliniche sono riportate in **Tabella 1**.

I bambini sono stati avviati alla nutrizione parenterale con glucosio, aminoacidi e lipidi dopo circa 1 ora dalla nascita, secondo il protocollo della terapia intensiva neonatale. Le emulsioni lipidiche (LE) sono state infuse alle dosi di 1, 1,5, 2, 2,5 e 3 g·kg⁻¹·d⁻¹ dal giorno zero fino al 5° giorno postnatale di NP, rispettivamente, l’infusione è stata poi mantenuta costante dal 5° al 7° giorno e poi ridotta gradualmente, fino al giorno 21, quando è stata sospesa. La minima nutrizione enterale con latte materno è stata fornita dal giorno 0 al

giorno 7 se tollerata; l'importo massimo fornito era $8 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ da 1 a 4 giorni, e $16 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ da 5 a 8 giorni. L'alimentazione enterale è stata gradualmente aumentata dal giorno 9 fino a raggiungere la piena alimentazione orale dal 18° giorno.

I partecipanti sono stati randomizzati e hanno ricevuto due diversi tipi di NP, 12 pazienti sono stati alimentati con MS (Lipofundin, B. Braun) contenente il 50% a catena media trigliceridi, MCT, e il 50% di olio di soia (OS); 16 PZ sono stati alimentati con MSF (Lipidem, B. Braun) contenente il 50% MCT, il 40% di olio di soia e il 10% olio di pesce (OP), fin dal primo giorno di vita.

I campioni di sangue da noi utilizzati sono stati raccolti in concomitanza di quelli utilizzati per i normali esami di routine. Il prelievo di sangue è stato eseguito piccando il tallone e raccolto tramite capillare contenente EDTA ogni settimana fino al 49° giorno dopo la nascita. Il campionamento è stato eseguito durante le analisi di routine per evitare ulteriori sofferenze nei neonati. I prelievi di sangue non sono stati raccolti nei giorni prefissati solo quando lo stato clinico dei pazienti lo impediva. I campioni sono stati centrifugati immediatamente a 3000 g ed è stato aggiunto pirogallolo al plasma prima dello stoccaggio a -20°C . Non è stato eseguito alcun ulteriore prelievo nei pazienti arruolati.

Con le stesse modalità sopra citate, abbiamo inoltre arruolato anche un sotto gruppo di 5 pazienti che durante la NP avevano sviluppato la colestasi. I pazienti colestatici avevano peso alla nascita, espresso in grammi, di 853.60 ± 164.82 , e un'età gestazionale di 204.20 ± 25.28 giorni. Questi pazienti erano stati alimentati sempre attraverso la nutrizione parenterale per un periodo di 26.6 ± 8.1 giorni.

3.1.c Analisi chimica dei Pazienti

L'analisi plasmatica dei fitosteroli, campesterolo, stigmasterolo e β -sitosterolo, è stata valutata mediante la tecnica di gascromatografia-spettrometria di massa (GC/MS Agilent technologies). La molecola chimica utilizzata nel nostro studio come standard interno è il 5α -colestano (Sigma Aldrich) con un volume pari a $20\mu\text{l}$ alla concentrazione di $0,25\text{ mg/ml}$. L'estrazione dei lipidi è stata effettuata utilizzando una versione modificata del metodo di Folch et al (1, 2) dopo l'aggiunta dello standard interno. La prima fase dell'estrazione ha previsto la saponificazione, ovvero la separazione dello sterolo, sia esso colesterolo o steroli vegetali, dal resto della molecola. In provette di vetro (pyrex) sono stati aggiunti $20\mu\text{l}$ di 5α -colestano ($0,25\text{ mg/ml}$). Alle provette contenenti lo standard, è stato aggiunto $50\mu\text{l}$ di plasma del paziente. L'idrolisi alcalina è avvenuta aggiungendo $0,5\text{ ml}$ d'idrossido di potassio disciolto in metanolo (5mol/L) in ciascun campione. Dopo aver chiuso le pyrex con il proprio tappo, sono state vortexate accuratamente (vortex singolo), segnato il menisco e messo in stufa per 1 ora a 60°C . Una volta tolti i campioni dalla stufa sono stati lasciati raffreddare. Successivamente è stato aggiunto $0,5\text{ ml}$ di H_2O MilliQ per campione, vortexato 5 minuti, saturato con 1 ml dicloruro di sodio e aggiunto 3 ml di esano. In seguito vortexato 5 minuti e centrifugato per 10 minuti utilizzando la centrifuga ad una velocità di 3000 rpm . Terminata la centrifuga è iniziata la prima estrazione, ovvero gli steroli e le sostanze idrofobiche si sono disciolti nel solvente organico, mentre le componenti idrofile sono state allontanate andandosi a solubilizzare nella fase acquosa. Il sopranatante conteneva, nel nostro caso, le sostanze d'interesse; questo è stato posto in una nuova pyrex. Il solvente esano, contenuto nella nuova pyrex, è evaporato portando a secco il campione, tramite l'heating block, cioè una piastra riscaldante settata alla temperatura di circa 40°C sotto un leggero flusso di azoto. Nella pyrex contenente il cloruro di sodio sono stati aggiunti 3 ml di dietilere per eseguire la seconda estrazione. Abbiamo vortexato per 5 minuti, centrifugato per 10 minuti a 3000 rpm . Infine trasferito il sopranatante nella pyrex dove precedentemente è stato trasferito l'esano e portato a secco a 40°C con l'heating block. Quando tutti i campioni sono andati a secco, sono stati rimossi e lasciati

raffreddare a temperatura ambiente. La saponificazione a questo punto era terminata. I campioni però non erano ancora pronti per essere iniettati nel GC/MS, dovevano prima essere derivatizzati.

La Derivatizzazione è avvenuta aggiungendo ai campioni andati a secco 50µl di TMS (N,O-bis (trimetilsilil) trifluoroacetammide con trimetilclorosilano) e lasciando a temperatura ambiente per 30 minuti dopo vortex singolo. Successivamente sono stati portati a secco i campioni con l'heating block a 40°C. Infine sono stati aggiunti 100µl di esano in ciascun campione, il quale è stato vortexato per 10 minuti e centrifugato per 2 minuti (per far scivolare l'esano dalle pareti). I 100µl di esano di ciascun campione sono stati prelevati e introdotti nelle vials a fondo piatto con apposito insert. A questo punto il procedimento chimico è terminato e 2µl di ciascun campione saranno iniettati e analizzati al GC/MS (2-4). L'analisi al GC-MS è stata eseguita con l'apparecchiatura dell'Agilent Technologies (modello GC7890A/MD 5975) utilizzando come software l'Agilent ChemStation in dotazione. La separazione cromatografica è stata eseguita su una colonna capillare (HP-5MS 30 m × 0.250 mm × 0,25 micron di spessore del film) e con una sorgente ad impatto elettronico. Per ottenere l'analisi quantitativa degli steroli, lo spettrometro di massa è stato utilizzato in modalità SIM (Single Ion Monitoring). L'analisi quantitativa è stata compiuta mediante il monitoraggio degli ioni selezionati: m/z 357 e 372 per individuare standard interno; m/z 382 e 472 per campesterolo, m/z 394 e 484 per lo stigmasterolo e m/z 129 e 486 sono stati utilizzati per la β-sitosterolo (2, 5, 6). Il rapporto di risposta di ogni composto è stato calcolato. Le concentrazioni di fitosteroli (mg/L) sono state calcolate comparando l'area del picco di ciascun composto con quella dello standard interno e i dati sono stati corretti dai fattori di risposta ottenuti dalle curve di calibrazione da noi eseguite (7).

3.1.d Analisi statistica

I dati sono stati espressi come Media ± Deviazione Standard (DS). L'emivita dei fitosteroli all'interno dei gruppi e tra i gruppi, è stata calcolata statisticamente mediante

l'ANOVA per misure ripetute e il test post hoc di Bonferroni. Il confronto tra Lipidem e Lipofoundin, è stato ottenuto tramite il t-test per dati appaiati. La significatività statistica è stata considerata per valori di $p < 0.05$.

3.1.e Analisi Farmacocinetica

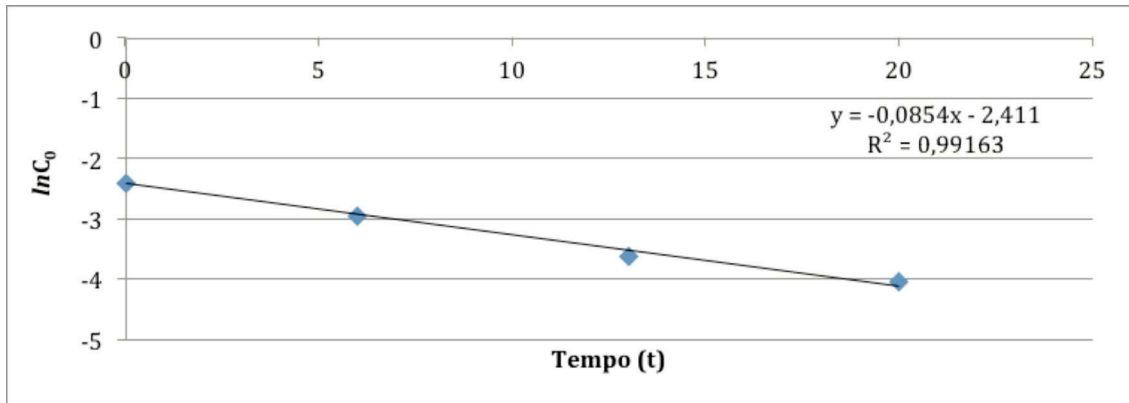
La curva farmacocinetica degli steroli vegetali è stata studiata andando a calcolare il tempo di emivita per ciascuna delle tre categorie di steroli, Campesterolo, Stigmasterolo e β -Sitosterolo e per il totale dei tre steroli, espressi in mg/dL. A questo scopo, abbiamo utilizzato la procedura standard di considerare la fase discendente dell'ultima infusione. Tale curva discendente ha un'equazione di $C = C^0 \cdot e^{-kt}$.

Per C^0 s'intende la concentrazione iniziale della fase discendente della curva.

Questa curva può essere linearizzata attraverso una trasformazione logaritmica, per cui si ha che il logaritmo naturale di C ($\ln C$) è uguale al $\ln(C^0 \cdot e^{-kt})$; quindi ciò implica che $\ln C = \ln C^0 + \ln e^{-kt}$. A questo punto attraverso un ultimo passaggio matematico si ha che:

$$\ln C = \ln C^0 - kt$$

Se poniamo quindi i punti della fase discendente della curva in una scala semilogaritmica, ovvero in cui il logaritmo è presente solo sull'asse delle ordinate, possiamo facilmente applicare una tecnica di regressione lineare per ottenere la costante di eliminazione k dal coefficiente angolare di questa retta discendente cambiato di segno. I risultati da noi ottenuti, attraverso le operazioni di regressione lineare, hanno dato valori di R , cioè dei coefficienti di correlazione lineare, molto elevati. Tale retta di regressione è stata applicata imponendo il passaggio della retta per il punto di coordinate $(0, \ln C^0)$ intendendo ancora una volta il tempo zero come tempo iniziale della fase discendente della curva. Il tempo di emivita ($t_{1/2}$) si può calcolare dalla costante di eliminazione k (calcolata dal coefficiente angolare della retta sul grafico semilogaritmico) dall'equazione $t_{1/2} = \ln 2/k$.



3.2 RISULTATI

In questo studio abbiamo voluto indagare l'emivita degli steroli vegetali nei bambini pretermine con un basso peso alla nascita. L'età gestazionale media dei bambini non colestatici studiati era di 200.0 ± 13.3 giorni, il peso alla nascita medio si attestava intorno a 920.8 ± 196.1 grammi. I pazienti hanno ricevuto lipidi attraverso la NP per 19.0 ± 3.4 giorni. Entrambi i sessi sono stati arruolati nello studio. Un piccolo gruppo di pazienti affetto da colestasi è stato trattato separatamente.

3.2.a Valori di emivita nei pazienti senza colestasi

Le caratteristiche demografiche e cliniche dei 28 pazienti studiati sono state riportate in **Tabella 1**. A tutti i soggetti esaminati non è stata diagnosticata la colestasi e, in essi, non sono state osservate disfunzioni epatiche.

Le concentrazioni plasmatiche di campesterolo, stigmasterolo, sitosterolo e la concentrazione totale di fitosteroli espressa in mg/L a 7, 14 e 21 giorni dall'inizio della NP, sono stati illustrati nella **Figura 1**.

Nessuna differenza è stata evidenziata tra i valori plasmatici del CA, ST, SI e le concentrazioni di T-Phy (mg/L) al 7° e al 14° giorno di NP (CA: 1.9 ± 0.8 vs 2.08 ± 0.1 ; ST: 1.2 ± 0.6 vs 1.09 ± 0.7 ; SI: 5.1 ± 2.3 vs 5.2 ± 2.3 ; T-Phy: 8.2 ± 3.7 vs 8.4 ± 3.8 ; $P < 0.05$, rispettivamente).

I dati ottenuti al 21° giorno, quando la maggior parte dei bambini pretermine con basso

peso alla nascita aveva sospeso i lipidi provenienti dalla NP, erano significativamente più bassi rispetto a quelli dei giorni precedenti in cui la nutrizione parenterale era ancora in corso (CA:1.1±0.6; ST:0.6±0.4; SI:2.6±1.8; T-Phy:4.3±2.7). Le concentrazioni plasmatiche di campesterolo, stigmasterolo e sitosterolo dopo il 21° giorno in tutti i pazienti studiati sono riportati nella **Figura 2**.

I prelievi di sangue non sono stati eseguiti in tempi diversi ma tutti i pazienti hanno mostrato un decadimento non lineare delle concentrazioni plasmatiche di fitosteroli. L'emivita plasmatica dello stigmasterolo era significativamente più alta rispetto al campesterolo, mentre l'emivita del sitosterolo era la più bassa tra i FS (P= 0.01). La vita media dei fitosteroli totali (T-FS), nella nostra casistica, avviene in 10.1±3.0 giorni, come riportato nella **Tabella 2**.

Nessuna differenza statisticamente significativa è stata osservata nell'emivita plasmatica dei fitosteroli (espressa in giorni) nei pretermine che avevano ricevuto MS o MSF (CA: 9.9±3.7 vs 11.0±3.0; ST: 13.1±3.7 vs 13.3±4.9; SI: 9.0±3.8 vs 9.6±2.4; T-FS: 9.6±3.8 vs 10.4±2.5; p= 0.47, rispettivamente).

L'emivita plasmatica del CA, ST, SI e dei T-FS non correlava con l'apporto cumulativo di fitosteroli dalla nascita fino alla sospensione dell'infusione lipidica (CA: r= 0.28 P= 0.16; ST: r= 0.15 P= 0.47; SI: r= 0.38 P= 0.05; T-FS: r= 0.35 P= 0.08). In questa popolazione di neonati non colestatici, non è stata trovata alcuna correlazione lineare tra l'emivita di CA, ST, SI e dei T-FS e i valori di bilirubina coniugata misurati prima del 14° giorno dopo la nascita (CA: r= 0.32 P= 0.24; ST: r= 0.07 P= 0.81; SI r= 0.13 P= 0.66; T-FS r= 0.22 P= 0.44). Lo stesso risultato negativo è stato ottenuto quando è stata considerata la bilirubina coniugata misurata tra 28-56 giorni dopo la nascita (CA: r= 0.14 P= 0.53; ST: r= 0.17 P= 0.44; SI r= 0.19 P= 0.41; T-FS r=0.18 P= 0,44), peso ed età gestazionale alla nascita (CA: r= 0.10 P= 0.60; ST: r= 0.33 P= 0.08; SI: r= 0.19 P= 0,33; T-FS: r= 0.20 P= 0.32 e CA: r= 0.27 P= 0.16; ST: r= 0.19 P= 0.34; SI: r= 0.31 P= 0.11; T-FS: r= 0.31 P= 0.11, rispettivamente).

3.2.b Valori di emivita nei pazienti con colestasi

Abbiamo voluto verificare se tale emivita fosse simile a quella dei bambini pretermine affetti da colestasi. I pazienti colestatici avevano peso alla nascita, espresso in grammi, di 853.60 ± 164.82 , e un'età gestazionale di 204.20 ± 25.28 giorni. Questi pazienti appartengono ad una piccola sottoclasse di pazienti che fortunatamente sono poco frequenti e quindi difficili da arruolare. Nella nostra TIN vi sono pochissimi casi in un anno di pazienti che sviluppano il fenomeno della colestasi. Da gennaio 2014 a dicembre 2015, siamo quindi riusciti ad arruolare un piccolo gruppo di cinque pazienti (N=5) che durante la NP ha sviluppato tale patologia. Anche di questo gruppo di pazienti abbiamo calcolato l'emivita plasmatica di fitosteroli in giorni con la stessa metodologia (CA: 21.8 ± 6.6 ; ST: 20.6 ± 7.9 ; SI: 26.5 ± 11.5 ; T:FS 23.1 ± 6.9). A causa dell'esigua numerosità non abbiamo potuto utilizzare nessun approccio statistico. I nostri dati rivelano che i T-FS nei pazienti colestatici hanno un'emivita di circa il doppio rispetto a quelli non colestatici (23.1 ± 6.9 vs 10.1 ± 3.0). Ulteriori pazienti andrebbero comunque arruolati per confermare o confutare questi dati.

3.3 DISCUSSIONI

Questo è il primo lavoro riguardante la cinetica del metabolismo dei fitosteroli nei bambini pretermine con basso peso alla nascita che ricevono lipidi per lungo periodo attraverso la NP. Abbiamo mostrato che i pazienti durante l'infusione di lipidi avevano concentrazioni plasmatiche di fitosteroli circa 2 volte superiori a quelli degli adulti normali che consumano fitosteroli nella loro dieta (8, 9). I nostri risultati sono in linea con i dati pubblicati in precedenza sui neonati esposti alla somministrazione parenterale delle emulsioni lipidiche contenenti olio di soia, anche se, le emulsioni da noi utilizzate, MS e MSF, contenevano la metà di olio di soia rispetto a quelle utilizzate in altri studi pubblicati (10).

Le concentrazioni plasmatiche di CA, ST, SI e T-FS diminuirono in modo significativo dal ventunesimo giorno in poi, dopo che l'infusione lipidica era stata sospesa nella maggior parte dei pazienti studiati. Questi risultati sono coerenti con il concetto che i trasportatori ABCG5/G8 sono efficaci nel prevenire l'assorbimento alimentare di fitosteroli. La somministrazione endovenosa di FS bypassa tale meccanismo protettivo fornito dalla barriera intestinale, comportando un aumento dei livelli plasmatici di fitosteroli, paragonabile a quello che si riscontra nei pazienti omozigoti fitosterolemici. La perdita della funzione epatica e intestinale dei trasportatori ABCG5/G8 porta all'accumulo tossico degli steroli vegetali nel corpo che possono provocare malattie cardiovascolari premature, disturbi ematologici, alterazioni del sistema endocrino, e possibile cirrosi epatica (11-13). Abbiamo trovato che la clearance plasmatica del SI, in questi pazienti, avviene in 10 giorni, come riportato da Salen et al. e Bhattacharyya et al. nei pazienti sitosterolemici omozigoti (14, 15), e Lin et al. in un paziente con coesistente fitosterolemia e colestanoemia (16). Questa evidenza suggerisce che i bambini pretermine che ricevono steroli per via parenterale, potrebbero essere esposti agli stessi rischi dei soggetti fitosterolemici, probabilmente a causa della mancanza di trasportatori epatici ABCG5/G8 funzionanti. Recentemente Nghiem-Rao et al. hanno valutato che nei neonati alimentati per via endovenosa attraverso l'apporto lipidico proveniente dalla soia, l'emivita plasmatica del

sitosterolo è di 1,5 giorni, suggerendo una ragione diversa rispetto a quella proposta da noi (10). Tuttavia, resta difficile credere che i bambini con immaturità epatica abbiano un metabolismo dei fitosteroli più veloce di quello dei soggetti maturi. Salen et al. hanno stimato 3-4 giorni di emivita del SI in adulti sani in modo simile a quello riportato da Ostlund et al. (15, 17-19). Questo risultato sarebbe confermato anche da quanto abbiamo ottenuto studiando l'esterificazione dei FS nei pretermine in NP: la minore capacità di esterificazione dei FS nei neonati rispetto agli adulti suggerirebbe una maggiore difficoltà dei pretermine di eliminare queste sostanze dall'organismo. Da ciò ne deriverebbe una maggiore emivita plasmatica dei FS nei neonati rispetto agli adulti.

I nostri dati evidenziano che la clearance plasmatica di CA e ST è più lenta rispetto a quella del SI in contrasto con i dati riportati da Nghiem-Rao et al. Inoltre, il SI è escreto nella bile a una velocità doppia rispetto al CA e il metabolismo del SI è più veloce rispetto a quello del CA nei pazienti sani (17, 20). Pertanto, riteniamo che i nostri risultati siano coerenti con i dati pubblicati in precedenza sul metabolismo dei fitosteroli nell'uomo.

L'emivita plasmatica dello ST era la più lunga tra tutti e tre i fitosteroli considerati, anche se la concentrazione dello ST era la più bassa tra loro. Possiamo ipotizzare che lo ST potrebbe essere in grado di svolgere il suo effetto epatotossico anche a livelli plasmatici più bassi rispetto a quelli degli altri nei bambini pretermine (21). Il lento passaggio dello ST potrebbe dimostrare la sua tossicità epatica superiore al SI e al CA. Il dato da non sottovalutare è proprio la lenta emivita dello stigmaterolo, e del suo coinvolgimento nell'inibizione del recettore FXR. Inibendo l'FXR, si induce la riduzione dell'espressione di geni e delle proteine coinvolte nella escrezione canalicolare degli acidi biliari e della bilirubina che causa ritenzione epatocellulare, tossicità da acidi biliari, colestasi e danno epatico (22-24). Inoltre sembrerebbe che lo ST possa aumentare le citochine pro-infiammatorie IL-6, TNF-alfa e $IL1\beta$ (21). In generale, alti livelli plasmatici di FS possono ridurre la fluidità delle membrane dei globuli rossi (25), inoltre, dobbiamo considerare che il β -sitosterolo può inibire la colesterolo 7 α -idrossilasi e quindi ridurre la sintesi degli acidi biliari; questo aspetto contribuisce a esacerbare la riserva degli acidi biliari e il flusso biliare (25, 26).

Né l'olio di pesce contenuto in MSF né il peso o l'età gestazionale porta ad un vantaggio

sulla capacità epatica di metabolizzare i fitosteroli. Questo risultato è stato ottenuto considerando anche la funzionalità epatica dei pretermine tra 0-7 e 28-56 giorni dalla nascita espressa dalla bilirubina coniugata. I nostri dati suggeriscono che i valori più bassi di bilirubina non indicano una capacità superiore di metabolizzare i fitosteroli nei soggetti studiati.

Questo studio ha però delle limitazioni. Come per molti altri studi di farmacocinetica nei neonati, la precisione del nostro modello cinetico è limitata, data la mancanza di ripetuti prelievi di sangue a causa della bassa vulnerabilità della nostra popolazione di sopportare il carico di flebotomia. L'assenza di punti di campionamento in tempi diversi può avere influenzato la nostra analisi cinetica; tuttavia, non abbiamo trovato nessuna differenza nei risultati dopo l'esclusione dei pazienti di cui non erano stati raccolti tutti prelievi.

Dai dati a nostra disposizione possiamo affermare che l'emivita dei fitosteroli andrebbe monitorata nei pazienti che assumono nutrizioni parenterali a base di olio di soia. Se confermati i nostri primi dati sull'emivita dei pazienti colestatici, questa popolazione andrebbe controllata di più rispetto ai pazienti sani. Stiamo eseguendo attualmente uno studio per determinare la cinetica dei fitosteroli in questi pazienti.

In conclusione, abbiamo dimostrato che i fitosteroli sono eliminati molto lentamente dai prematuri e questo potrebbe renderli più vulnerabili alla PNAC e alle stesse problematiche patologiche che colpiscono i pazienti fitosterolemici.

Tabella 1. Caratteristiche dei pazienti alimentati con emulsioni lipidiche a base di olio di soia per via endovenosa

Pazienti in NP con olio di soia (n=28)	
Età gestazionale (giorni)	200.0±13.3
Peso alla nascita (g)	920.8±196.1
Sex (%)	
Maschi	39.3% (11/28)
Razza/Etnia (%)	
Caucasica	78.6% (22/28)
Altro	21.4% (6/28)
Diagnosi (%)	
SGA	14.3% (4/28)
RDS	82.1% (23/28)
PDA	42.9% (12/28)
EOS	3.6% (1/28)
LOS	32.1% (9/28)
BPD	21.4% (6/28)
ROP I-II	39.3% (11/28)
ROP plus	7.1% (2/28)
IVH I-II	3.6% (1/28)
IVH >III	0.0% (0/28)
LPV I	10.7% (3/28)
LPV >I	0.0% (0/28)
Colestasi (bilirubina coniugata >2mg/dL)	0.0% (0/28)
GI chirurgia	0.0% (0/28)
Nutrizione Parenterale (giorni)	
Giorno di vita all'inizio di NP	1
Durata della NP	19.0±3.4
SO-based IV-LEs (%)	
MS	42.9% (12/28)
MSF	57.1% (16/28)
FS somministrati durante l'intera NP(mg)	
CA	3666.6±847.0
ST	3935.9±940.6
SI	10771.6±2764.7
T-FS	18374.0±4536.3

I dati sono esposti come media \pm SD o n (%).

SGA, piccoli per età gestazionale; RDS, sindrome da distress respiratorio; PDA, dotto arterioso pervio; EOS, esordio precoce sepsi; LOS, esordio tardivo di sepsi; BPD, displasia broncopolmonare, POR, retinopatia della prematurità; IVH, emorragia intraventricolare; LPV, leucomalacia periventricolare; GI, gastrointestinale; SO-based IV-LEs emulsioni lipidiche a base di olio di soia infuse per via endovenosa; T-FS, CA + ST + SI.

Tabella 2. Emivita del CA, ST, SI e T-FS ($t_{1/2}$ = giorni) nel plasma dei bambini pretermine (BP) che hanno ricevuto la NP contenente lipidi per un lungo periodo.

	CA $t_{1/2}$	ST $t_{1/2}$	SI $t_{1/2}$	*P	T-Phy $t_{1/2}$
BP in NP (n=28)	11.0 \pm 3.7 ^a [5.8-20.4]	13.1 \pm 5.7 ^b [5.7-24.0]	9.4 \pm 3.0 ^c [4.9-17.8]	0.01	10.1 \pm 3.0 [5.4-17.8]

I dati sono presentati come media \pm SD (giorni). I valori minimi e massimi sono riportati in []. Sono stati utilizzati accoppiati ANOVA e test di Bonferroni. I diversi indici indicano una differenza significativa dell'emivita dei fitosteroli plasmatici (P= 0.01).

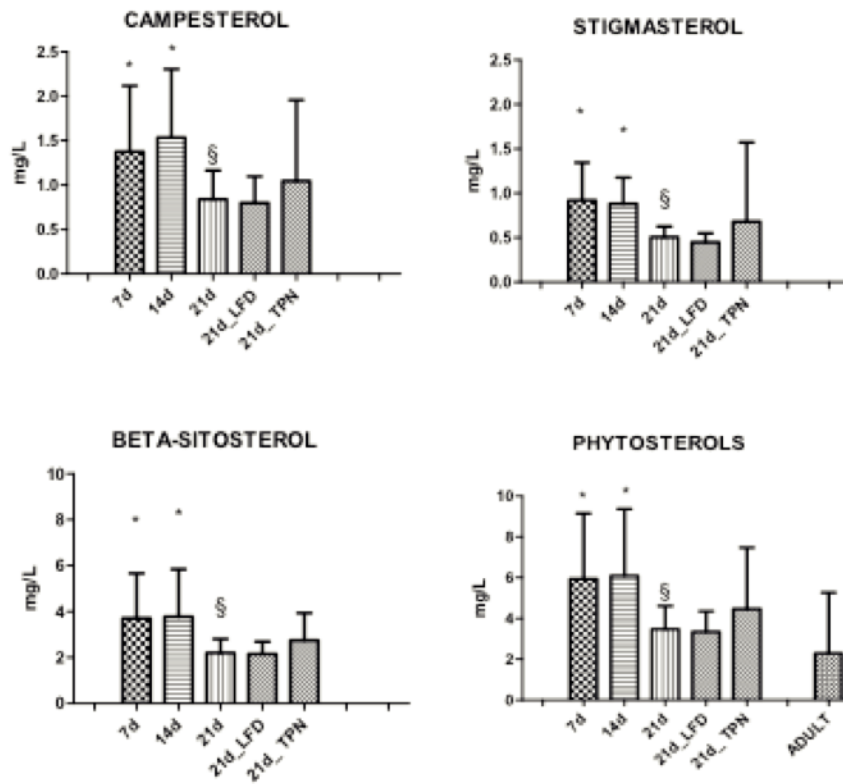


Figura 1. I dati sono presentati come media \pm deviazione standard (mg/L). LFD, lipidi in dieta libera (n=26); TPN, nutrizione parenterale totale (n=2); d, giorni; ADULT, concentrazione plasmatica dei fitosteroli in adulti in dieta libera. I test statistici utilizzati sono l'ANOVA per dati appaiati e il test di Bonferroni. Gli indici differenti indicano una differenza significativa della concentrazione plasmatica dei fitosteroli ($P < 0.05$).

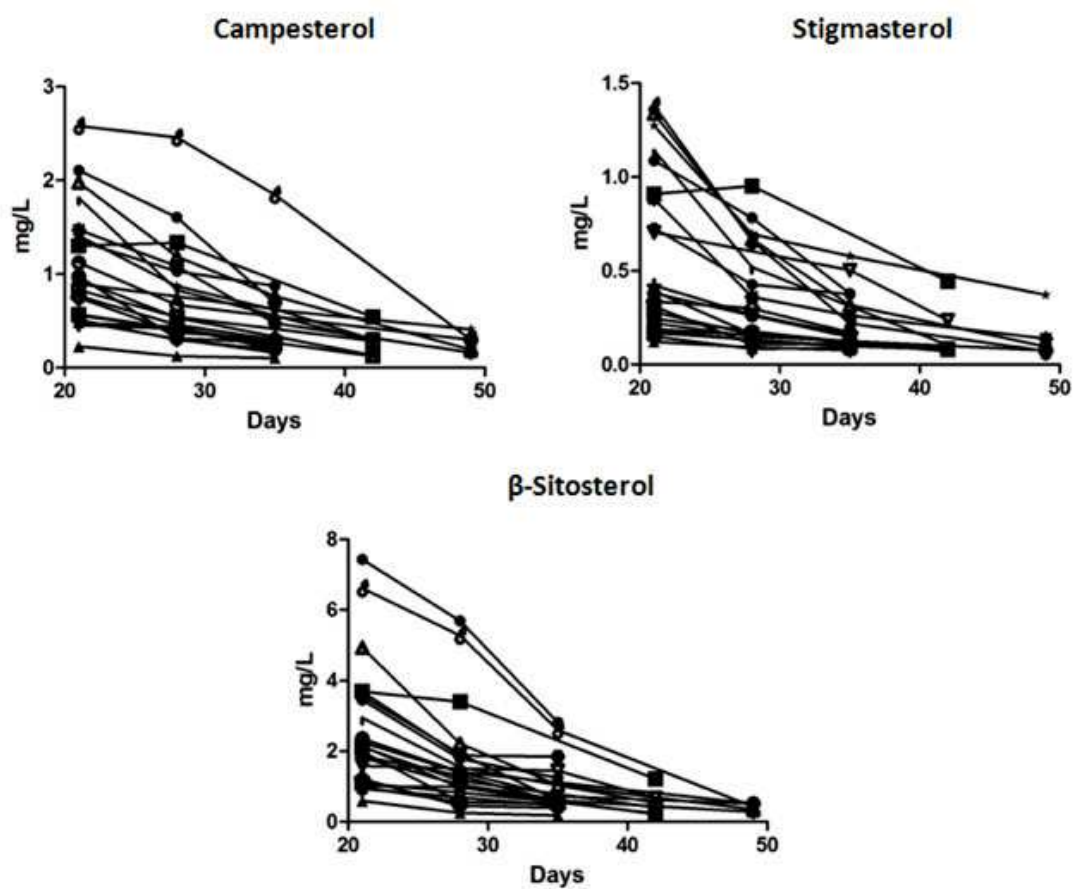


Figura 2. Le concentrazioni plasmatiche (mg/L) dei FS nel tempo in tutti i pazienti studiati (n=28) a partire da 21 giorni in poi.

BIBLIOGRAFIA

1. Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem.* 1957;226(1): 497-509.
2. Savini S, D'Ascenzo R, Biagetti C, Serpentine G, Pompilio A, Bartoli A, et al. The effect of 5 intravenous lipid emulsions on plasma phytosterols in preterm infants receiving parenteral nutrition: a randomized clinical trial. *The American journal of clinical nutrition.* 2013;98(2): 312-8.
3. Kaufman SS, Gondolesi GE, Fishbein TM. Parenteral nutrition associated liver disease. *Semin Neonatol.* 2003;8(5): 375-81.
4. Whitfield PD, Clayton PT, Muller DP. Effect of intravenous lipid emulsions on hepatic cholesterol metabolism. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2000;30(5): 538-46.
5. Ahmida HS, Bertucci P, Franzo L, Massoud R, Cortese C, Lala A, et al. Simultaneous determination of plasmatic phytosterols and cholesterol precursors using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) with selective ion monitoring (SIM). *Journal of chromatography B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences.* 2006;842(1): 43-7.
6. Lindenthal B, Aldaghlis TA, Kelleher JK, Henkel SM, Tolba R, Haidl G, et al. Neutral sterols of rat epididymis. High concentrations of dehydrocholesterols in rat caput epididymidis. *Journal of lipid research.* 2001;42(7): 1089-95.
7. Corso G, Rossi M, De BD, Rossi I, Parenti G, Dello RA. Effects of sample storage on 7- and 8-dehydrocholesterol levels analysed on whole blood spots by gas chromatography-mass spectrometry-selected ion monitoring. *Journal of chromatography B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences.* 2002;766(2): 365-70.
8. Valsta LM, Lemstrom A, Ovaskainen ML, Lampi AM, Toivo J, Korhonen T, et al. Estimation of plant sterol and cholesterol intake in Finland: quality of new values and their effect on intake. *The British journal of nutrition.* 2004;92(4): 671-8.
9. Normen AL, Brants HA, Voorrips LE, Andersson HA, van den Brandt PA, Goldbohm RA. Plant sterol intakes and colorectal cancer risk in the Netherlands Cohort Study on Diet and

- Cancer. *The American journal of clinical nutrition*. 2001;74(1): 141-8.
10. Nghiem-Rao TH, Tunc I, Mavis AM, Cao Y, Polzin EM, Firary MF, et al. Kinetics of phytosterol metabolism in neonates receiving parenteral nutrition. *Pediatr Res*. 2015;78(2): 181-9.
 11. Shefer S, Salen G, Nguyen L, Batta AK, Packin V, Tint GS, et al. Competitive inhibition of bile acid synthesis by endogenous cholestanol and sitosterol in sitosterolemia with xanthomatosis. Effect on cholesterol 7 alpha-hydroxylase. *The Journal of clinical investigation*. 1988;82(6): 1833-9.
 12. Shulman RS, Bhattacharyya AK, Connor WE, Fredrickson DS. Beta-sitosterolemia and xanthomatosis. *The New England journal of medicine*. 1976;294(9): 482-3.
 13. Lu K, Lee MH, Hazard S, Brooks-Wilson A, Hidaka H, Kojima H, et al. Two genes that map to the STSL locus cause sitosterolemia: genomic structure and spectrum of mutations involving sterolin-1 and sterolin-2, encoded by ABCG5 and ABCG8, respectively. *American journal of human genetics*. 2001;69(2): 278-90.
 14. Bhattacharyya AK, Connor WE, Lin DS, McMurry MM, Shulman RS. Sluggish sitosterol turnover and hepatic failure to excrete sitosterol into bile cause expansion of body pool of sitosterol in patients with sitosterolemia and xanthomatosis. *Arteriosclerosis and thrombosis : a journal of vascular biology/American Heart Association*. 1991;11(5): 1287-94.
 15. Salen G, Shore V, Tint GS, Forte T, Shefer S, Horak I, et al. Increased sitosterol absorption, decreased removal, and expanded body pools compensate for reduced cholesterol synthesis in sitosterolemia with xanthomatosis. *Journal of lipid research*. 1989;30(9): 1319-30.
 16. Lin HJ, Wang C, Salen G, Lam KC, Chan TK. Sitosterol and cholesterol metabolism in a patient with coexisting phytosterolemia and cholestanolemia. *Metabolism: clinical and experimental*. 1983;32(2): 126-33.
 17. Ostlund RE, Jr., McGill JB, Zeng CM, Covey DF, Stearns J, Stenson WF, et al. Gastrointestinal absorption and plasma kinetics of soy Delta(5)-phytosterols and phytostanols in humans. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2002;282(4): E911-6.

18. Salen G, Ahrens EH, Jr., Grundy SM. Metabolism of beta-sitosterol in man. *The Journal of clinical investigation*. 1970;49(5): 952-67.
19. Salen G, Tint GS, Shefer S, Shore V, Nguyen L. Increased sitosterol absorption is offset by rapid elimination to prevent accumulation in heterozygotes with sitosterolemia. *Arteriosclerosis and thrombosis : a journal of vascular biology/American Heart Association*. 1992;12(5): 563-8.
20. Sudhop T, Sahin Y, Lindenthal B, Hahn C, Luers C, Berthold HK, et al. Comparison of the hepatic clearances of campesterol, sitosterol, and cholesterol in healthy subjects suggests that efflux transporters controlling intestinal sterol absorption also regulate biliary secretion. *Gut*. 2002;51(6): 860-3.
21. El Kasmi KC, Anderson AL, Devereaux MW, Vue PM, Zhang W, Setchell KD, et al. Phytosterols promote liver injury and Kupffer cell activation in parenteral nutrition-associated liver disease. *Sci Transl Med*. 2013;5(206): 206ra137.
22. Carter BA, Taylor OA, Prendergast DR, Zimmerman TL, Von Furstenberg R, Moore DD, et al. Stigmasterol, a soy lipid-derived phytosterol, is an antagonist of the bile acid nuclear receptor FXR. *Pediatr Res*. 2007;62(3): 301-6.
23. Kurvinen A, Nissinen MJ, Andersson S, Korhonen P, Ruuska T, Taimisto M, et al. Parenteral plant sterols and intestinal failure-associated liver disease in neonates. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2012;54(6): 803-11.
24. Vlaardingerbroek H, Ng K, Stoll B, Benight N, Chacko S, Kluijtmans LA, et al. New generation lipid emulsions prevent PNALD in chronic parenterally fed preterm pigs. *Journal of lipid research*. 2014;55(3): 466-77.
25. Clayton PT, Whitfield P, Iyer K. The role of phytosterols in the pathogenesis of liver complications of pediatric parenteral nutrition. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif)*. 1998;14(1): 158-64.
26. Zaloga GP. Phytosterols, Lipid Administration, and Liver Disease During Parenteral Nutrition. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. 2015;39(1 Suppl): 39s-60s.

