

LIPIDOMICA DELLA MEMBRANA CELLULARE

La lipidomica si definisce sinteticamente come la disciplina che studia i lipidi in modo dinamico, ovvero seguendo i cambiamenti del metabolismo dei grassi durante gli eventi fisiologici e patologici a cui l'organismo va incontro. In particolare, le nostre osservazioni vengono effettuate sul compartimento cellulare della membrana, utilizzando per l'uomo come riferimento quella del globulo rosso, che è in grado di riportare numerose informazioni a livello molecolare relative ad abitudini alimentari, stile di vita, familiarità, metabolismo dell'individuo. Perché è utile raggiungere il livello molecolare? Tutte le più recenti scoperte in biologia e medicina hanno messo in evidenza che è proprio a questo livello che vengono orientati i più cruciali processi cellulari. Pur essendo una ben nota struttura cellulare, solo di recente la membrana è stata rivalutata in un ruolo più completo e comprensivo: ovvero, si è compreso che, oltre a delimitare lo spazio cellulare, provvedere agli scambi interno-esterno e fornire supporto all'attività di canali e recettori, essa è un elemento fondamentale per la regolazione del metabolismo e delle segnalazioni che avvengono mediante i componenti della membrana stessa, attivando una complessa rete di attività e messaggi biochimici che giungono ad influenzare anche l'espressione genica. In queste mansioni, il funzionamento di membrana è direttamente correlato al tipo ed alla quantità di molecole lipidiche, dette acidi grassi, ed a loro volta queste molecole sono collegate alla nutrizione ed alla capacità di trasformazione biosintetica individuale. Mano a mano ci si sta rendendo conto dell'enorme opportunità data da un corretto stile di vita ed alimentare, che contribuisce positivamente alla composizione molecolare della membrana e quindi alla regolazione di complesse funzioni cellulari. La condizione degli acidi grassi della membrana si può interpretare come una risultante della condizione metabolica, delle familiarità, delle abitudini di vita ed alimentari, nonché del contributo dello stress oppure delle situazioni patologiche che l'individuo sta vivendo (raccolte mediante apposito questionario). In parole semplici, l'analisi degli acidi grassi della membrana corrisponde al concetto di adoperare una "bilancia molecolare", per ricavare informazioni molto precise sul "peso" delle varie componenti ed ottenere una valutazione basale da estrapolare all'inquadramento clinico del soggetto.

Composizione della membrana cellulare.

La membrana cellulare rappresenta una delle strutture fondamentali degli elementi funzionali degli organismi viventi. Questa miscela complessa di lipidi allo stato fluido, dove sono immerse proteine ed altre molecole come il colesterolo, delinea il confine della cellula con l'ambiente extracellulare, ed è la struttura attraverso cui avvengono le comunicazioni e scambi necessari per la vita. L'unità lipidica fondamentale della membrana cellulare è il fosfolipide, con una caratteristica struttura l'aggregazione spontanea delle unità fosfolipidiche nella forma di doppio strato, con le sole teste polari che interagiscono con l'ambiente acquoso extra - ed intra - degli acidi grassi, lunghe catene tipicamente di 16-22 atomi di carbonio, che si organizzano l'una accanto all'altra a formare la parte interna del doppio strato, non

a contatto con l'ambiente acquoso. La modalità di organizzazione delle membrane dipende dal tipo di acidi grassi presenti nei fosfolipidi, ed è importante sottolineare che ciascun tessuto ha la sua tipica composizione di acidi grassi. Si può osservare dai dati della Tabella come non sia possibile confondere il riconoscimento di un tessuto adiposo con quello di un altro distretto, ad esempio il globulo rosso (RBC), il tessuto retinico o cerebrale. È anche chiaro che le cellule di ciascun tessuto tendano a mantenere il più possibile la loro caratteristica composizione di membrana, ma devono fare i conti con la reale disponibilità di tutte le componenti lipidiche, specialmente quelle essenziali che, come vedremo, devono provenire dalla nutrizione (omega-6 ed omega-3). Pertanto la composizione finale del tessuto rifletterà le condizioni di metabolismo e dieta seguite dall'individuo.

Pertanto, nel considerare il ruolo degli acidi grassi per le membrane cellulari si deve distinguere:

- l'aspetto strutturale generale, ovvero il ruolo di mantenere un'ideale struttura del doppio strato, per ottenere favorevoli caratteristiche di fluidità e permeabilità. Ciò a parte anche del concetto di omeostasi, ovvero di adattamento e flessibilità che contraddistingue la membrana cellulare, che risponde più velocemente di qualsiasi altro compartimento cellulare alle sollecitazioni provenienti dal cambiamento di ambiente di vita esterno, proprio attraverso la precisa modulazione degli acidi grassi che la compongono.

- L'aspetto strutturale intrinseco, che riguarda la capacità della membrana cellulare di mantenere la sua identità, caratteristica di ciascun tessuto, e riportarla il più fedelmente possibile durante la replicazione cellulare, provvedendo alla formazione di tessuti con la composizione corretta e quindi funzionanti nelle specifiche attività a cui sono preposti. Ovviamente, se ciò non è possibile, per mancanza delle corrette quantità dei singoli acidi grassi, il tessuto si formerà ugualmente, ma presenterà funzionalità meno efficaci, contribuendo quindi alla creazione di uno stato basale di sconforto cellulare.

Quali sono le categorie di acidi grassi naturali?

Le code idrofobe (ovvero gli acidi grassi) dei fosfolipidi di membrana appartengono alle due categorie principali:

- 1 - acidi grassi saturi (saturated fatty acids, SFA), con una tipica struttura lineare che si può organizzare in modo impaccato, ovvero portando ad una ridotta permeabilità e fluidità della membrana;

- 2 - acidi grassi insaturi (unsaturated fatty acid, UFA), con una tipica struttura ripiegata data dalla presenza di insaturazioni (detti anche doppi legami) lungo la catena di atomi di carbonio. Se è presente solo un doppio legame, la struttura si dice MONOINSATURA (monounsaturated fatty acid, MUFA). La tipica forma ripiegata si spiega per la particolare configurazione del doppio legame, dove la catena degli atomi di carbonio si dispone in una geometria specifica detta CIS (=dalla stessa parte).

È importante sottolineare che durante la biosintesi l'acido grasso saturo può essere trasformato enzimaticamente (tramite l'enzima DESATURASI) in acido grasso insaturo. L'enzima desaturasi provvede a creare l'insaturazione lungo la catena,

soltanto in determinate posizioni (posizioni 5, 6 oppure 9) e specificatamente nella configurazione CIS. Nelle cellule eucariotiche sono presenti acidi grassi insaturi come isomeri geometrici CIS, nella quasi totalità dei casi. La struttura ripiegata è importantissima, perché permette di distanziare opportunamente la disposizione lipidica del doppio strato, conferendo maggiore mobilità e spazio di interazione. Senza la presenza delle insaturazioni, oltre a non avere caratteristiche di permeabilità e fluidità idonee agli scambi passivi, la membrana non potrebbe ospitare correttamente le strutture proteiche che danno luogo ai siti recettoriali ed alle segnalazioni cellulari. Pertanto la conservazione della geometria dei doppi legami CIS è una delle necessità più impellenti per la formazione della cellula eucariotica. Va sottolineato che il cambiamento della struttura geometrica lipidica significa la trasformazione del doppio legame da cis a TRANS. Il ruolo degli acidi grassi TRANS è quello di essere molecole NON NATURALI, che hanno un effetto profondamente diverso sull'organizzazione della membrana e sull'intero metabolismo. La loro struttura lineare può somigliare a quella degli acidi grassi saturi, che però sono molecole naturali. L'utilizzazione di oli trattati chimicamente (parziale idrogenazione, deodorizzazione) può risultare nella formazione ed assimilazione di acidi grassi trans. Pertanto, è importante controllare la qualità degli alimenti, soprattutto quelli confezionati onde evitare l'assunzione di acidi grassi deleteri per la salute. D'altra parte, è anche noto che la formazione di acidi grassi trans può essere ENDOGENA, ovvero può avvenire in condizioni di stress radicalico. In tal caso, la quantità degli ISOMERI TRANS (che richiede protocolli analitici ben definiti) e la loro presenza nella membrana cellulare può segnalare a quale stress sia sottoposto l'organismo, ovvero se si stia superando una soglia di stress che non è più controllata dalle difese naturali della cellula.

Acidi grassi e cenni della biosintesi.

La biosintesi degli acidi grassi saturi (che avviene ad opera dell'enzima FATTY ACID SYNTHASE, FAS) ha come prodotto principale l'acido palmitico (catena di 16 atomi di Carbonio). Per azione di un enzima, detto ELONGASI, esso viene allungato ad acido stearico (18 atomi di carbonio). Osserviamo che l'enzima elongasi effettua l'assemblaggio delle catene di atomi di carbonio, procedendo con una modalità di tipo 2+2, quindi le catene degli acidi grassi così biosintetizzate sono sempre con un numero pari di atomi di Carbonio. Come si diceva precedentemente, dagli acidi grassi saturi per biosintesi vengono ottenuti acidi grassi monoinsaturi, ovvero con un doppio legame che si forma per via enzimatica (desaturasi). In particolare con l'azione della desaturasi delta-9 (e meno probabilmente desaturasi delta-6) avviene la trasformazione dei monoinsaturi: la desaturazione dell'acido palmitico fornisce l'acido palmitoleico (16 atomi di carbonio ed 1 doppio legame) e la desaturazione dell'acido stearico che fornisce l'acido oleico (18 atomi di carbonio ed 1 doppio legame). Gli enzimi della biosintesi possono essere influenzati, ovvero indotti o inibiti, da una varietà di situazioni metaboliche, che devono essere approfondite nelle sedi opportune, collegandole anche alle situazioni patologiche. In generale, possiamo accennare che l'inibizione dell'attività di desaturasi può avvenire a causa di mancanza di cofattori indispensabili, quali vitamine del gruppo B, biotina, NADH,

magnesio e zinco, ma anche a causa di alcune sostanze (alcol). Un malfunzionamento del fegato può essere segnalato proprio dall'alterazione della biosintesi lipidica e dal mancato funzionamento degli enzimi desaturasi o, più difficilmente, di elongasi.

Acidi grassi essenziali omega-6 ed omega-3.

Mentre le cellule batteriche sono formate soltanto da acidi grassi saturi e monoinsaturi,

le cellule eucariotiche devono includere un'altra categoria di acidi grassi, detti acidi grassi polinsaturi. Gli acidi grassi insaturi che presentano più di un doppio legame si chiamano appunto polinsaturi (polyunsaturated fatty acids, PUFA) divisi in due famiglie, gli acidi grassi omega-6 ed omega-3. Questi particolari componenti sono anche detti ESSENZIALI (EFA, Essential Fatty Acids), perché essi provengono per l'uomo solo dalla nutrizione.

L'acido LINOLEICO, precursore degli omega-6, e l'acido ALFA-LINOLENICO, precursore degli omega-3, devono essere presi dagli alimenti, quindi se non si consumano gli alimenti che li contengono, si crea una situazione di deficit. È da osservare che le fonti alimentari per i due tipi di PUFA non sono equivalentemente disponibili. Difatti per l'acido linoleico il livello è assicurato per la presenza nell'alimentazione di oli vegetali, semi oleosi ed una varietà di altre fonti animali e vegetali. Invece per l'acido alfa-linolenico, le fonti principali possono essere i semi di lino oppure l'olio di lino, le noci e pochi altri alimenti (ovviamente anche i vegetali, ma essi sono soprattutto ricchi della pista omega-6). Per la serie omega-3 è fondamentale l'apporto di pesce nella dieta, che fornisce in particolare EPA e DHA. Attenzione alla nomenclatura degli acidi grassi, per non confondere l'acido linalolenico della serie omega-3 con l'acido gamma-linolenico della serie omega-6. Guardando la successiva Tabella delle piste si coglie la differenza tra le strutture degli acidi grassi, e si comprende l'attenta selezione delle strutture effettuata da ciascun enzima. Per esempio, si nota che l'acido alfa-linolenico è substrato dell'enzima delta-6 desaturasi, mentre l'acido gamma linolenico (che presenta soltanto i doppi legami spostati di 2 unità) è substrato dell'enzima elongasi. Per comprendere gli acidi grassi fino in fondo dovremo divenire abili come gli enzimi! La disponibilità diversa di fonti degli EFA fa sì che l'approvvigionamento di omega-6 nell'alimentazione prevalga, e se non si predispone una strategia di equilibrio di apporto alimentare, facilmente si cade nello squilibrio tra le due fonti di PUFA. Attualmente si stima che il rapporto omega-6/omega-3 sia da 10:1 a 20:1, mentre l'ideale si attesta su 4:1/ 5:1.

È diventato sempre più evidente che il bilanciamento tra le due piste sia indispensabile per assicurare la correttezza dell'assetto strutturale funzionale della cellula e dei tessuti. La cascata di trasformazioni enzimatiche che interessa l'acido linoleico e l'acido alfa-linolenico nell'organismo dà luogo a tutti gli altri costituenti delle due famiglie di acidi grassi polinsaturi omega-3 ed omega-6. Come si vede dal percorso biosintetico, i due tipi di enzimi già precedentemente indicati, desaturasi ed elongasi, lavorano anche con i PUFA. Per formare i doppi legami cis, delta-6 e delta-5 desaturasi sono enzimi che lavorano con i PUFA. Ancora una volta i fattori

sopra citati di stimolazione o inibizione dell'attività enzimatica, nonché lo stato di funzionamento epatico, giocano un ruolo importante per fare avvenire tutte le trasformazioni metaboliche. È anche evidente che la competizione regola quale substrato potrà essere effettivamente metabolizzato, pertanto l'equilibrio della supplementazione delle due piste deve essere mantenuto. Ciò vale anche nel caso della supplementazione nutraceutica di omega-3 che deve essere calcolata in modo da non sopravvalere il contributo naturale della pista omega-6 (il rapporto naturale è omega-6/omega-3 4:1 e non viceversa). L'assorbimento dei principi essenziali nell'intestino è anch'esso necessario per far sì che dall'alimentazione possano essere ottenuti i risultati attesi. Inoltre, nel caso degli acidi grassi polinsaturi, si aggiunge il fenomeno della reattività chimica alle ossidazioni, ovvero la facilità dei PUFA di essere degradati da condizioni ossidative oppure dai radicali liberi.

Pertanto, nel valutare la presenza dei PUFA e la loro biodisponibilità, si deve tenere conto della loro protezione mediante sostanze antiossidanti e anti-radicali liberi. Alle famiglie omega-6 ed omega-3 appartengono importanti componenti polinsaturi, come l'acido arachidonico (omega-6), l'acido eicosapentaenoico (EPA, omega-3) e l'acido docosaesaenoico (DHA, omega-3) che sono anche caratteristici delle composizioni di tessuti diversi nell'organismo, come la membrana eritrocitaria e le cellule nervose (vedi tabella dei tessuti precedente). È anche ben noto che ciascuno di questi acidi grassi può essere trasformato in altri importanti metaboliti, come prostaglandine, trombossani, leucotrieni, aventi attività biologiche di mediatori di segnalazione cellulare e regolazione metabolica, necessarie all'organismo. La ricerca in lipidomica sta scoprendo numerose altre attività e connessioni tra gli acidi grassi appartenenti alle piste omega-6 (AA, acido arachidonico) ed omega-3 (per esempio, EPA), e su tutte deve essere evidenziato che la membrana è proprio il sito dal quale questi acidi grassi vengono rimossi per azione della fosfolipasi (PLA₂) per effettuare le loro azioni biologiche, come si vede dalla figura. Ciò rende importante proprio la conoscenza dello stato degli acidi grassi di membrana per poter effettuare una valutazione a livello molecolare, correlabile alla condizione metabolica del soggetto.

Analisi Lipidomica e Nutrizione

La lipidomica ha un'interessante applicazione nella valutazione della nutrizione. Si deve subito sottolineare che le informazioni ottenibili dall'esame lipidomico dipendono dal compartimento di osservazione. Difatti, se il punto di osservazione è il plasma, ottenuto separando la parte corpuscolata (cellulare) dalla componente solubile (siero e proteine solubili), possono essere valutati i lipidi "circolanti", principalmente trigliceridi, fosfolipidi legati a proteine, acidi grassi legati a colesterolo. Si tratta dei grassi che sono metabolicamente disponibili (provenienti sia da biosintesi che dieta) ma non hanno dato ancora vita ad alcuna struttura di funzionamento. Dal plasma si ottiene principalmente un'analisi lipidica la cui informazione si riferisce all'alimentazione e biosintesi a breve termine, cioè effettuata nei pochi giorni precedenti l'esame. I valori degli acidi grassi presenti nel plasma oscillano da un giorno all'altro e non danno luogo a valori stabili, che possano essere raccolti in una tabella, come accade invece per i tessuti e membrane

cellulari in generale. Se è necessaria solo tale informazione a breve termine, anche il plasma può risultare interessante.

Il punto di osservazione della membrana raccoglie un'informazione più comprensiva, perché fornisce il risultato del metabolismo, partendo dalla presenza dei lipidi (sia provenienti dalla biosintesi che dalla dieta) per dare luogo ai fosfolipidi. Tale componente verrà inserita nelle cellule in differenti proporzioni a seconda delle famiglie (saturi, in saturi, polinsaturi) e darà luogo alla struttura e funzionalità del doppio strato, a seconda del tessuto in questione. La combinazione delle varie componenti di acidi grassi è determinata proprio dalla caratteristica del tessuto in osservazione, ovvero per far sì che il tessuto funzioni deve mantenersi vicina alla composizione caratteristica, come si è visto dalla precedente tabella della composizione dei tessuti. Ciò è estremamente importante nel momento della replicazione cellulare, che rappresenta anche un'opportunità di ricambio per il tessuto stesso, ed appare chiaro che se a livello molecolare tutte le componenti acidi grassi sono disponibili, il tessuto in formazione può essere riformato senza "difetti". Se invece si sono creati deficit, il tessuto in formazione incamera "difetti molecolari", che a seconda dell'entità, possono anche risultare deleteri per la stabilità strutturale e funzionale. Quindi, esaminando i fosfolipidi, si ottengono informazioni dinamiche sulla disponibilità e trasformazione degli acidi grassi, come richiesto appunto dal quadro lipidomico. Il punto di osservazione del sangue intero, sommando la composizione del plasma con quella delle membrane, mescola di conseguenza le due informazioni sopra descritte. Pur essendo più semplice da effettuare, perché il prelievo può consistere anche in una goccia di sangue, può sostituire eventualmente solo l'esame del plasma e non quello della membrana.

La scelta della membrana cellulare sulla quale eseguire l'analisi lipidomica deve rispondere a quattro requisiti fondamentali:

- 1- La composizione deve essere rappresentativa dello stato generale dell'organismo, ma deve essere stabile nel tempo, ovvero non influenzata da situazioni contingenti o a breve termine;
- 2- il prelievamento di queste membrane deve essere eseguito nel soggetto senza procedure troppo invasive;
- 3- la tipologia dagli acidi grassi presenti nelle membrane deve coprire tutte le classi principali (saturi, monoinsaturi, omega-6 ed omega-3) per fornire il maggior numero di indicazioni possibili, sia sullo stile di vita ed alimentare che sulle sintesi di mediatori importanti nel metabolismo cellulare;
- 4- il ripristino della situazione di equilibrio deve essere esaminabile in tempi standard e non eccessivamente lunghi.

Per tutte queste considerazioni la membrana eritrocitaria è sicuramente la più idonea ad applicare i principi della lipidomica. Il prelievo di sangue è utilizzato di routine in diagnostica. La composizione della membrana eritrocitaria è il risultato combinato di: capacità biosintetiche, regime dietetico stabilizzato, presenza dei cofattori per l'attività enzimatica ed epatica (sintesi di acidi grassi e fosfolipidi), insieme a fattori genetici, stato radicalico e scambi cellulari. L'eritrocita maturo non può più biosintetizzare lipidi, perciò la sua stabilità di membrana dipende anche

dagli scambi che effettua con le lipoproteine circolanti. Inoltre, l'eritrocita dà informazioni su tutte le famiglie di acidi grassi, compresi quelli che sono importanti mediatori e segnalatori (processi infiammatori, immunitari, ecc.). È da sottolineare che la membrana eritrocitaria è il naturale deposito di acido arachidonico. Infine, essendo la vita media dell'eritrocita di 120 giorni, il dato che ne deriva risulta essere anche stabile nel tempo e resistente di trattamenti di durata almeno di 4 mesi. Per la funzionalità della membrana eritrocitaria è molto importante il bilanciamento di componenti sature ed insature, di omega-6 e omega-3, in modo da rendere ottimali le attività di scambio e ossigenazione. Quindi l'organismo effettua le scelte migliori degli acidi grassi proprio per il globulo rosso, ovviamente secondo la disponibilità del soggetto. Altre cellule del sangue non sarebbero così informative sulla lipidomica: difatti la lipidomica di piastrine e linfociti è calibrata per funzionamenti specializzati, e non è rappresentativa della funzione "di reporter" da tutti i distretti dell'organismo come è la lipidomica dell'eritrocita.

Dott. Vincenzo Di Donna