

## Introduzione:

La Vitamina D è un ormone steroideo con effetti scheletrici quali la regolazione del metabolismo del calcio e dell'omeostasi ossea ed effetti extra-scheletrici su molti organi e sistemi, inclusi pancreas, fegato, sistema immunitario e cardiovascolare, e tessuto adiposo. Recenti ricerche, confermate da studi in vitro e in vivo, hanno evidenziato il ruolo cruciale della Vitamina D nel metabolismo pancreatico, nel rilascio dell'insulina e nell'aumentata sensibilità insulinica di tessuti e organi periferici. L'ipovitaminosi D è associata a diabete di tipo 2 (DMT2), ipertensione, dislipidemia, obesità e insulino-resistenza. I pazienti obesi spesso mostrano grave ipovitaminosi. Noi ipotizziamo che marker metabolici, infiammatori e ormonali dell'obesità possano modulare l'espressione delle idrossilasi della Vitamina D nel fegato e in altri tessuti, compromettendone la biodisponibilità.

## Scopo

Lo scopo di questo progetto di ricerca è di studiare e approfondire i meccanismi con cui gli effettori metabolici, ormonali e infiammatori della condizione di obesità influenzano e modulano la biodisponibilità di Vitamina D mediante uno studio traslazionale e con un metodo innovativo che utilizza la cromatografia liquida ad elevata prestazione accoppiata alla spettrometria di massa tandem (HPLC-MS-MS) capace di misurare contemporaneamente la Vitamina D e i suoi metaboliti (25-OHD3, 24,25(OH)<sub>2</sub>D3, 1,25(OH)<sub>2</sub>D3) in campioni di plasma.

## Materiali e Metodi:

È stato utilizzato un modello murino (topi maschi CD1) di obesità/insulino resistenza. I topi sono stati mantenuti in condizioni ambientali controllate (temperatura 32°C, umidità al 50%, cicli di 12 ore luce/buio per assicurare la quota vitaminica D prodotta a livello cutaneo), libero accesso a cibo e acqua, prima di iniziare i trattamenti dietetici. La condizione di obesità è stata sperimentalmente indotta attraverso la somministrazione di una dieta ad elevato contenuto di grassi (HFD) che fornisce 18,3% kcal dalle proteine, 21,4% kcal dai carboidrati e 60,8% kcal dai grassi (5,1 kcal/g). La dieta standard (SD) fornisce 24% kcal dalle proteine, 58% kcal dai carboidrati and 18% kcal dai grassi (3.1 kcal/g). Entrambe HFD e SD sono supplementate con Vitamina D3, 1500 UI e 500 UI rispettivamente. Tutti gli animali sono stati manipolati una volta al giorno e il loro peso è stato monitorato per l'intera durata dell'esperimento.

I 45 topi CD1 iniziali sono stati sottoposti a differenti regimi dietetici come mostrato in figura 1.

I tessuti ottenuti al sacrificio sono stati conservati a -80°C per successive analisi.

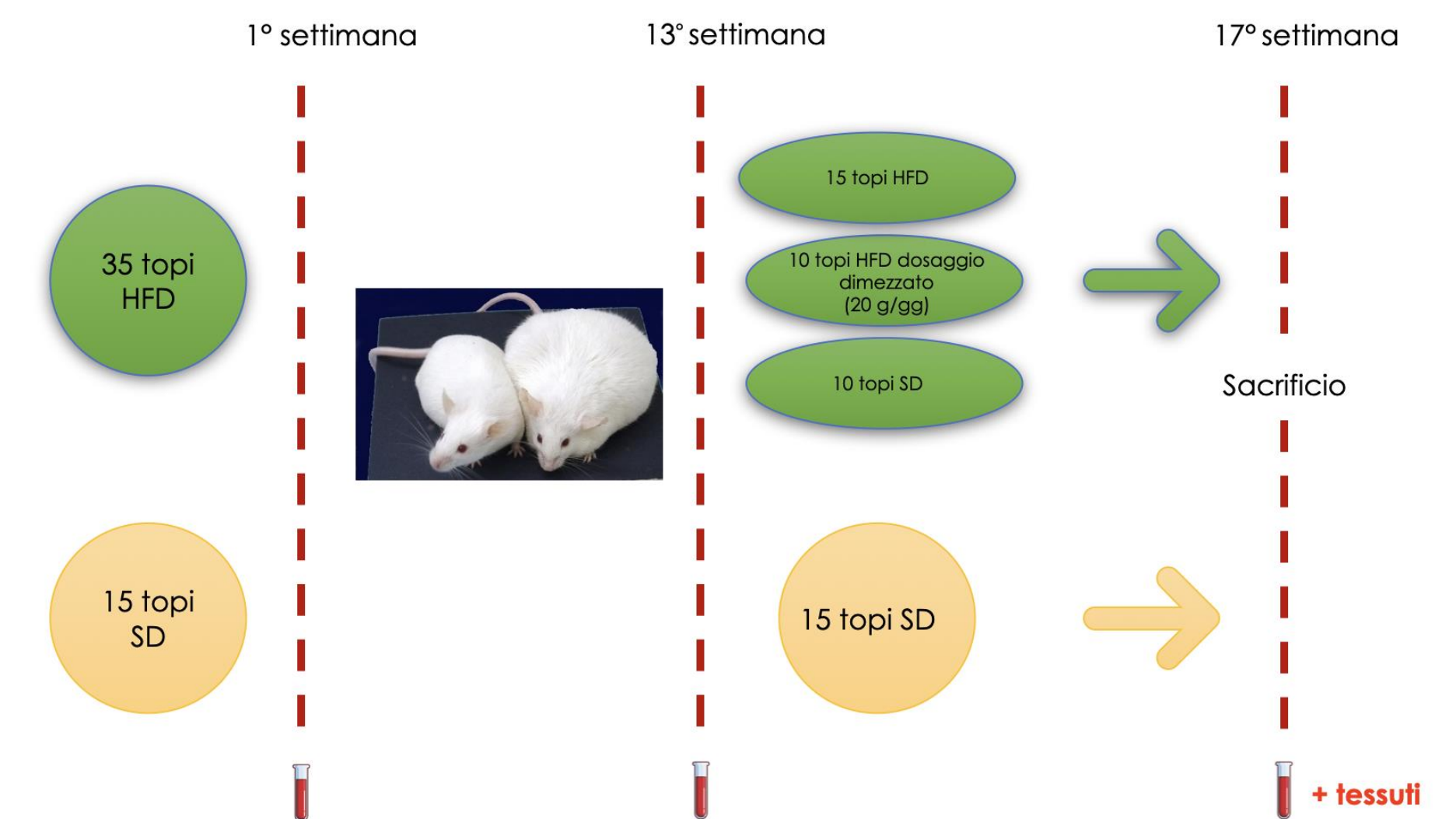


Figura 1 : Flow-chart dello studio

## Metodo HPLC-MS-MS

**Instrumental layout:** Agilent 1290 UHPLC system accoppiato a spettrometro di massa AB-Sciex 6500+ Qtrap, dotato di sorgente ESI.

**Colonna:** Waters Beh Phenyl 1.7 μm, 50 x 2.1mm

**Gradiente:** Metanolo (solvente A) - Acqua (solvente B), entrambi addizionati con 0,5 mM MeNH<sub>2</sub>

Il metodo di massa è in multiple reaction monitoring (MRM), modalità ionica positiva, MS3 e le transizioni quantificatrici sono le seguenti (figura 2):

Composto	24,25(OH) <sub>2</sub> -VitD3	Vitamina D3	1,25(OH) <sub>2</sub> -VitD3	25(OH)-VitD3
<b>Transizione quantificatrice</b>	623.4 → 280.2	559.1 → 280.0	623.5 → 314.1	607.3 → 298.3
<b>Composto</b>	D6_24,25(OH) <sub>2</sub> -VitD3	D3_Vitamina D3	13C3_1,25(OH) <sub>2</sub> -VitD3	D6_25(OH)-VitD3
<b>Transizione quantificatrice</b>	629.5 → 385.6	594.4 → 283.3	626.4 → 314.4	613.4 → 298.3

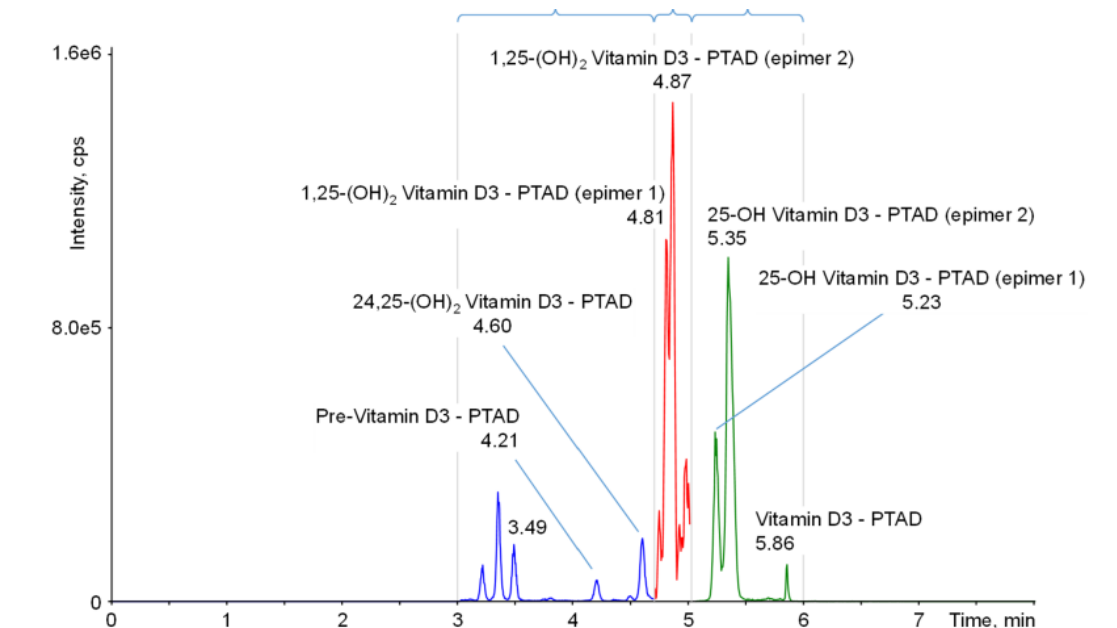


Figura 2 : Metodo MS e Cromatografia della Vitamina D e dei suoi metaboliti

## Risultati e discussione:

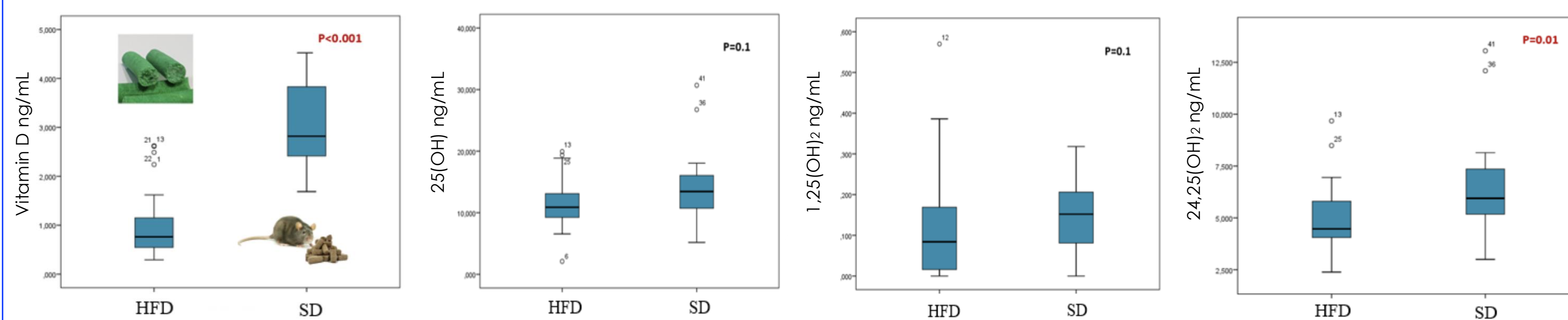


Figura 3 : risultati in condizioni basali e confronto tra il gruppo HFD e il gruppo SD.

### Risultati (1)

In condizioni basali i livelli del precursore sono significativamente ridotti in topi HFD rispetto ai topi SD; questo riflette il diverso apporto dietetico. I livelli di 24,25(OH)<sub>2</sub> sono significativamente ridotti nel gruppo HFD rispetto al gruppo SD; probabilmente l'eccesso di precursore nel gruppo SD viene eliminato come catabolita. I livelli di 25(OH) e 1,25(OH)<sub>2</sub> sono gli stessi in entrambi i gruppi a dimostrazione che l'idrossilazione epatica e renale hanno meccanismi conservati in condizioni basali (Figura 3).

### Risultati (2)

Dopo 13 settimane di trattamento dietetico i livelli del precursore risultano ridotti nel gruppo HFD rispetto al gruppo SD, così come i livelli di 25(OH), a causa del sequestro nel tessuto adiposo e della modulazione da parte di fattori metabolici sull'inibizione dell'idrossilazione epatica. Nessuna differenza significativa è stata osservata per la 24,25(OH)<sub>2</sub> e per la 1,25(OH)<sub>2</sub> (trend in diminuzione nel gruppo HFD) tra i due gruppi; quest'ultima probabilmente per una compensazione dell'idrossilazione renale ed extra renale. (Figura 4).

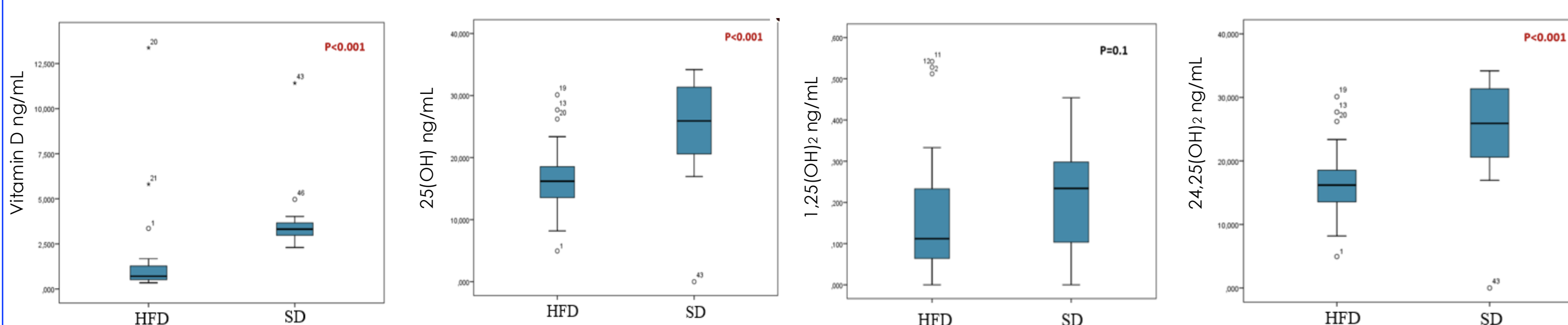


Figura 4: risultati dopo 13 settimane di trattamento dietetico.

### Risultati (3)

Al termine delle 17 settimane i 4 gruppi mostrano tali risultati: la Vitamina D presenta dei livelli significativamente aumentati nei gruppi 3 e 4 rispetto agli altri due. Comportamento simile si ritrova nella 25(OH). Questo aumento è interpretato come il rilascio da parte del tessuto adiposo a seguito della perdita di peso. I livelli di 1,25(OH)<sub>2</sub> sono significativamente aumentati nei gruppi 1 e 2 rispetto ai gruppi 3 e 4 per la compensazione dell'idrossilazione renale ed extra-renale (figura 5).

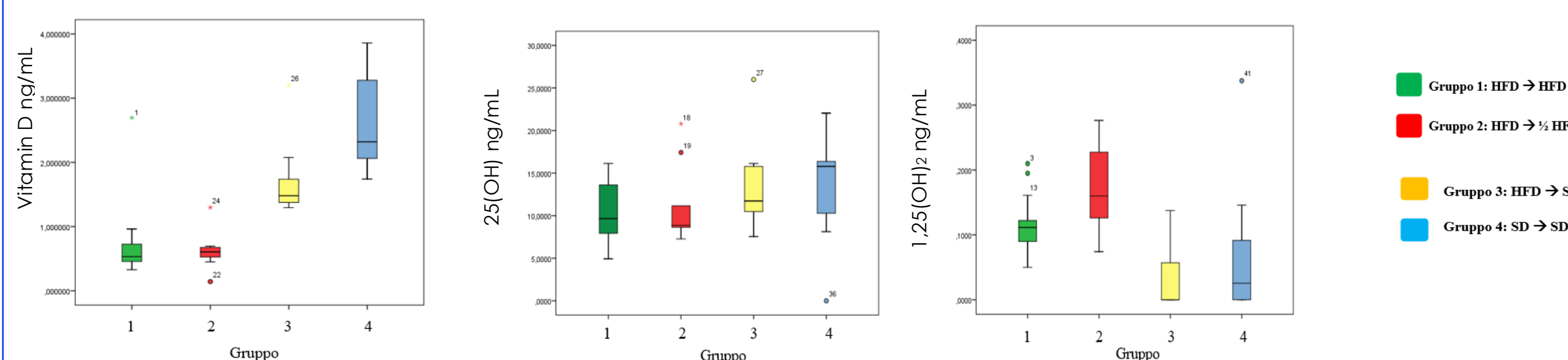


Figura 5: risultati al sacrificio e confronto tra i quattro gruppi di trattamento.

## Conclusioni:

Lo studio conferma il ruolo extra-scheletrico della vitamina D e l'associazione tra obesità e ipovitaminosi. Bassi livelli di 25(OH) e degli altri metaboliti negli obesi potrebbero derivare da una ridotta idrossilazione epatica modulata da fattori metabolici. I risultati da noi ottenuti sono preliminari a future analisi su pazienti, data la natura traslazionale dello studio, nei quali misureremo mediante HPLC-MS-MS la vitamina D e i suoi metaboliti. Allo stesso tempo vogliamo analizzare gli aspetti genetici del metabolismo, misurando i geni correlati alla resistenza insulinica e le idrossilasi della vitamina D mediante real-time PCR in campioni di plasma e tessuto, e in aggiunta marker infiammatori e ormonali mediante ELISA.

## Bibliografia: