



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PARMA

Dottorato di ricerca in GASTROENDOCRINOLOGIA PEDIATRICA

Ciclo XXII

**STUDIO, ANALISI BIOCHIMICA E METABOLISMO DEGLI
ALCOOL-ZUCCHERI NEL LATTE UMANO E NEL NEONATO**

Coordinatore

Chiar.mo Prof: Giulio Bevilacqua

Tutor

Chiar.mo Prof. GianLuigi de' Angelis

Dottorando: Dott.ssa Gianotti Daniela

INDICE

CAPITOLO 1

INTRODUZIONE

1.1	I CARBOIDRATI : <i>biochimica</i>	3
1.2	GLI ALCOOL-ZUCCHERI : <i>biochimica</i>	7
1.3	METABOLISMO DEGLI ZUCCHERI : <i>CENNI DI FISIOLOGIA DALLA VITA FETALE ALLA VITA POST-NATALE</i>	8
1.4	METABOLISMO DEGLI ALCOOL-ZUCCHERI: <i>CENNI DI FISIOLOGIA</i>	16
	1.4.1 ALCOOL-ZUCCHERI E METABOLISMO MATERNO-FETALE	20
1.5	OBIETTIVI	26

CAPITOLO 2

MATERIALI E METODI

2.1	METODICA DI ESTRAZIONE DEGLI ALCOOL-ZUCCHERI NEL LATTE E NEL SIERO	28
2.2	PROTOCOLLO DI STUDIO	31
	2.2.1 STUDIO A: CONCENTRAZIONE DEGLI ALCOOL-ZUCCHERI: ANALISI COMPARATA NEL LATTE UMANO E DI FORMULA	31
	2.2.2 STUDIO B: METABOLISMO DEI CARBOIDRATI E DEGLI ALCOOL-ZUCCHERI NEL NEONATO A TERMINE	32
2.3	ANALISI STATISTICA	33
	2.3.1 STUDIO A	33
	2.3.2 STUDIO B	33

CAPITOLO 3

RISULTATI

3.1 STUDIO A	34
3.2 STUDIO B	41

CAPITOLO 4

CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

4.1 STUDIO A	50
4.2 STUDIO B	53

CAPITOLO 5

DISCUSSIONE	58
--------------------	----

CAPITOLO 6

CONCLUSIONI	64
--------------------	----

CAPITOLO 7

BIBLIOGRAFIA	66
---------------------	----

CAPITOLO 1

INTRODUZIONE

1.1 I CARBOIDRATI: *biochimica*

I carboidrati, sono le biomolecole più abbondanti in natura nonché i più veloci fornitori di energia biochimica. Sono così definiti (idrati di carbonio) per la presenza di un rapporto idrogeno-ossigeno simile a quello dell'acqua (CH_2O) formula generale $\text{C}_x (\text{H}_2\text{O})_y$; molti dei carboidrati più comuni si adattano a questa formula empirica, altri hanno differenti formule chimiche o contengono atomi di azoto, fosforo o zolfo. Sono presenti in modo consistente nei tessuti dei viventi con funzione energetica; inoltre, hanno funzione di riserva (amido, glicogeno) e di sostegno (cellulose, emicellulose ecc. dei vegetali, chitina degli Insetti). Dal punto di vista chimico sono alcoli polivalenti, cui si collega o una funzione chetonica o una aldeidica.

Vengono comunemente classificati in: monosaccaridi, oligosaccaridi e polisaccaridi ("saccaride" dal greco *sakkaran* = zucchero), a seconda del numero di zuccheri semplici presenti nella formula

I ***monosaccaridi*** o semplicemente zuccheri, sono aldeidi o chetoni con 1 o più gruppi ossidrilici (C-OH). A seconda che il gruppo carbonilico (C=O) si trovi all'estremità della catena carboniosa o in qualunque altra posizione, il monosaccaride viene definito rispettivamente *aldosio* o *chetosio*.

I monosaccaridi sia in forma aldeidica o chetonica con uno scheletro covalente a 3, 4, 5, 6, 7 atomi di carbonio sono chiamati rispettivamente *triosi*, *tetrosi*, *pentosi*, *esosi*, *eptosi*.

I monosaccaridi più comuni in natura sono gli esosi ed i principali sono rappresentati da *glucosio*, *fruttosio*, *mannosio* e *galattosio*. Gli aldopentosi tra cui il *ribosio* sono invece componenti dei nucleotidi e degli acidi nucleici.

Oltre agli esosi semplici esiste un certo numero di derivati in cui un gruppo ossidrilico del composto di origine, viene rimpiazzato da un altro sostituyente oppure un atomo di carbonio viene ossidato a gruppo carbossilico; tra questi ci sono le *glucosammine*, le *galattosammine* e l'*acido gluconico*.

I **disaccaridi** che fanno parte degli oligosaccaridi (che possono contenere fino a 10 unità monosaccaridiche), come il *maltosio*, il *lattosio* e il *saccarosio* sono costituiti da 2 monosaccaridi uniti da un legame O-glicosidico che si forma quando un gruppo ossidrilico di uno zucchero reagisce con un atomo di carbonio anomero dell'altro zucchero. Tale legame è facilmente idrolizzato dagli acidi. Un altro tipo di legame glicosidico unisce il carbonio anomero di uno zucchero con un atomo di azoto e il legame N-glicosidico che ne deriva, è presente in tutti i nucleotidi.

Tra i disaccaridi, il maltosio contiene 2 residui di glucosio uniti da un legame glicosidico, mentre il lattosio contiene 1 residuo di glucosio e 1 di galattosio ed è presente nel latte; il saccarosio è invece composto da glucosio e fruttosio e viene sintetizzato dalle piante ma non dagli animali superiori; è infatti il principale prodotto intermedio della fotosintesi e in molte piante rappresenta la forma con

cui viene trasportato lo zucchero dalle foglie alle altre parti, attraverso i sistemi vascolari.

I ***polisaccaridi*** chiamati anche *glicani*, sono polimeri con una massa molecolare molto elevata. Differiscono tra loro per il tipo di unità saccaridica ricorrente, per la lunghezza della catena, per il tipo di legame glicosidico che unisce le unità e per il grado di ramificazione.

Gli *omopolisaccaridi* contengono soltanto un tipo di unità monomerica, alcuni servono come riserva di tali unità, che a loro volta sono sostanze nutrienti, come l'*amido* e il *glicogeno*, altri come la *cellulosa* e la *chitina* sono invece elementi strutturali delle pareti cellulari delle piante e dell'esoscheletro degli animali.

Gli *eteropolisaccaridi*, costituiti da 2 o più tipi di unità monomeriche, rappresentano un supporto extracellulare negli organismi di qualsiasi tipo, e formano la sacca cellulare dei batteri (*peptidoglicani*), o il tessuto connettivo (*glicosamminoglicani* tra cui l'*acido ialuronico*), o si ritrovano in grandi aggregati con proteine (*proteoglicani*) e sono responsabili delle proprietà lubrificanti di alcuni tipi di secrezioni extracellulari. A differenza delle proteine, sintetizzate su uno stampo (RNA messaggero) con una sequenza e una lunghezza definita, per la sintesi dei polisaccaridi il “programma di sintesi” è intrinseco negli enzimi che catalizzano la polimerizzazione delle unità monomeriche.

La **Tabella 1** rappresenta la classificazione dei principali carboidrati presenti nei cibi.

Classe	Grado di polimerizzazione	Sottoclasse	Esempi
Monosaccaridi	1	Zuccheri, Monosaccaridi idrogenati	glucosio, fruttosio, galattosio, eritritolo, xilitolo, mannitolo, sorbitolo
Disaccaridi	2	Zuccheri, Disaccaridi idrogenati	saccarosio, maltosio, lattosio, maltitolo, isomaltitolo, lattitolo
Oligosaccaridi	3-9	Malto-oligosaccaridi, altri Oligosaccaridi, Oligosaccaridi idrogenati	maltodestrine, frutto-oligosaccaridi, galateo-oligosaccaridi, fibre idrogenate idrolizzate
Polisaccaridi	>9	Fibre, Polisaccaridi idrogenati	amilosio, amilopectina, fibre modificate, cellulosa, pectine, polidestrosio idrogenato

1.2ALCOOL-ZUCCHERI: *biochimica*

Gli alcool-zuccheri, detti anche carboidrati idrogenati o polialcoli, si chiamano così' perche'presentano un alcool gruppo (CH-OH) al posto del gruppo carbossilico (C=O) nelle porzioni aldosiche o chetosiche di mono-, di-, oligo- e polisaccaridi. Non sono quindi zuccheri in senso stretto e nemmeno alcoli propriamente detti. Infatti gli zuccheri dal punto di vista biochimico, comprendono solo mono e disaccaridi, mentre gli alcoli, tra cui il metanolo e l'etanolo, sono composti organici simili agli alcani (appartenenti alla classe degli idrocarburi), in cui un atomo di idrogeno è sostituito da un gruppo ossidrile -OH ($C_nH_{(2n+2)}O$). In accordo con la moderna nomenclatura dei carboidrati, gli alcool-zuccheri presentano il suffisso “-itolo” al posto del suffisso “-oso” e secondo la normativa della comunità Europea del 1994, possono essere aggiunti in tutti i prodotti alimentari così definiti “senza zucchero”.¹ I principali alcool-zuccheri sono: *sorbitolo, mannitolo, xilitolo, lattitolo, maltitolo* e sono rappresentati nella **Tabella 2**.

Tabella 2

Alcool-zuccheri	Formula	Tipo di saccaride	Peso molecolare
Eritritolo	$C_4H_{10}O_4$	Mono-	122*12
Xilitolo	$C_5H_{12}O_5$	Mono	152*15
Mannitolo	$C_6H_{14}O_6$	Mono	182*17
Sorbitolo	$C_6H_{14}O_6$	Mono	182*17
Lattitolo	$C_{12}H_{24}O_{11}$	Di-	344*3
Isomaltitolo	$C_{12}H_{24}O_{11}$	Di-misto	344*3
Maltitolo	$C_{12}H_{24}O_{11}$	Di-	344*3

1.3 CENNI DI FISIOLOGIA DEL METABOLISMO DEGLI ZUCCHERI DALLA VITA FETALE ALLA VITA POST-NATALE

Il glucosio rappresenta una necessità assoluta dei mammiferi. Il cervello e il sistema nervoso, la parte midollare del rene, i testicoli, gli eritrociti ed i tessuti embrionali, utilizzano il glucosio presente nel sangue come unica o principale sostanza nutriente; il cervello umano consuma oltre 120 g di glucosio al giorno e quello di un neonato utilizza in media 4.9 mg/100 g di tessuto/minuto di glucosio.

Durante la gravidanza il feto riceve attraverso la placenta una certa quantità di

substrati necessari per lo sviluppo, per la creazione delle riserve necessarie dopo la nascita e per il metabolismo basale.

Il glucosio rappresenta il principale nutrimento per il feto, la maggior parte del quale deriva dal sangue materno e solo in minima parte dalla gluconeogenesi fetale o placentare.

Due sono le vie di passaggio attraverso la placenta; la prima paracellulare soddisfa il 5%, mentre la seconda transcellulare assicura il restante 95%.² I carriers che regolano il passaggio transplacentare sono trasportatori GLUT ad altissima affinità, tra cui GLUT 1 è presente sia sul versante del sinciziotrofoblasto sia all'interno del villo e la sua concentrazione aumenta in maniera proporzionale all'età gestazionale, mentre GLUT 3 si trova principalmente a livello del sinciziotrofoblasto. Il flusso attraverso i trasportatori non è monodirezionale ma dipende dal gradiente di concentrazione.

durante la gravidanza, la necessità fetale di glucosio cresce in modo esponenziale, soddisfatta da un aumento del gradiente materno-fetale di glucosio e da un aumento dei trasportatori. E' stato infatti dimostrato da *Marconi e coll.* che all'aumentare dell'età gestazionale le concentrazioni di glucosio nella vena ombelicale si riducono, mentre rimane invariata la concentrazione nelle arterie uterine. Esiste inoltre un rapporto lineare tra la concentrazione materna e quella fetale, in gravidanze non complicate.³

Il feto è in grado di regolare le concentrazioni di glucosio indipendentemente dagli ormoni materni; ciò si evidenzia nel caso di insufficienza placentare in cui viene attivata la gluconeogenesi, in caso di stress fetale come l'ipossia, in cui si ha un rilascio di catecolamine che mobilizzano glucosio e acidi grassi dal fegato e

dal tessuto adiposo mediante meccanismi β -adrenergici e nei feti di madri diabetiche che sono in grado di secernere alte concentrazioni di insulina, in risposta all'aumentata espressione di GLUT 1 e all'aumentato passaggio transplacentare di glucosio. Tuttavia rispetto all'adulto, l'insulina fetale ha un ruolo preferenzialmente anabolico piuttosto che di controllo metabolico; il feto risulta inoltre meno sensibile all'azione del glucagone.⁴

In alcune circostanze come nel caso di importante insufficienza placentare che determina un ritardo di crescita intrauterino, il feto non è in grado di regolare il suo metabolismo e si può verificare un'ipoglicemia fetale, che potrebbe essere la causa di successive alterazioni neurologiche post-natali.

Recenti attenzioni sono state date allo studio del metabolismo fetale di altri zuccheri diversi dal glucosio, come ad esempio *il mannosio*, zucchero importante per la sintesi di glicoproteine e glicofosfolipidi.

E' stato dimostrato che nella gravidanza umana ed ovina, la sua concentrazione plasmatica è maggiore nel sangue materno rispetto al sangue fetale,^{5,6} e i livelli venosi ombelicali sono maggiori rispetto a quelli arteriosi con una differenza veno-arteriosa ombelicale positiva. Tra concentrazione ombelicale venosa e concentrazione materna è presente inoltre una concentrazione lineare significativa.⁶ Vi è pertanto un significativo uptake di *mannosio* da parte del feto, nonostante la bassa concentrazione plasmatica materna ; questo può suggerire la presenza di trasportatori ad alta affinità per il mannosio nella placenta, così come sono stati dimostrati nei fibroblasti umani.⁷ In queste cellule inoltre la produzione di mannosio richiede la presenza di mannosio esogeno piuttosto che la sua sintesi

intracellulare a partire dal glucosio,⁸ questo fatto è ribadito dalla dimostrazione che la richiesta fetale di questo carboidrato è garantita dal metabolismo materno.⁹

In uno studio condotto sugli ovini.⁵, il **fruttosio**, diversamente dal mannosio, è presente in alte concentrazioni nel plasma fetale, in quantità circa 290 volte maggiore rispetto al sangue materno, e 5 volte maggiore rispetto alla concentrazione fetale di glucosio. *Jauniaux e coll.* hanno successivamente confermato questo dato nei liquidi embrionali.⁹

Alla nascita la brusca interruzione del passaggio di glucosio materno al feto, fa sì che i livelli plasmatici di insulina si riducano e che si verifichi un rapido rilascio di catecolamine e di glucagone da parte del pancreas entro pochi minuti o poche ore; queste modificazioni metaboliche determinano l'attivazione dei processi di glicogenolisi nel fegato, nel muscolo cardiaco e nel cervello, di gluconeogenesi e chetogenesi epatiche e di lipolisi. Il risultato di questo processo è la stabilizzazione della glicemia dopo un transitorio decremento post-natale; le scorte epatiche di glicogeno vengono rapidamente consumate entro poche ore, e la gluconeogenesi a partenza dall'alanina, fornisce circa il 10% del glucosio metabolizzato nelle prime ore di vita. Anche la concentrazione di acidi grassi liberi aumenta rapidamente insieme all'aumento del glucagone e dell'epinefrina, ed è seguita dall'incremento di corpi chetonici. In questo modo il glucosio viene risparmiato per essere utilizzato a livello cerebrale, mentre gli acidi grassi liberi e i chetoni forniscono sorgenti alternative di energia per altri organi come il muscolo.

Durante la vita neonatale, con l'inizio dell'alimentazione enterale altri substrati metabolici oltre al glucosio diventano disponibili per la produzione di energia, tra cui gli acidi grassi; l'ossidazione di questi ultimi diviene responsabile di più del 75% del consumo di ossigeno totale.

Per il fabbisogno energetico e metabolico, alcuni organi come il rene rimangono utilizzatori obbligati di glucosio, mentre altri come il cervello ossidano principalmente corpi chetonici.

Il glucosio in eccesso che non viene utilizzato dopo il pasto, è immagazzinato sotto forma di glicogeno nel fegato o convertito in grasso nel tessuto adiposo insieme agli acidi grassi presenti nel latte.

Fisiologicamente, nell'intervallo di tempo tra un pasto e l'altro, i livelli di glucosio diminuiscono con contemporanea attivazione della glicogenolisi e della gluconeogenesi, per assicurare una disponibilità continua di glucosio agli organi che sono utilizzatori obbligati. La glicogenolisi è un'inesauribile fonte di glucosio: studi con isotopi stabili hanno dimostrato un tasso di produzione neonatale di glucosio pari a 4-6 mg/Kg/min.¹⁰ I processi di lipolisi e gluconeogenesi forniscono invece fonti energetiche alternative al glucosio per tutti gli altri organi, mentre la chetogenesi produce l'energia e i cofattori necessari per la gluconeogenesi.

Il controllo del metabolismo neonatale dipende dalla sintesi dei principali enzimi implicati nei processi sopra citati e dall'induzione ormonale dell'attività enzimatica.

Il glucagone rappresenta il principale ormone regolatore, mentre il ruolo gluco-

regolatore dell'insulina nel neonato è poco chiaro e diverso dall'adulto. In molti neonati infatti l'insulina non sembra avere una grande influenza nella normale omeostasi glucidica, ma in alcuni casi alte concentrazioni di insulina possono determinare ipoglicemia.

E' inoltre di minimo significato il ruolo svolto da altri ormoni quali le catecolamine, il cortisolo, gli ormoni tiroidei e l'ormone della crescita, anche se in rari casi di ipopituitarismo o deficit di cortisolo, si può osservare ipoglicemia neonatale, il che suggerisce che un livello basale minimo di questi ormoni sia necessario per il mantenimento della normoglicemia.

Durante le modificazioni dal metabolismo fetale a quello neonatale molto importanti sono inoltre le modificazioni che avvengono nel tratto gastro-intestinale, dove l'introduzione dell'alimentazione, funge da trigger per la secrezione di peptidi ed ormoni regolatori che stimolano lo sviluppo intestinale, la differenziazione della mucosa, la motilità ed i processi di digestione e assorbimento.¹¹

Nel lattante e nel bambino, così come nell'adulto l'omeostasi glucidica è mantenuta dalla glicogenolisi nel periodo subito dopo il pasto e dalla gluconeogenesi alcune ore dopo. Il fegato di un bambino di 10 anni contiene 20-25 g di glicogeno, sufficienti a soddisfare una richiesta di glucosio di 4-6 mg/Kg/min per circa 6-12 ore, dopo questo periodo si attiva la gluconeogenesi epatica, i cui precursori sono rappresentati dalle proteine muscolari. Risulta chiaro dunque come la capacità di sopperire alla carenza di glucosio mediante la gluconeogenesi sia limitata nel bambino molto piccolo, che ha poca massa

muscolare, così come risulta limitata la capacità di rimanere per lunghi periodi di tempo a digiuno, durante i quali vengono attivate lipolisi e chetogenesi, con successiva comparsa di chetonuria.

L'insulina gioca un ruolo più importante rispetto al periodo neonatale, aumentando fino a 50-100 uM/ml dopo i pasti, attivando la glicogenosintesi e la lipogenesi e inibendo la gluconeogenesi, la lipolisi e la chetogenesi. La sua discesa durante il digiuno fino a 5-10 uM/ml attiva i processi inversi. Un maggior significato è assunto anche dagli ormoni controregolatori rappresentati dall'ormone della crescita, dal cortisolo, dalle catecolamine, e dal glucagone, che intervengono nei processi di mantenimento e bilanciamento dell'omeostasi glucidica.

Per quanto riguarda i carboidrati assunti attraverso l'alimentazione, questi costituiscono nel lattante il 40% dell'apporto calorico.

Nel latte materno la concentrazione glucidica totale è compresa tra 71 e 75 g/l, dei quali il lattosio rappresenta il principale costituente; accanto a questo si rileva una quota importante data dagli oligosaccaridi, mentre minima è la quota dei monosaccaridi, completamente assenti sono invece il saccarosio, il fruttosio e l'amido.

La digestione del ***lattosio*** avviene per opera della lattasi, la principale disaccaridasi del brush-border enterocitario, la cui concentrazione è massima al momento della nascita. Successivamente in un elevato numero di soggetti si verifica un graduale calo del patrimonio e dell'attività di lattasi che può essere molto marcato in età adulta.

Il **glucosio** e il **galattosio** derivati dalla digestione del lattosio vengono trasportati all'interno della cellula intestinale mediante un trasporto principalmente attivo che avviene nell'intestino tenue, accoppiato a quello del sodio, e più del 90% giunge al circolo portale. Le cellule della mucosa intestinale presentano almeno 3 carriers per gli esosi: SGLUT1 si trova sulla superficie apicale ed è responsabile del trasporto attivo di glucosio e galattosio insieme al sodio, GLUT5 media invece l'assorbimento del fruttosio secondo un gradiente di concentrazione, GLUT2 che si trova sulla superficie basolaterale cellulare, favorisce la diffusione di tutti e 3 gli esosi nello spazio extracellulare fino al plasma.

La maggior parte del galattosio è metabolizzata a livello epatico e utilizzata principalmente per la glicogenosintesi, piuttosto che per la conversione in glucosio. Una piccola quantità di lattosio giunge non idrolizzata al colon dove viene trasformata ad opera dei batteri in acido lattico ed altri acidi organici (acido acetico e butirrico). Questa acidificazione previene lo sviluppo di una flora batterica Gram negativa potenzialmente patogena. Oltre all'effetto bifidogeno e protettivo nei confronti di eventuali infezioni gastro-intestinali, il lattosio favorisce l'utilizzazione delle proteine e degli amminoacidi liberi e incrementa l'assorbimento intestinale di acqua, sodio e calcio.

Gli **oligosaccaridi**, che rappresentano i principali costituenti del latte umano, vengono sintetizzati dalla ghiandola mammaria ad opera di specifici enzimi tramite aggiunta di unità monosaccaridiche alla molecola base di lattosio (galattosio, fucosio, N-acetil-glucosammina, acido sialico) con formazione di molecole a struttura lineare o ramificata. Dal punto di vista metabolico, i legami specifici che uniscono i vari residui monosaccaridici formando i composti

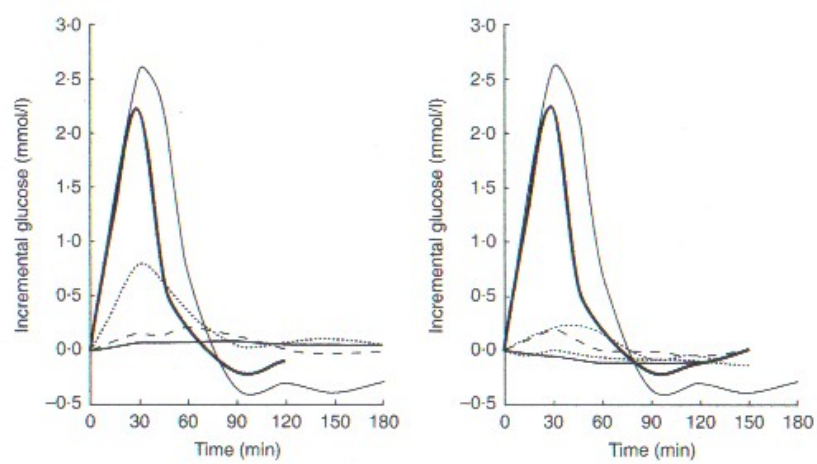
oligosaccaridi, non vengono idrolizzati dagli enzimi intestinali, motivo per cui la gran di tali composti , transita non digerita attraverso il piccolo intestino e arriva nel cieco e nel colon, dove viene utilizzata dalla flora microbica svolgendo attività prebiotica; la restante quota viene eliminata con le feci, svolgendo così il ruolo di fibra alimentare.

1.4 CENNI DI FISIOLOGIA DEL METABOLISMO DEGLI ALCOOL ZUCCHERI

Gli alcool-zuccheri hanno acquisito recentemente notevole attenzione in ambito nutrizionale, in quanto caratterizzati da un basso indice glicemico (velocità con cui si innalza la glicemia in seguito all'assunzione di 50 g di glucidi, espressa in termini percentuali rispetto ad uno standard di riferimento, che è il glucosio puro, che presenta indice glicemico pari a 100) e insulinemico (velocità con cui si innalza l'insulinemia in seguito all'assunzione di 50 g di glucidi, espressa in termini percentuali rispetto al glucosio), un basso valore energetico, oltre a presentare un basso potenziale cariogenico e un importante effetto prebiotico.

Nella **Figura 1** vengono riportate le curve glicemiche in risposta all'assunzione di zuccheri e alcool-zuccheri. Come si può notare gli zuccheri tra cui glucosio e saccarosio (curva in grassetto), determinano un importante innalzamento della curva glicemica dopo 30-60 minuti dall'intake orale, che ritorna ai livelli basali dopo circa 90 minuti. La risposta degli alcool-zuccheri è invece minima.

Figura 1



Da Nutr Res Rev 2003 modificato

Il valore dell'indice glicemico e insulinemico di ciascun alcool-zucchero è riportato in **Tabella 3**

	Indice			Indice		
	glicemico			Insulinemico		
Alcool-	Media	SD	N° studi	Media	SD	N° studi
zuccheri						
Eritritolo	0	17	4	2	1	3
Xilitolo	13	4	6	11	5	4
Sorbitolo	9	4	10	11	6	6
Mannitolo	0	-	1	0	-	1
Isomaltitolo	9	3	9	6	4	9
Lattitolo	6	2	3	4	3	2
Maltitolo	35	9	9	27	5	6

Queste proprietà sono dovute al fatto che gli alcool-zuccheri presentano una scarsa digeribilità e un lento metabolismo.¹² Durante la digestione sono in grado di resistere alla fermentazione dei microrganismi della placca dentale e all'assorbimento gastrico, e a livello dell'intestino tenue il 2% della quota monosaccaridica degli alcool-zuccheri e in quantità maggiore le quote disaccaridiche e polisaccaridiche, vengono assorbite mediante diffusione passiva. Tale processo è talmente lento e incompleto che non determina alcun sostanziale innalzamento della glicemia. La quota monosaccaridica che viene assorbita è in parte escreta per via renale, in parte ossidata direttamente o convertita a glicogeno o glucosio a livello epatico.

Gli alcool-zuccheri che non vengono assorbiti a livello del tenue vengono fermentati completamente dalla flora batterica residente.¹²

La **Tabella 4** mostra i valori di assorbimento, fermentazione ed escrezione urinaria degli alcool-zuccheri.

	Assorbimento	Fermentazione	Escr. urinaria
	(g/100g)	(g/100g)	(g/100g)
Eritritolo	90	10	90
Xilitolo	50	50	<2
Sorbitolo	25	75	<2
Mannitolo	25	75	25
Isomaltitolo	10	90	<2
Lactitolo	2	98	<2
Maltitolo	40	60	<2

1.4.1 ALCOOL-ZUCCHERI E METABOLISMO MATERNO-FETALE

Il principale substrato metabolico del feto è il glucosio ed è noto sia il suo meccanismo di passaggio attraverso la placenta che il suo ruolo nella crescita fetale in condizioni normali e patologiche,³; poco studiati sono invece gli altri carboidrati implicati nel metabolismo materno e fetale e questo è un dato sorprendente data la crescente evidenza dell'importanza che questi substrati hanno nei tessuti umani.

Alcuni studi eseguiti hanno dimostrato la presenza di un'elevata concentrazione di alcool-zuccheri, tra cui inositolo, sorbitolo, eritritolo e ribitolo nei fluidi embrionali, e nella circolazione fetale in gravidanze umane ed ovine, suggerendo la loro importanza biologica nello sviluppo umano precoce.^{5,6,9}

L'inositolo si ritrova in forma libera in tutti i tessuti umani, ma la sua concentrazione è particolarmente elevata nelle prime fasi dello sviluppo.⁹ Durante la vita intrauterina i livelli ematici fetali nella prima parte della gravidanza raggiungono valori di 125 uM, successivamente decrescono all'aumentare dell'epoca di gravidanza. Nelle prime 2 settimane di vita si ritrova in concentrazioni maggiori rispetto all'adulto.¹³ L'enzima richiesto per la sua sintesi a partire dal glucosio, la glucosio-6-P ciclasi, è stato ritrovato sia nella placenta che nel cordone ombelicale.

Un recente studio condotto da *Brusati e coll* riguardo alle concentrazioni materne e fetali degli alcool-zuccheri e di altri carboidrati in gravidanze a termine, ha

evidenziato che la concentrazione di inositolo è significativamente maggiore nel sangue venoso ed arterioso ombelicale, rispetto a quello materno, e a sua volta i suoi livelli sono maggiori nell'arteria rispetto alla vena ombelicale, con una differenza veno-arteriosa ombelicale significativamente negativa. Questi dati suggeriscono dunque una produzione attiva di inositolo da parte del feto.⁶

L'inositolo svolge principalmente un'attività di controllo sul volume e l'osmolarità cellulare e regola il potenziale e la permeabilità di membrana durante lo sviluppo embrionale, permettendo quindi alle cellule di interagire correttamente tra di loro. La sua presenza è necessaria per il corretto sviluppo del sistema nervoso centrale, alcuni studi hanno dimostrato infatti, una netta riduzione di questo carboidrato in feti affetti da spina bifida¹⁴ e una relazione positiva nell'animale da esperimento, tra alterazioni del tubo neurale e ridotti livelli di acido arachidonico e prostaglandine, entrambi costituiti dall'inositolo. Un altro studio interessante di *Koch e coll.* ha mostrato in feti affetti da idrocefalia, valori di inositolo molto inferiori rispetto al normale.¹⁵ Esiste inoltre una correlazione tra bassi livelli di inositolo e aumento delle malformazioni fetali in nati da madri diabetiche; il glucosio inibisce infatti competitivamente il trasporto di inositolo all'interno delle cellule.¹⁶ Infine l'inositolo partecipa alla maturazione polmonare influenzando la composizione del surfattante; questo spiega in parte come mai i feti nati prima del termine o nati da madri diabetiche hanno maggior rischio di sviluppare la sindrome da distress respiratorio.¹⁷⁻¹⁹ Una revisione della *Cochrane del 2003* riporta una riduzione significativa di complicanze a breve termine in neonati pretermine sottoposti a supplementazione di inositolo per via parenterale; tra le complicanze vengono riportate la sindrome da distress respiratorio, la retinopatia del prematuro, l'emorragia intraventricolare di III° e IV° grado e il decesso.²⁰

Il **sorbitolo** è un carboidrato derivato dal glucosio nella via dei polialcoli mediante l'enzima aldoso reductasi, presente in molti organi quali il cristallino, i nervi

periferici, i capillari renali e retinici, la placenta e il cordone ombelicale. La sua attività è stimolata dall'aumento della glicemia, come avviene ad esempio durante la gravidanza.

E' stato dimostrato che la concentrazione di sorbitolo è maggiore nel feto rispetto alla madre, con una differenza veno-arteriosa ombelicale positiva e si correla in modo significativo con la concentrazione ombelicale venosa, suggerendone una produzione placentare, così come dimostrato anche negli ovini.^{5,6}

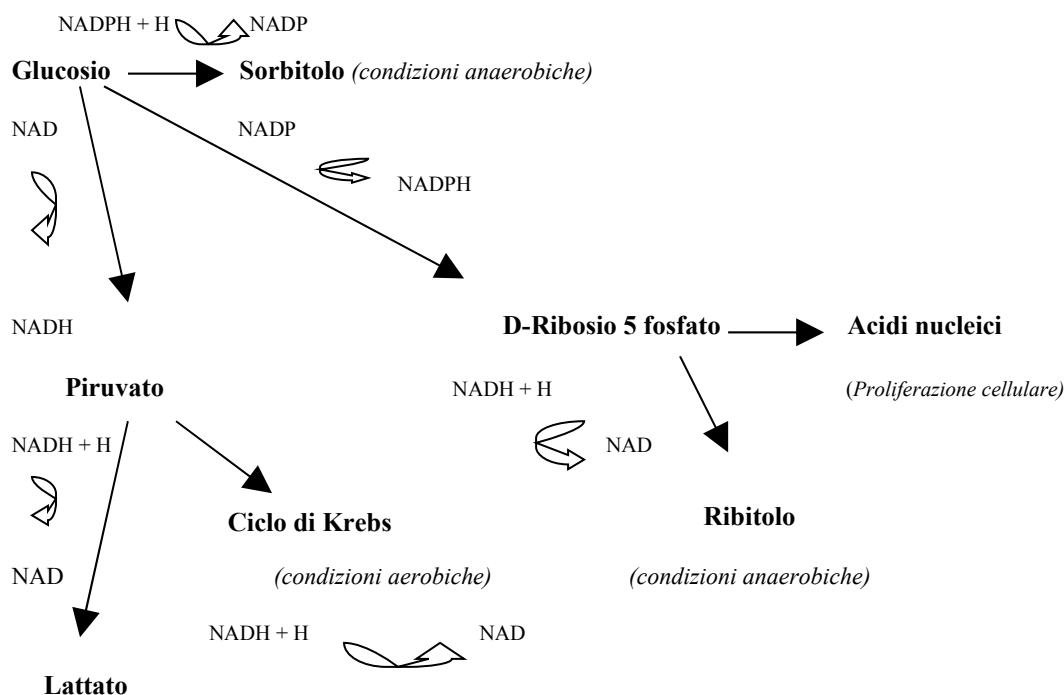
La via metabolica del sorbitolo sembra essere coinvolta nel diabete e nella comparsa di cataratta; nei pazienti con cataratta congenita è stata infatti dimostrata l'assenza dell'attività della sorbitolo deidrogenasi nel cristallino, con conseguente accumulo di sorbitolo nel tessuto; in topi transgenici che iper-esprimono il gene dell'aldoso reduttasi, si è evidenziata inoltre una maggior suscettibilità allo sviluppo di cataratta diabetica.^{21,22} Una spiegazione a ciò può essere data dal fatto che un accumulo di sorbitolo danneggia i tessuti, causandone un rigonfiamento per l'aumento della pressione oncotica extracellulare.

Un'altra funzione del sorbitolo è quella di regolare il bilancio tra ossidazione e riduzione dei nucleotidi, essendo essenziale per la rigenerazione dal NADPH di NADP⁺ utile per la formazione dell'ATP. Questa funzione è molto importante in condizione di bassa ossigenazione, come nei tessuti feto-placentari, quando le possibilità di ossidazione attraverso la catena respiratoria sono limitate, e può rappresentare un'alternativa alla produzione di lattato dal piruvato, evitando così un'eccessivo stato di acidosi metabolica.⁹

L'evidenza di alte concentrazioni di *eritritolo* e *ribitolo* nei fluidi embrionali,

indica inoltre un alto livello di attività della catena metabolica che porta alla formazione dei pentoso fosfati necessari per la sintesi degli acidi nucleici nei tessuti a rapida attività proliferativa (**Figura 2**). In aggiunta durante il primo step della catena metabolica l'enzima glucosio-6-fosfato deidrogenasi genera NADPH dal NADP^+ , essenziale per la produzione di glutathione ridotto, il cofattore dell'enzima antiossidante glutathione perossidasi (**Figura 2**). L'importanza di questa catena metabolica per la protezione dell'embrione dalla teratogenesi mediata dai radicali liberi, è confermata dal fatto che una riduzione dell'attività della glucosio-6-fosfato deidrogenasi determina un aumento dell'incidenza di malformazioni congenite.²³

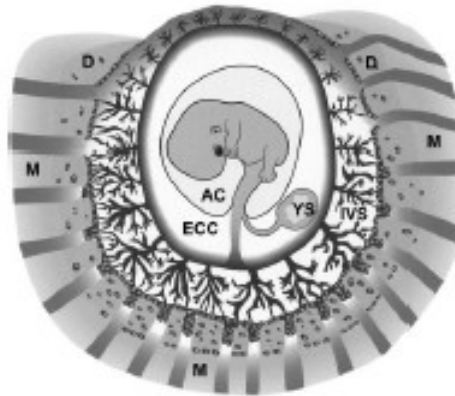
Figura 2. Possibile implicazione della catena metabolica degli alcool-zuccheri nella rigenerazione del NADPH e del NADP in condizioni anaerobiche



Da J Clin Endocrinol Metab 2005 modificato

Da ultimo gli alcool-zuccheri presenti a livello dei tessuti embrionali sembrano presentare un ruolo importante nella regolazione dell'omeostasi dei fluidi, aiutando a mantenere il volume cellulare senza alterare la struttura delle proteine e la funzione degli enzimi, come avviene nel caso degli ioni inorganici. Allo stesso modo la loro presenza nel liquido amniotico e nel liquido della cavità celomatica, può favorire la espansione delle rispettive cavità, portando acqua e nutrienti attraverso la placenta, prima che venga stabilita un'effettiva circolazione fetale.⁹

La **Figura 3** illustra i compartimenti fetali in un sacco gestazionale all'8-9° settimana di gravidanza.



Legenda Fig.3

AC: sacco amniotico, ECC: cavità esocelomica, IVS: spazio intervilloso, D: decidua, M: miometrio, YS: sacco di yolk. Da notare che parti di trofoblasto bloccano la penetrazione delle arterie spirali attraverso la placenta in questa fase dello sviluppo prevenendo l'entrata di sangue materno.
Da **J Clin Endocrinol Metab 2005**

1.5 OBIETTIVI

Sulla base degli studi condotti recentemente, in particolare sul metabolismo materno-fetale degli alcool-zuccheri e degli zuccheri diversi dal glucosio, è emersa la notevole importanza del loro ruolo fisio-patologico nei tessuti in via di sviluppo; un dato significativo è infatti il riscontro di concentrazioni fetali degli alcool-zuccheri maggiori rispetto a quelle materne, come è emerso dagli studi condotti in gravidanze sia umane che ovine.^{5,6,9}

Un'alterazione del loro metabolismo sarebbe inoltre implicata nell'eziopatogenesi di alcune patologie, tra cui malformazioni congenite, patologie del prematuro, ritardo di crescita intrauterino, alterazioni metaboliche.^{14,15,17,20-23}

La loro funzione deve essere tuttavia ancora ampiamente chiarita.

Lo scopo di questa dissertazione è stato quello di illustrare i risultati emersi da 2 studi multicentrici, che hanno coinvolto anche la nostra Unità, riguardanti l'analisi comparata della concentrazione degli alcool-zuccheri e di carboidrati diversi dal glucosio nel latte umano e di formula e sull'analisi del loro andamento plasmatico post-prandiale nel neonato a termine sano.

In particolare l'obiettivo del *1° studio (Studio A)* è stato quello di meglio comprendere il loro valore nutrizionale analizzando il contenuto del latte materno, il nutriente ottimale nell'alimentazione del neonato a termine, e confrontandolo quantitativamente e qualitativamente con le formule attualmente in commercio per nati a termine e pretermine.²⁴

Numerosi studi sono stati condotti finora sull'analisi dei componenti del latte materno e in particolare sul contenuto di aminoacidi e proteine, di acidi grassi e

lipidi, di lattosio e glucosio. Più recentemente sono stati studiati nucleotidi e oligosaccaridi, che sono stati aggiunti tra i componenti delle ultime formule di latte adattato.

Poco è invece presente in letteratura sugli alcool-zuccheri nel latte umano, nonostante il loro crescente interesse in biochimica e dietologia.

Il 2° *studio (Studio B)* è stato eseguito con l'obiettivo di stabilire i normali valori post-prandiali degli alcool-zuccheri e degli altri carboidrati diversi dal glucosio, utili come base per successivi studi su neonati con disturbi di crescita (gravi prematuri, IUGR, nati da madri con diabete gestazionale, diabete insulino e non-insulino-dipendente).

E' attualmente in fase di conclusione anche lo studio sui livelli basali degli alcool zuccheri nei neonati citati con disturbi di crescita, che mostrerebbe dai dati preliminari, una suddivisione "funzionale" con corrispondenza "metabolica" tra i diversi gruppi di disturbi di crescita (e ancor piu' finemente al loro stesso interno, ad esempio nel gruppo IUGR). Inoltre, sempre sulla scia dell'ulteriore acquisizione di nozioni sul metabolismo neonatale di tali composti, la nostra Unita' prosegue la collaborazione internazionale nell'ambito di un progetto di ricerca multicentrico tramite infusione di isotopi stabili di inositolo e mannosio e analisi del metabolismo nei medesimi gruppi di neonati con difetti di crescita.

Tutti gli studi fatti finora sull'andamento plasmatico post-prandiale della concentrazione dei carboidrati, si sono limitati infatti all'analisi del metabolismo del glucosio²⁵⁻²⁸ mentre poca rilevanza è stata data agli altri carboidrati e agli alcool-zuccheri contenuti nel latte materno.

MATERIALI E METODI

2.1 GLI ALCOOL-ZUCCHERI: METODO DI ESTRAZIONE NEL LATTE E NEL SIERO

Le concentrazioni degli zuccheri e alcool-zuccheri sono state analizzate grazie alla recente introduzione della cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC), caratterizzata da un'eluizione ad alte pressioni, che consente la separazione di miscele molto complesse in pochi minuti. Impiega gli stessi principi della cromatografia classica ma garantisce, oltre ai tempi ridotti, un'elevata risoluzione ed un'elevata sensibilità.

Una colonna cromatografia è costituita da un lungo tubo di vetro riempito con particelle di una resina sintetica a cui sono legati gruppi carichi, anionici o cationici. L'affinità di ogni componente analizzato per la resina viene influenzato dal pH, che determina lo stato di ionizzazione della molecola e dalla concentrazione di altri sali anionici che possono competere per l'associazione alla resina.

Ogni campione di latte materno (*Studio A*) e di siero (*Studio B*) è stato analizzato come segue: alla quantità di 0.1 ml sono stati aggiunti 0.1 ml di 0.3 N zinco solfato contenente 30 mg% di xilitolo e 0.1 ml di 0.3 N idrossido di bario. I componenti sono stati centrifugati a 14.000 g per 10 minuti e il supernatante ottenuto è stato filtrato attraverso un filtro di 0.45 µm prima di essere sottoposto ad analisi HPLC (high performance liquid chromatography). Il lattosio essendo presente in concentrazioni elevate rispetto agli altri zuccheri è stato a sua volta diluito prima dell'HPLC.

Un analizzatore Dionex HPLC provvisto di una colonna a scambio anionico CarboPac MA1 è stato utilizzato per la separazione di esosi, zuccheri alcolici e lattosio. L'analisi è stata eseguita con 500 mmol/l di idrossido di sodio per 25 minuti, seguita da un 2° step con 400 mmol/l di idrossido di sodio per altri 20 minuti a temperatura ambiente ad una velocità di 0.4 ml/h.

Una percentuale a parte di supernatante è stata analizzata con una colonna a scambio anionico CarboPac PA 10 per la valutazione della concentrazione di galattosamine e glucosammine con l'aggiunta di 18 mmol/l di idrossido di sodio a temperatura ambiente ad una velocità di 0.6 ml/h attraverso un'eluizione isocratica.

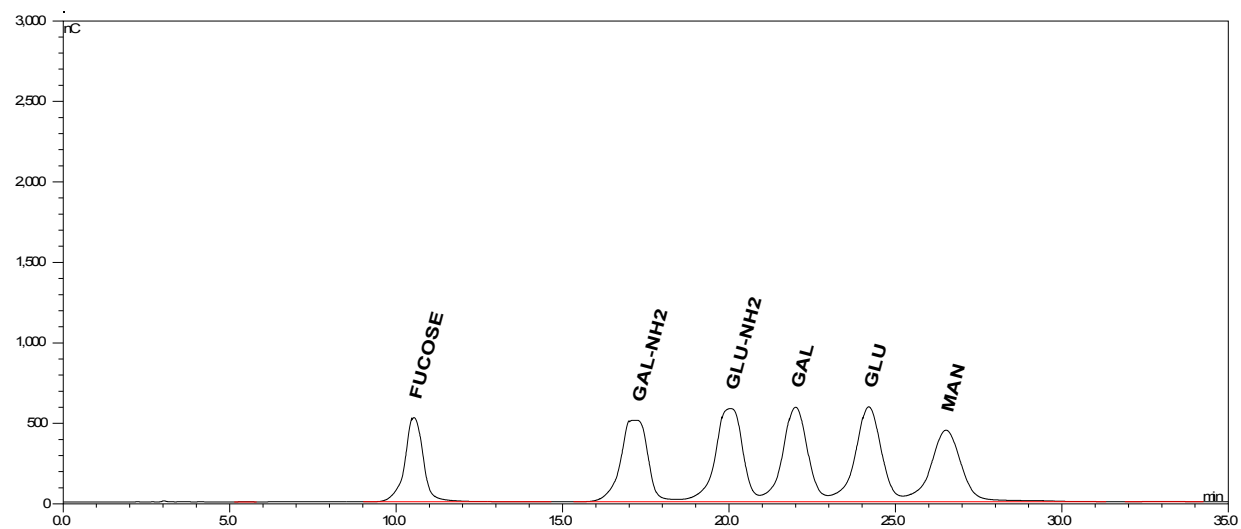
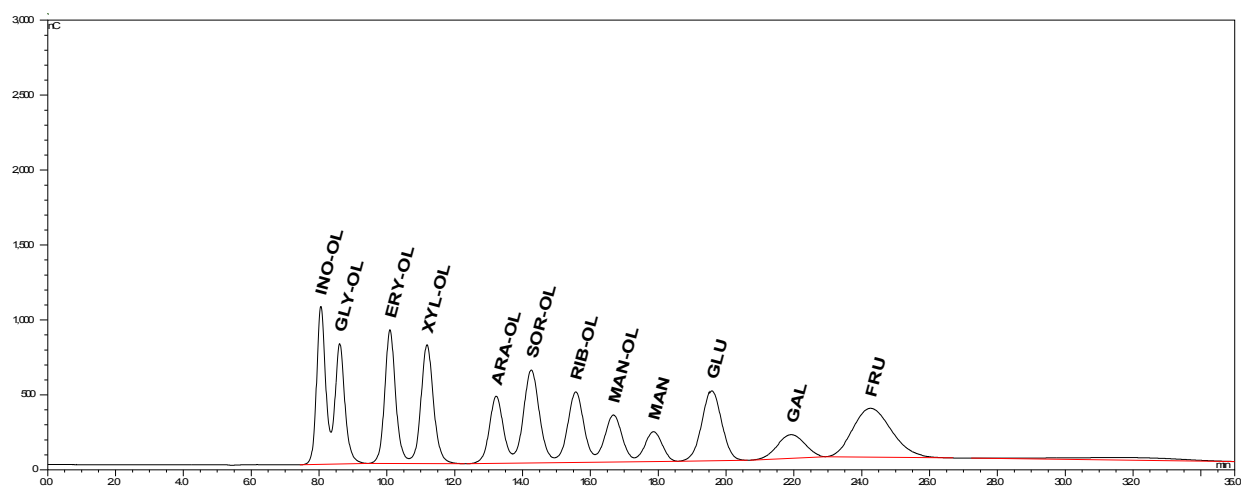
Ogni picco è stato quantificato mediante un detector elettrochimico Dionex ED40.

Per l'elaborazione dei dati è stato utilizzato un software Dionex peak net.

Tutte le concentrazioni sono espresse come μM .

La **Figura 4** rappresenta l'analisi cromatografia eseguita sui campioni di latte mediante colonna a scambio anionico CarboPac MA1 (grafico superiore) e CarboPac PA10 (grafico inferiore).

Figura 4



Da J Pediatr Gastroenterol Nutr 2006 modificato

2.2 PROTOCOLLO DI STUDIO

Entrambi gli studi sono stati approvati dai Comitati Etici dell'Università di Parma (Italia) e dell'Università del Colorado, a Denver (USA) ed eseguiti previo consenso informato rilasciato dai genitori

2.2.1 STUDIO A: ANALISI COMPARATA DELLA CONCENTRAZIONE DEGLI ALCOOL-ZUCCHERI NEL LATTE UMANO E DI FORMULA

Per questo studio sono stati raccolti 16 campioni di latte di madri che hanno presentato una gravidanza regolare e parto a termine e 17 campioni di latte di madri sottoposte a parto pretermine.

I campioni sono stati raccolti durante un intervallo di tempo compreso tra i 3 e i 29 giorni dopo il parto e per età gestazionali comprese tra la 29° e la 41° settimana.

Tutti i campioni sono stati immediatamente congelati a -70° C fino all'analisi di laboratorio.

Sono stati inoltre analizzati a scopo comparativo, 4 campioni di latte di formula per neonati a termine, 8 per neonati pretermine e 1 campione di latte vaccino all'1% disponibile in commercio.

2.2.2 STUDIO B: IL METABOLISMO DEI CARBOIDRATI E DEGLI ALCOOL-ZUCCHERI NEL NEONATO A TERMINE

Sono stati arruolati in totale 25 neonati a termine (> 36 settimane di età gestazionale), allattati con latte materno e/o latte di formula di tipo 1 ($n=7$ presso il centro di Denver, $n=18$ presso il centro di Parma).

Per ogni neonato sono stati raccolti i seguenti dati: età gestazionale, età post-natale al momento dello studio, peso alla nascita e al momento dello studio, volume di latte assunto pro chilo di peso e durata del pasto.

Per i nati allattati esclusivamente al seno, la quantità di latte assunta è stata calcolata sulla base della differenza di peso prima e dopo il pasto.

Per assicurare un adeguato assorbimento di nutrienti attraverso il piccolo intestino, sono stati inclusi nello studio solo i neonati in grado di assumere almeno 10 ml/Kg di latte per una durata di tempo di circa 20-30 minuti.

Per ogni paziente sono stati prelevati campioni di sangue mediante puntura capillare o posizionamento di catetere venoso periferico.

I tempi di raccolta sono risultati lievemente diversi tra i 2 centri: al tempo 0 (prima del pasto, =baseline) e a 30, 60 minuti dopo il pasto di latte, presso il centro di Parma (40-110 minuti post-baseline), al tempo 0 e a 30, 60, 90 minuti dall'inizio del pasto presso il centro di Denver (115 minuti post-baseline).

Tutti i campioni sono stati immediatamente centrifugati a 3000 RPM per 10 minuti e i sieri ottenuti sono stati congelati a -80°C fino all'analisi eseguita presso i laboratori dello Health Sciences Center di Denver.

2.3 ANALISI STATISTICA

2.3.1 STUDIO A

Le differenze tra le concentrazioni degli zuccheri e degli alcool-zuccheri nel latte materno e nei latti di formula sono state valutate mediante *t*-test e, dove appropriato, dopo aver testato per la normalità o dopo Mann-Whitney test.

2.3.2 STUDIO B

Tutte le analisi sono state fatte mediante test di ipotesi a 2 vie accettando come livello di significatività $p=0.05$. Per la presenza di campioni di piccole dimensioni, sono stati utilizzati test non parametrici per confrontare le caratteristiche di base tra i centri. Un test di Fisher è stato usato per analizzare il tipo di latte tra i centri. Il rapporto tra l'incremento della concentrazione di galattosio e di glucosio dal tempo 0 al secondo prelievo post-prandiale, è stata valutata mediante Wilcoxon test per la presenza di una distribuzione non normale. Le concentrazioni longitudinali dei carboidrati e degli alcool-zuccheri sono state valutate mediante procedura MIXED in SAS. Un'intercetta casuale è stata inclusa in tutti i modelli ed una curva casuale è stata considerata sulla base di un likelihood ratio test. Questo test è stato usato per determinare la covarianza del sistema. Una trasformazione logaritmica è stata usata per normalizzare la concentrazione di galattosio.

CAPITOLO 3

RISULTATI

3.1 STUDIO A

Dai nostri risultati emerge la presenza di 2 distinti patterns HPLC (**Figura 5**): quello più comune, che si ritrova in 14 campioni di latte materno è mostrato nel cromatogramma inferiore, mentre il 2° è rappresentato dal cromatogramma superiore. In questi campioni si sono riscontrati dei componenti non ben identificati (marcati con l'asterisco) con tempi di eluizione simili a quelli di eritritolo, arabitolo, sorbitolo, mannitolo e mannosio, rendendo impossibile determinare le loro concentrazioni. Questi componenti non sono presenti nel cromatogramma inferiore. Solo i dati degli altri carboidrati sono stati inclusi nel calcolo dei normali valori del latte materno, per quanto riguarda questi campioni. Le concentrazioni di tutti gli altri zuccheri e alcool-zuccheri non differiscono nei 2 cromatogrammi.

Le **Figure 6 e 7** illustrano le differenze tra le concentrazioni medie degli zuccheri e degli alcool- zuccheri presenti nel latte materno, nei latti formulati per neonati a termine e pretermine (i latti di formula per pretermine sono stati suddivisi in 2 gruppi in base alla presenza o meno di mioinositolo) e nel latte di mucca.

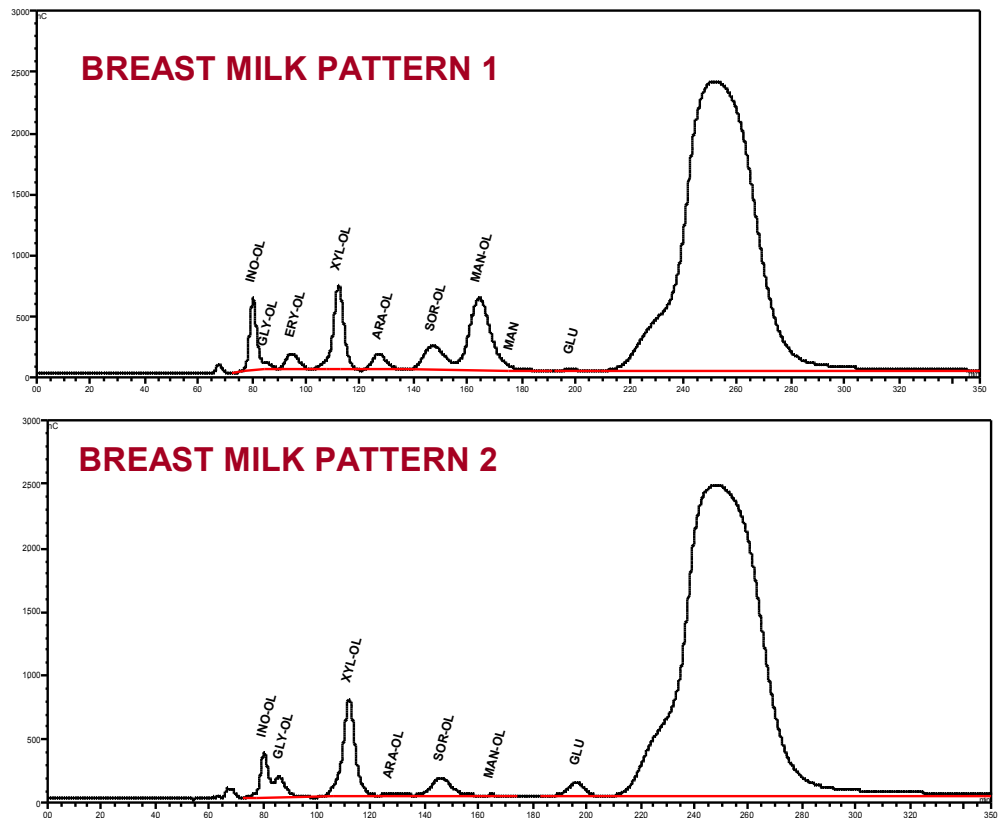
Come si può notare in **Figura 6**, dove sono rappresentati i componenti maggiormente rappresentati, l'**inositolo** si trova in alte concentrazioni nel latte materno e ancor più nel latte formulato per pretermine, le concentrazioni di **glicerolo** sono invece maggiori nel latte materno rispetto agli altri tipi di latte, mentre è evidente che le concentrazioni di **arabitolo, glucosio e galattosio** sono più elevate nei latti formulati. Per quanto riguarda il **lattosio**, si trova maggiormente nel latte formulato per nati a termine e in

concentrazioni lievemente aumentate nel latte di mucca rispetto al latte materno.

La **Figura 7** mostra invece i componenti dei latti presenti in concentrazioni più basse rispetto ai precedenti. Tra questi ***eritritolo*** e ***ribitolo***, sono stati riscontrati in alte concentrazioni nei latti formulati ma non nel latte umano, a differenza di ***mannitolo***, ***mannosio*** e ***galattosammine*** che si ritrovano nel latte materno, seppur in concentrazioni minori rispetto ai latti di formula

Figura 5

CHROMATOGRAMS OF TWO BREAST MILK SAMPLES



Da J Pediatr Gastroenterol Nutr 2006

Figura 6

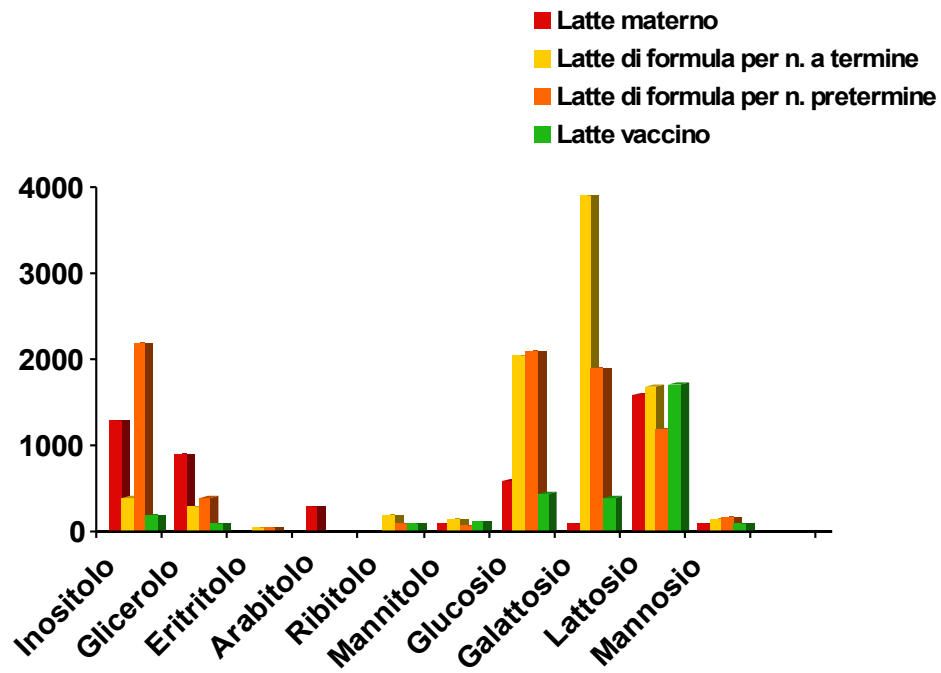
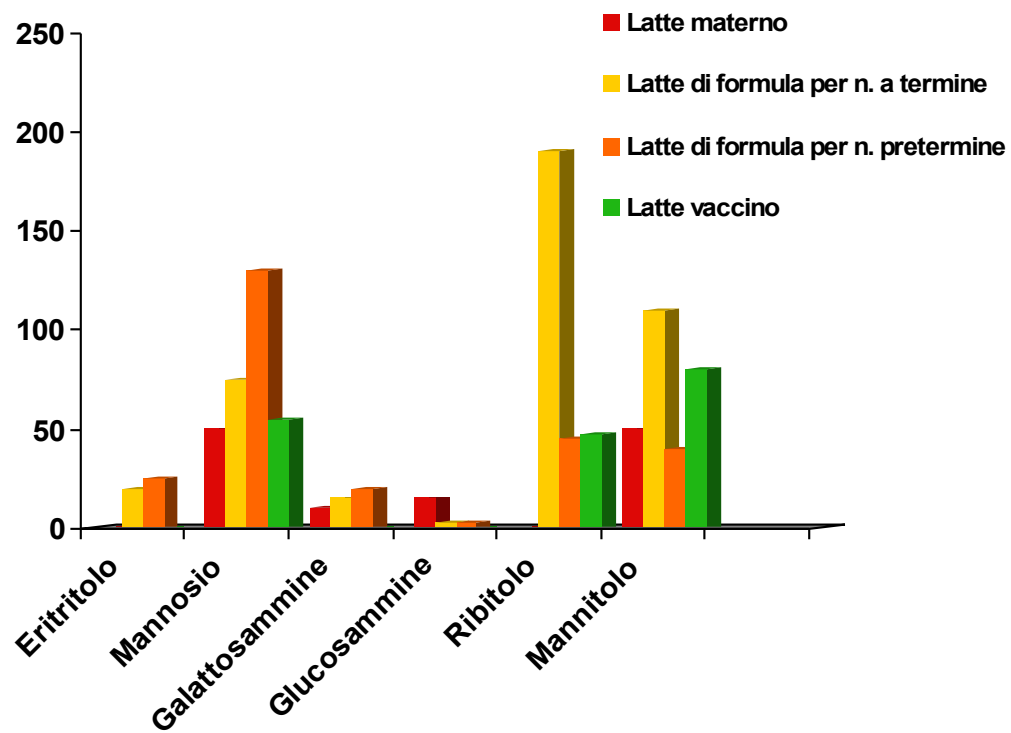


Figura 7



Da J Pediatr Gastroenterol Nutr 2006 modificato

Abbiamo inoltre valutato la presenza di eventuali differenze tra campioni di latte prelevati da madre con parto pretermine < 36 settimane o > 36 settimane di età gestazionale. Non sono state riscontrate differenze per nessuno degli zuccheri semplici nè alcool- zuccheri, eccetto per il ***lattosio***, cui concentrazione nelle gravidanze a termine è 161.6 ± 4.7 mmol/l e in quelle pretermine 149.2 ± 3.0 mmol/l con $P < 0.04$.

Nella **Tabella 5** sono riportate le concentrazioni medie degli zuccheri e alcool-zuccheri per ogni gruppo e sul totale dei casi, fatta eccezione per il lattosio.

Tabella 5

	Inosit.	Glicer.	Eritrit.	Arabit.	Ribit.	Mannit.	Mann.	Gluc.	Galatt.	Latt.
> 36										
<i>EG</i>										
Media	9914341	7380294	0	1901814	0	2338582	3820201	8655545	1426267	161,5923
n=16										
DS	4575748	5864307	0	1427792	0	2621891	3308631	3960786	1996708	18,78364
SEM	1143937	1466077	0	4759307	0	839638	1102877	1058565	5336426	4,695911
< 36										
<i>EG</i>										
Media	1342968	9018365	0	3817764	0	11279	5070818	7349702	1171033	149,2098
n=16										
DS	580157	5997631	0	1905468	0	1447546	3612369	3975786	690847	12,24595
SEM	1407087	1454639	0	1100123	0	7237729	871281	9939464	167555	2,970078
Media	1172527	8224149	0	2380802	0	1966064	4205006	7959095	12863	
<i>totale</i>										
n=33										
DS	546137	5898923	0	1701064	0	2333447	3304733	3955691	1413806	
SEM	9507025	1026871	0	2961172	0	4062009	5752802	6885974	246112	

3.2 STUDIO B

RISULTATI

Con il presente studio abbiamo esaminato l'andamento delle concentrazioni post-prandiali di alcuni carboidrati, tra cui glucosio e galattosio e degli alcool-zuccheri e valutato l'influenza di alcune variabili, tra cui l'età post-natale, il tipo di latte assunto, il volume e la durata del pasto, sull'andamento di tali concentrazioni nelle prime settimane di vita.

Tutte le informazioni cliniche relative ai pazienti arruolati, espresse come medie per ogni gruppo (gruppo di Denver e gruppo di Parma) sono riportate nella **Tabella 6**.

La media dell'età neonatale al momento dello studio è di 5 giorni (range 2-16 giorni) mentre quella dell'età gestazionale corrispondente a 38 settimane (range 36-42 settimane). La quantità media di latte assunta (latte materno o di formula di tipo 1 o entrambe) è di 16.3 ml/Kg (range 7-34 ml/Kg) e la durata media per ogni pasto è di 20 minuti (range 10-34 minuti). Non si evidenziano differenze significative tra i 2 centri riguardo alle caratteristiche cliniche di ogni paziente, fatta eccezione per una durata media del pasto > nel gruppo di Denver, in funzione di un'età post-natale significativamente < ($p=0.0001$).

Tabella 6

	Denver (n=7)	Parma (n=16)*	P valore[†]
Età gestazionale (settimane)	39 (37, 41.5)	38 (36, 41)**	0.2
Peso alla nascita (kg)	3.3 (2.6, 3.5)	3.2 (2.5, 4.5)**	0.72
Peso al tempo 0 (kg)	3.2 (2.4, 3.5)	3.2 (2.5, 4.3)	0.32
Intake (ml/kg)	16.2 (10.9, 26.3)	17.8 (6.9, 34.2)	0.49
Durata del pasto (min)	29 (20, 34)	19 (10, 50)	0.02
Età post-natale (giorni)	2 (2, 2)	7 (2, 16)	<0.000 1
Tipo di latte			0.61 [‡]
Latte materno	1 (14%)	5 (31%)	
Latte di formula	3 (43%)	3 (19%)	
Latte materno+ formula	3 (43%)	8 (50%)	

I risultati sono espressi come media (range) eccetto per il tipo di latte che è espresso come n (%)

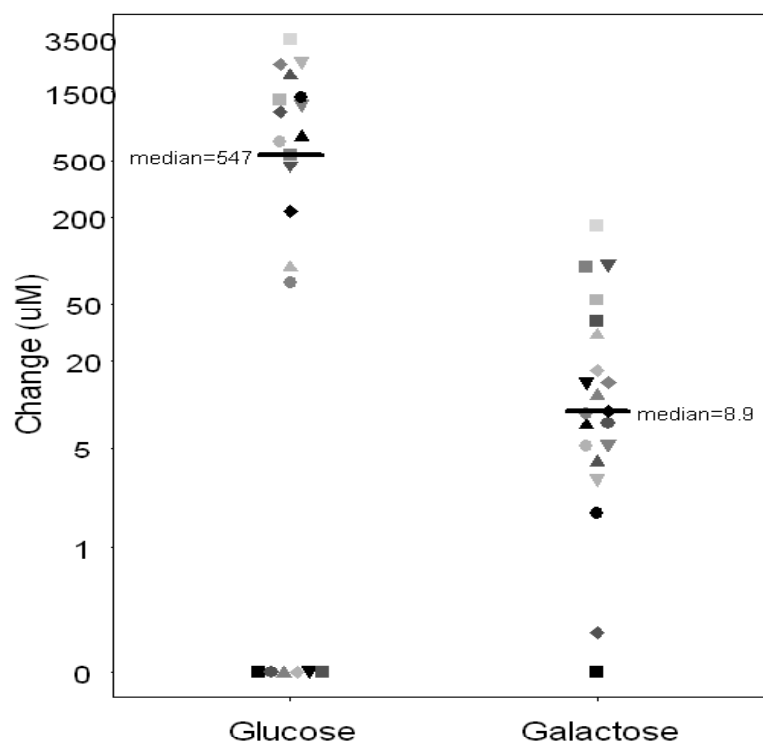
- totale n=18, dati clinici disponibili in 16 pazienti
- ** n=17

† Wilcoxon rank-sum ‡ Fisher's exact

La **Figura 8** mostra l'andamento delle concentrazioni sieriche di *glucosio* [Glu] e *galattosio* [Gal] per ogni paziente, al tempo 0 (prima del pasto) e al tempo 2 (2° prelievo post-prandiale o 60-110 min dopo l'inizio del pasto): come si può notare, anche se i 2 carboidrati sono rilasciati in quantità equimolari, in seguito alla scissione del

lattosio contenuto nel latte, il rapporto tra l'aumento medio della [Glu] e quello della [Gal] dal tempo 0 al tempo 2, è di 457 μM , (range – 38, 3333 μM ; $p < 0.001$). Questo indica un aumento della [Glu] che è 60 volte più grande rispetto alla [Gal].

Figura 8



LEGENDA Figura 8

Andamento delle concentrazioni plasmatiche di [Glu] e [Gal] dal tempo 0 al 2° prelievo post-prandiale.

Le immagini corrispondenti allo stesso simbolo con la stessa tonalità di grigio sono da riferirsi allo stesso soggetto.

Tra i 6 pazienti che non presentano modificazioni delle concentrazioni di glucosio, 3 mostrano un picco di [Glu] al 1° prelievo post-prandiale e 3 non presentano alcun aumento. Per uno dei 3 neonati senza alcun picco di [Glu], non sono disponibili dati relativi alla durata e alla quantità del pasto. I restanti 2 pazienti non dimostrano differenze significative nella durata media né nella quantità del pasto rispetto ai 21 pazienti con picco di [Glu] ($p=0.60$ and 0.79 , rispettivamente).

L'analisi statistica dimostra inoltre un significativo effetto dell'età: per ogni giorno di

età post-natale si osserva una riduzione del 18% della [Gal] ($p = 0.03$).

Per analizzare più precisamente l'effetto dell'età, i pazienti sono stati suddivisi in 2 gruppi: gruppo 1 (età post-natale = 2 giorni) e gruppo 2 (età post-natale > 2 giorni)

Tabella 7.

La [Gal] nel gruppo 1, risulta significativamente più alta ad ogni prelievo. La [Glu] nel gruppo 1, è invece significativamente > al tempo 0 e dopo 30 minuti, ma in misura < rispetto alla [Gal].

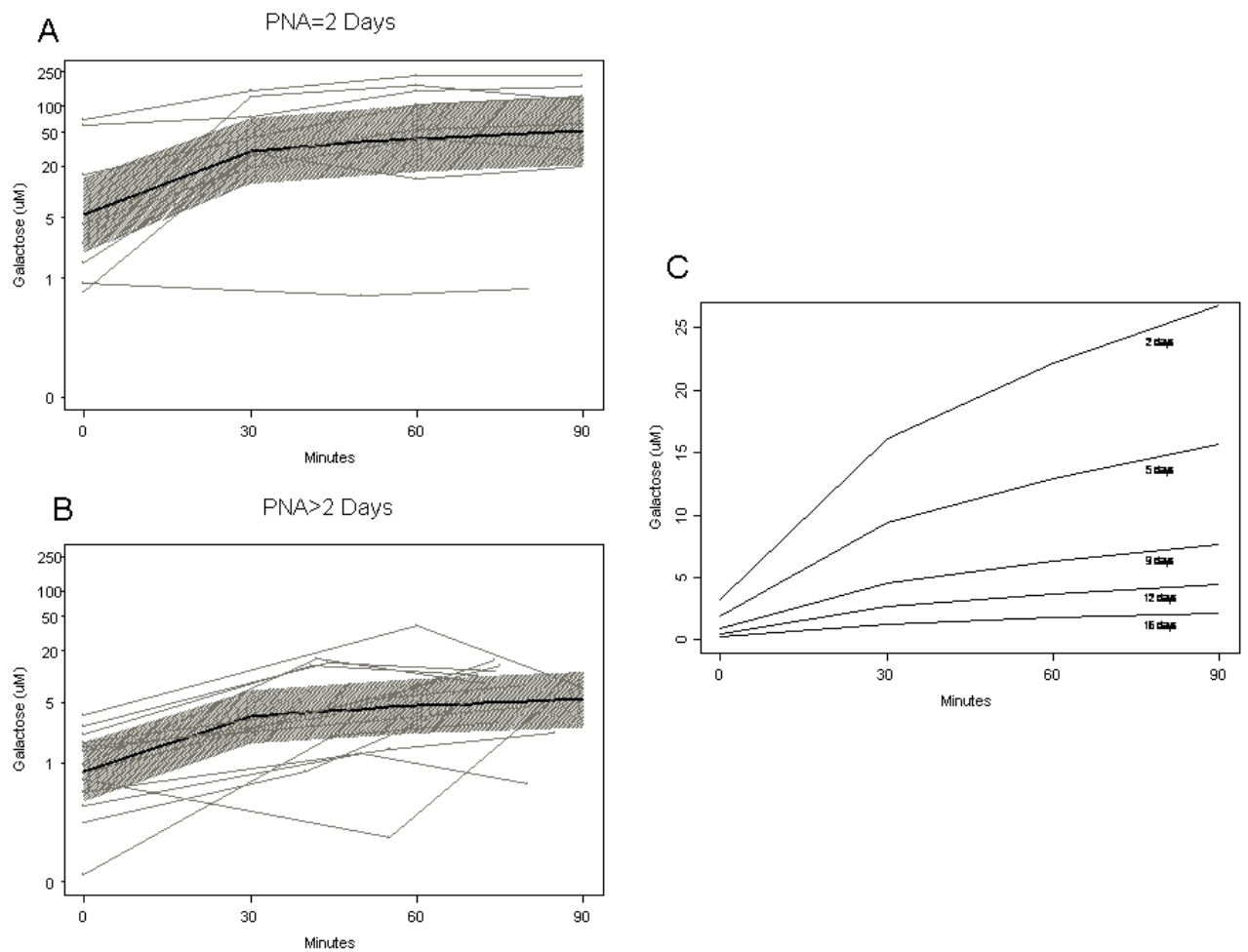
Tabella 7

Gruppo	t=0	t=30 min	t=60 min	t=90 min
Galattosio(uM)			42.38 (17.55,	
= 2 giorni	5.41 (2.01, 14.55)	30.2 (12.71, 71.77)	102.33)	51.77 (21.11, 126.98)
Galattosio(uM)				
> 2 giorni	0.79 (0.36, 1.72)	3.41 (1.70, 6.84)	4.55 (2.23, 9.30)	5.4 (2.60, 11.20)
<i>P</i>	0.003	<0.001	<0.001	<0.001
Glucosio (uM)	4604 (3864,		5027 (4441,	
= 2 giorni	5345)	4958 (4400, 5515)	5613)	5068 (4456, 5681)
Glucosio (uM)	3329 (2770,		4404 (3950,	
> 2 giorni	3888)	4227 (3800, 4655)	4858)	4508 (4032, 4986)
<i>P</i>	0.008	0.04	0.1	0.15

I risultati sono espressi come media stimata con un intervallo di confidenza del 95%

Il valore di *P* compara i nati con età =2 e >2 ad ogni time point

Il grafico in **Figura 9** evidenzia la [Gal] media in entrambe i gruppi con un intervallo di confidenza del 95% e l'effetto dell'età post-natale sulle [Gal].



LEGENDA Figura 9

Media stimata di [Gal] (in grassetto) con intervallo di confidenza del 95% (area grigia) e andamento postprandiale di [Gal] relativo ad ogni paziente (linee grigie) in **A**: nati con età = 2 giorni; in **B**: nati > 2 giorni; in **C**: media stimata di [Gal] in un tempo di età post-natale di 2, 5, 9, 12, e 16 giorni

Sono state misurate inoltre le concentrazioni degli alcool-zuccheri e degli altri

carboidrati per ogni prelievo. Le concentrazioni al tempo 0 sono state le seguenti: **glicerolo** (media $168.3 \pm \text{DS } 88.8 \text{ } \mu\text{M}$); **inositolo** (media $156.6 \pm \text{DS } 63.7 \text{ } \mu\text{M}$); **mannosio** (media $47.7 \pm \text{DS } 22.3 \text{ } \mu\text{M}$); **mannitolo** (media $9.2 \pm \text{DS } 4.5 \text{ } \mu\text{M}$); **eritritolo** (media $10.6 \pm \text{DS } 7.9 \text{ } \mu\text{M}$); **sorbitolo**, **ribitolo**, **fucosio**, **glucosammine**, **galattosammine** sono stati rilevati invece in concentrazioni al di sotto dei limiti di accuratezza dell'analizzatore HPLC ($< 5 \text{ } \mu\text{M}$). Nessuno di questi alcool-zuccheri ha mostrato un aumento delle concentrazioni plasmatiche post-prandiali né le variabili cliniche quali il volume e il tipo di latte, la durata del pasto e l'età hanno influenzato le loro concentrazioni.

La **Tabella 8** illustra le differenze tra i principali zuccheri e alcool-zuccheri relative

all'analisi quantitativa nel latte materno e di formula e al metabolismo materno-fetale e del neonato a termine sano

	Metabolismo materno- fetale	Latte materno (concentrazione)	Latti adattati (concentrazione)	Metabolismo neonato a termine sano
Inositolo	Produzione	Alta	Alta (nelle formule	Nessun picco post-
Sorbitolo	fetale Produzione placentare	Bassa	per pretermine) -	prandiale Basse concentrazioni ematiche Nessun picco post-prandiale.
Mannosio	Importante uptake materno-fetale	Alta	Alta (maggiore rispetto al latte materno)	Nessun picco post- prandiale
Galattosio	-	Bassa	Alta	Picco post-prandiale in base all'età

CAPITOLO 4

CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

4.1 STUDIO A

Scopo di questo lavoro è stato lo studio delle concentrazioni degli zuccheri e degli alcool-zuccheri che giocano un ruolo speciale nell'ambito della nutrizione neonatale.

Come presupposto abbiamo considerato che il ***lattosio*** è il principale zucchero presente nel latte umano e viene idrolizzato a livello intestinale in glucosio e galattosio in quantità equimolari. La presenza di ***glucosio*** e ***galattosio*** nel latte di formula e in basse concentrazioni nel latte materno, rispetto a quelle del lattosio, è dovuta probabilmente all'idrolisi del lattosio durante la formulazione. Per tale motivo si suppone che essi abbiano una scarsa rilevanza clinica.

Mentre il metabolismo del ***glucosio*** è stato studiato approfonditamente, data la frequenza di ipoglicemia neonatale ed un recente interesse è stato rivolto allo studio del metabolismo del ***galattosio***, poca attenzione è stata indirizzata invece all'analisi degli altri carboidrati.

Sulla base degli ultimi studi eseguiti da *Teng e coll.*⁵ e *Brusati e coll.*⁶ si è osservato un significativo uptake ombelicale di ***mannosio*** nella circolazione di feti a termine, nonostante le sue ridotte concentrazioni materne rispetto a quelle del glucosio (rispettivamente 66.4 ± 2.3 $\mu\text{mol/l}$ e 4.5 ± 0.1 mmol/l)⁶. Studi eseguiti su tessuti umani hanno infatti descritto un'alta affinità dei trasportatori di mannosio;⁷ inoltre è stato dimostrato che le cellule richiedono un'apporto esterno di mannosio per la produzione di mannosio glicani, nonostante la possibilità teorica che il mannosio possa essere

sintetizzato dal glucosio⁸.

Il presente studio dimostra che il latte umano contiene una significativa concentrazione di mannosio libero, così come i latti formulati. È possibile dunque che questo rappresenti la principale sorgente di mannosio per il bambino che in larga parte viene metabolizzata in mannosio glicani dalla flora batterica.

Tra gli alcool-zuccheri il ***mioinositolo*** ha riscosso grande attenzione grazie a studi che suggeriscono un ruolo dell'inositolo nello sviluppo del sistema nervoso centrale^{14,15} e nella maturazione polmonare.¹⁷⁻²⁰

L'inositolo sembra inoltre essere prodotto a livello fetale durante la gravidanza.^{5,6}

Il latte materno presenta elevate quantità di inositolo rispetto ai latti formulati per nati a termine, mentre alcune formule per pretermine lo contengono in egual o maggior quantità.

Come evidente in questo studio, anche altri alcool-zuccheri tra cui ***arabitololo***, ***sorbitolo***, ***ribitololo*** e ***mannitololo***, sono presenti nel latte materno così come nei latti di formula per nati a termine e pretermine, seppur in concentrazioni minori rispetto all'inositolo. Esiste dunque una certa disparità di concentrazioni tra gli alcool-zuccheri.

Non siamo in grado di spiegare al momento la presenza dei 2 diversi patterns HPLC riportati in **Figura 5**, per cui saranno necessari ulteriori studi.

4.2 STUDIO B

Questo studio è il primo a fornire dati relativi alle concentrazioni di diversi tipi di zuccheri e alcool-zuccheri nel neonato sano dopo assunzione di latte.

Dall'analisi dei nostri dati emerge un'importante differenza tra l'uptake epatico del *galattosio* e quello del *glucosio*.

Entrambe gli zuccheri sono idrolizzati nell'intestino a partire dal lattosio, il principale zucchero del latte umano e bovino.

Studi precedenti hanno mostrato che dopo l'assorbimento intestinale, più del 90% del glucosio e del galattosio raggiungono il fegato attraverso il circolo portale, in quantità equimolari.²⁹ La concentrazione ematica di galattosio misurata nel nostro studio al tempo 2 (2° campione sierico post-prandiale), aumenta solo dell'1-2% rispetto a quella del glucosio, confermando che il galattosio è principalmente metabolizzato nel neonato dal fegato, come emerso anche in lavori precedenti.^{29,30}

Sparks e coll. nel 1982 e *Siegel e coll.* nel 1988 sono stati i primi a descrivere la variazione della concentrazione post-prandiale di galattosio nei neonati a termine.^{31,32} In entrambi gli studi si osserva che la concentrazione di galattosio presenta un picco significativo dopo pasto di latte con un range compreso tra 45 e 235 μM . I risultati del nostro studio concordano con i precedenti: le concentrazioni di galattosio sono infatti comprese tra 55 e 230 μM .

Con questo studio siamo inoltre i primi a riportare un effetto dell'età sulle concentrazioni post-prandiali di galattosio, come dimostrato dalla presenza di

concentrazioni sieriche > nel gruppo di neonati con età < 2 giorni.

Sparks e coll. non riportano alcun effetto dell'età post-natale sulle concentrazioni di galattosio, sebbene siano stati studiati neonati di età compresa tra le 2 e le 5 settimane, mentre nel nostro caso i pazienti presentano tutti un'età post-natale ≤ 16 giorni.

La spiegazione più plausibile del nostro dato è la presenza del dotto venoso che riceve sangue direttamente dalla vena ombelicale e bypassando il circolo portale lo indirizza nel punto di confluenza tra la vena epatica e la vena cava inferiore.

Studi di ecografia neonatale con flussimetria doppler, documentano una persistenza del dotto venoso anche per diversi giorni nel neonato a termine e per periodi maggiori nel pretermine.³³⁻³⁵ *Loberant e coll.* evidenziano inoltre che la velocità di flusso attraverso il dotto è compresa tra 0.15 e 0.70 m/sec e decresce significativamente nelle prime 2 settimane di vita.³³ Anche nella pecora nei primi giorni di vita si osserva uno shunt del 25% del flusso ematico dalla circolazione portale a quella sistemica attraverso il dotto^{36,37} confermando la sua importanza emodinamica.

Il presente studio confronta neonati di età post-natali diverse nelle prime 2 settimane di vita e mostra che per ogni giorno di età post-natale, le concentrazioni di galattosio si riducono del 18%. Sulla base degli studi sopra menzionati che dimostrano un dotto venoso emodinamicamente significativo nei primi giorni di vita post-natale e che correlano la sua persistenza alle concentrazioni ematiche di galattosio, i nostri dati suggeriscono dunque che il dotto venoso va incontro a chiusura nell'arco del periodo di tempo studiato e che concentrazioni di galattosio relativamente alte possono riflettere una ridotta clearance epatica come conseguenza della presenza o rallentata chiusura del dotto.

Questo è un dato importante per molteplici ragioni: l'evidenza di un dotto

persistentemente aperto nei primi giorni di vita potrebbe influenzare la clearance epatica di farmaci e altre sostanze tra cui glutamina e ammonio come emerge dallo studio di *Murayama e coll.* che correla l'entità del flusso attraverso il dotto con le concentrazioni ematiche di galattosio, ammonio e acidi biliari.³⁸

Inoltre, come sopra riportato, una ritardata maturazione epatica associata ad un ritardo della chiusura del dotto potrebbe essere responsabile di un'ipergalattosemia transitoria, evidenziata allo screening di massa, infatti l'emivita dell'alfa-fetoproteina, sintetizzata dal fegato, è maggiore in pazienti con ritardata chiusura del dotto.^{39,40}

Da ultimo i nostri dati suggeriscono che un'elevata concentrazione di galattosio può essere considerata come indice effettivo di ridotto flusso a livello del fegato e/o danno parenchimale da shunt attraverso il dotto venoso, in condizioni patologiche come negli IUGR o nei gravi prematuri.

Diversi studi eseguiti su popolazioni adulte hanno utilizzato il parametro della capacità di eliminazione del galattosio^{41,42} e dosaggi singoli della galattosemia⁴³ per stabilire la funzionalità epatica in condizioni patologiche quali cirrosi ed epatiti.

Narkewicz e coll. studiando una popolazione di pazienti pediatrici a rischio di stasi epatica in seguito a procedura di Fontan, hanno a loro volta sottolineato che la capacità di eliminazione del galattosio può essere considerata come un marker sensibile di peggioramento della funzionalità epatica rispetto ad altri indici biochimici.⁴⁴

Tutti questi dati sono dunque di notevole interesse e utilità per futuri studi su neonati patologici, in cui la presenza di una riduzione del flusso ematico, come si osserva all'ecografia Doppler, potrebbe essere segno di un possibile danno parenchimale. Questo si verifica nel pretermine o nel nato IUGR come conseguenza non solo di una riduzione del flusso venoso ombelicale, in proporzione al peso fetale, ma anche di

un'aumentato shunt attraverso il dotto venoso.^{45,46}

Un dato rilevante è che anche nel neonato a termine sano può presentarsi una ritardata chiusura del dotto venoso^{33,35} che può influire sulla funzionalità epatica.^{38,39}

In questo studio abbiamo misurato inoltre le variazioni delle concentrazioni di molti altri carboidrati e alcool zuccheri dopo pasto di latte. Sebbene molti di questi alcool-zuccheri tra cui *inositolo, glicerolo, mannitolo, eritritolo*, siano presenti nel plasma di neonati a termine, non si sono evidenziati aumenti post-prandiali delle loro concentrazioni, probabilmente per la loro presenza nel latte in quantità limitata e in concentrazioni 100 volte inferiori rispetto al lattosio.²⁴

Anche la concentrazione degli oligosaccaridi nel latte umano è bassa rispetto al lattosio, e corrisponde rispettivamente all'1% e al 7% del latte umano (peso/volume).⁴⁷

Per quanto riguarda i carboidrati che compongono il core degli oligosaccaridi tra cui *fucosio e mannosio*, si è osservato allo stesso modo che non presentano aumento post-prandiale.

Sempre maggiori evidenze suggeriscono infatti che gli oligosaccaridi non sono idrolizzati ed assorbiti nel piccolo intestino, contribuendo al mantenimento dell'equilibrio della flora batterica intestinale non patogena ed inibendo il legame dei ceppi patogeni alle cellule epiteliali.^{48,49} Per tali motivi non ci si aspetta la presenza di un innalzamento post-prandiale di fucosio e mannosio.

CAPITOLO 5

DISCUSSIONE

Numerose attenzioni sono state rivolte recentemente allo studio di carboidrati diversi dal glucosio e in particolare degli alcool-zuccheri, stimulate dall'evidenza del loro ruolo svolto nell'ambito del benessere dell'individuo dalla vita fetale a quella adulta. È nota da tempo la loro importanza nutrizionale nell'adulto e soprattutto in soggetti affetti da patologie metaboliche come il diabete, per il loro basso indice glicemico ed insulinemico;¹ ancor più recentemente è stata evidenziata una loro implicazione nella patogenesi di alcune malformazioni congenite e di patologie neonatali come la spina bifida, la cataratta congenita e la sindrome da distress respiratorio.^{14,15,17,20-23} Sembra inoltre che un corretto funzionamento della catena metabolica degli alcool-zuccheri sia particolarmente importante nel mantenimento dell'omeostasi dei fluidi a livello embrionale e del balance ossidoriduttivo durante l'intera gravidanza.^{9,23} Alte concentrazioni di alcool-zuccheri sono state ritrovate infatti nei fluidi embrionali e nella circolazione feto-placentare di gravidanze ovine e umane, alcuni dei quali sembrano essere prodotti dal feto o dalla placenta,^{5,6} suggerendone l'importanza biologica.

Gli studi condotti presso i laboratori dello Health Science Center dell'Università di Denver (USA), stimolati da tali evidenze, sono i primi a fornire un'analisi biochimica completa degli alcool-zuccheri nel latte umano rispetto alle diverse formule di latti per nati a termine e pretermine e a descrivere il loro metabolismo nel neonato sano.

Tali ricerche hanno confermato l'importanza nutrizionale di questi componenti,

che sono stati ritrovati oltre che nella circolazione fetale, anche in quella neonatale e nel latte umano.²⁴

Le differenze quantitative e qualitative degli alcool-zuccheri nel latte materno rispetto ai latti di formula per nati a termine e pretermine, pongono il quesito sulla necessità di un ulteriore miglioramento dell'umanizzazione del latte, anche sulla base di una ipotetica differenza del metabolismo degli alcool-zuccheri tra neonati a termine, e nati patologici tra cui pretermine, nati con difetto di crescita intrauterino e figli di madre diabetiche.

Mentre le analisi sul metabolismo del neonato patologico sono al momento in corso, i risultati sullo studio del metabolismo del nato a termine sano, hanno messo in evidenza la presenza di questi componenti a livello della circolazione neonatale, in concentrazioni seppur inferiori rispetto al glucosio e ad altri zuccheri quali il galattosio. Non si è riscontrato tuttavia nessun picco post-prandiale degli alcool-zuccheri, il significato del quale deve essere tuttora chiarito.

Gli studi eseguiti hanno fornito inoltre dati interessanti relativi all'analisi biochimica e al metabolismo di zuccheri diversi dal glucosio, in particolare mannosio e galattosio.

L'importanza dell'apporto esogeno di mannosio di cui necessitano le cellule per la sintesi di mannosio glicani,⁸ confermata anche dagli studi sulle gravidanze ovine ed umane,^{5,6} è sottolineata dalla sua presenza in alte concentrazioni nel latte umano e di formula, nonostante la possibilità teorica che possa essere sintetizzato a partire dal glucosio.

Il ruolo nutrizionale del galattosio sembra essere invece di scarsa rilevanza clinica, mentre è emerso un dato molto interessante relativo alla sua presunta

funzione di marker di danno epato-cellulare, nel neonato con alterazioni del flusso epatico. Si è visto infatti che il galattosio presenta un metabolismo prevalentemente epatico nel neonato a termine sano; il riscontro di un'ipergalattosemia potrebbe pertanto essere la conseguenza di una persistenza del dotto venoso, come avviene nei primi giorni di vita nel neonato a termine,^{33,35} e per tempi maggiori nel neonato pretermine o con difetto di crescita intrauterino; in questi casi la circolazione portale è gravemente ridotta, anche in funzione del peso neonatale,^{45,46} determinando un aumentato rischio di danno epato-cellulare.

La dimostrazione di un dotto venoso persistente, potrebbe essere inoltre di notevole rilevanza clinica, per la conseguente riduzione della clearance epatica di alcuni farmaci e sostanze come l'ammonio e la glutamina,³⁸ e per la scarsa attendibilità dello screening di massa dovuta all'ipergalattosemia transitoria.^{39,40}

Il galattosio potrebbe diventare dunque un utile strumento per monitorare la funzionalità epatica fetale e neonatale, in condizioni patologiche quali l'estrema prematurità e il ritardo di crescita intrauterino.

Questi studi hanno dunque segnato un percorso verso la comprensione in ambito fetale e neonatale dell'importanza del metabolismo di carboidrati diversi dal glucosio e in particolare degli alcool-zuccheri, il cui ruolo è stato confinato fino a poco tempo fa quasi esclusivamente al settore alimentare. I dati emersi hanno permesso di strutturare nuove idee verso un possibile miglioramento dell'umanizzazione dei latti di formula e di fornire degli eventuali nuovi strumenti di monitoraggio delle gravidanze patologiche e di neonati pretermine o con disturbi del metabolismo.

Da questi risultati si è preso spunto per intraprendere lo sviluppo di un'ulteriore

analisi, riguardante lo studio del metabolismo e dell'utilizzo dei polialcoli (in particolare mannosio ed inositolo) nei neonati che hanno particolari problemi dell'omeostasi metabolica come gli IUGR, i figli di madre diabetica ed i neonati "late-preterm" (**allegato 1**: consenso informato e descrizione). Tutto questo al fine di chiarire ed apportare nuove conoscenze sul metabolismo dei singoli componenti calorici, glucidici e non glucidici, in neonati patologici oltrechè in soggetti sani.



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PARMA
FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE GINECOLOGICHE, OSTETRICHE E DI NEONATOLOGIA

Direttore Prof. Giulio Bevilacqua

CONSENSO INFORMATO

Determinazione dell'utilizzo di zuccheri diversi dal glucosio e degli alcoli degli zuccheri nei neonati

Ricercatori Principali Dr. Frederick C. Battaglia, 060-26-4662
Prof. G. Bevilacqua

Descrizione del Progetto

Le viene chiesto di far aderire il suo bambino alla ricerca di studio per determinare in quale quantità il suo bambino utilizza due tipi di carboidrati (zuccheri), di cui uno è il mannosio e l'altro l'inositolo. Entrambi sono assumibili dalla dieta ed utilizzabili dal nostro organismo ed entrambi possono essere ottenuti dallo zucchero principale contenuto nel sangue che è il glucosio. Inoltre, entrambi questi carboidrati sono contenuti nel latte materno e nei latti adattati, per cui i bimbi ne assumono una quota anche da queste fonti. Lo studio determinerà se i neonati utilizzano una quota maggiore di questi zuccheri di quelli contenuti normalmente nel latte. Se così fosse, i neonati dovrebbero ottenere questa quota in più dal glucosio. Il suo bambino verrà studiato tra i pasti. Il suo bambino è stato selezionato perché sta già ricevendo liquidi per via endovenosa. Per questo studio i liquidi endovenosi conterranno mannosio ed inositolo rintracciabili con isotopi stabili presenti naturalmente in quantità di circa l'1% nel nostro organismo, nel quantitativo che è stato prescritto dal medico che segue il bambino.

Alla fine dell'infusione endovenosa, dopo circa due ore e mezza, verranno effettuati due prelievi di sangue, a distanza di circa 15', per misurare in che quantità sono presenti mannosio ed inositolo.

Procedure:

Se Lei acconsente che suo figlio partecipi a questo studio Le verranno richieste le seguenti cose:

- Saranno revisionate le cartelle cliniche di madre e bambino e saranno registrate alcune informazioni specifiche, quali : l'eventuale ritardo di accrescimento intrauterino, IUGR (se il bambino non cresceva in modo appropriato nel grembo materno), l'eventuale presenza di diabete materno e suoi eventuali trattamenti e la durata della gravidanza. Inoltre saranno raccolti dati riguardanti il peso, la lunghezza e la circonferenza cranica del bambino, l'età gestazionale alla nascita, il peso al momento dello studio, l'età gestazionale corretta, il tipo di allattamento (materno o formula) e il tipo di liquidi infusi.
- I bambini allattati al seno, saranno pesati prima e dopo l'allattamento al fine di determinare la quantità di latte assunto durante il pasto. Il quantitativo di latte assunto può infatti essere stimato dalla differenza di peso. Per i bambini allattati con latte di formula, sarà invece registrato il quantitativo di latte assunto.
- I 3 campioni di sangue necessari per lo studio, sono raccolti tramite la puntura del tallone. Il primo sarà raccolto all'inizio dello studio, e gli altri due alla fine dello studio. Ciascun campione richiede circa 8 gocce di sangue equivalenti ad 1/5 di un cucchiaino da tè (1 ml). Alla fine dello studio, il quantitativo di sangue prelevato è di circa 3 ml (poco più che mezzo cucchiaino da tè). Il resto delle cure e dell'alimentazione del bambino non verrà modificata. I campioni sono utilizzati per misurare il quantitativo di questi zuccheri nel sangue (mannosio, inositolo e glucosio). Lo studio durerà 3 ore.

Problemi e rischi

Ciascun prelievo da tallone richiede circa 8 gocce di sangue equivalenti ad 1/5 di un cucchiaino da tè. Questo è il metodo standard, usato di routine in ospedale, per ottenere campioni di sangue di neonati su cui effettuare test abituali (ad esempio per i routinari test di screening). Potrebbe bruciare per l'attimo in cui la lancetta tocca il tallone. Potrebbe esistere la possibilità di sviluppo, circa un bambino su dieci, una piccola ecchimosi o cicatrice e durare per poche settimane. Il rischio di infezione locale è di 1 su 1000 bambini.

I liquidi contenenti gli zuccheri verranno infusi tramite catetere endovenoso, già posizionato per le altre terapie del bimbo. Esiste la possibilità che il liquido possa fuoriuscire, ma dal momento che le quantità infuse sono estremamente piccole, la possibilità di irritazione cutanea intorno al catetere venoso è estremamente piccola. Le infermiere controlleranno il catetere frequentemente e se avranno l'impressione che ci sia una fuoriuscita di liquidi lo studio verrà immediatamente interrotto. Come per tutti gli studi, ci potrebbero essere dei possibili rischi sconosciuti.

Benefici

Lo studio non darà benefici immediati e diretti al suo bambino, né curerà alcuna malattia. Questo studio non è stato ideato per trattare alcuna malattia o per migliorare la salute immediata del suo bambino (i possibili rischi sono già stati menzionati nella sezione precedente). Questo studio ci aiuterà a determinare le necessità alimentari dei neonati per quanto riguarda mannosio ed inositolo, carboidrati che potrebbero rivestire un ruolo importante per la crescita e lo sviluppo dei bambini.

Costi per i partecipanti

Lei non dovrà sostenere alcun costo per far partecipare il suo bambino allo studio né sarà pagata.

Sponsor dello studio

- Questa ricerca è finanziata dal National Institute of Health.

Partecipazione volontaria e rifiuto dello studio

La partecipazione allo studio è volontaria. Lei ha il diritto scegliere di non partecipare allo studio. Anche se decidesse di non partecipare allo studio, il medico continuerà ad occuparsi di Lei. Lei non perderà alcun beneficio o cure mediche cui ha diritto.

Se Lei sceglie di prendere parte allo studio avrà il diritto di interromperlo in qualsiasi momento. Le verranno comunicate eventuali nuove scoperte emerse durante lo studio qualora possano su di esso influire, e Lei verrà richiesto se vuole continuarlo. Il medico responsabile dello studio potrà decidere di interrompere la partecipazione del suo bambino allo studio, senza il suo consenso qualora ritenga che il suo bambino possa essere danneggiato per qualsiasi motivo. Anche lo sponsor può decidere di interrompere lo studio in qualsiasi momento, comunicandone le motivazioni.

Domande

La Dottoressa Laura Brown ed il Professor Frederick Battaglia sono i ricercatori che eseguono (laboristicamente) lo studio. Lei potrà richiedere qualsiasi informazione in merito, da subito. Se in futuro avrà dei quesiti potrà contattare la Dottoressa Brown al n° 303 2660155. Le sarà consegnata una copia di questo consenso da conservare. Sebbene l'interlocutrice principale della ricerca sia la Dottoressa Brown, altre informazioni potranno essere ottenute chiamando il Centro Generale di Ricerca al n° 303 7648538 per qualsiasi quesito legato alla partecipazione allo studio. Ogni altra informazione sui suoi diritti sarà disponibile chiamando Colorado Multiple Institution Review Board al n° 3037241055.

In Italia, i referenti dello studio sono: Prof. G. Bevilacqua (tel. 0521702993), Dr. C. Cavalli (0521702226/), Dr.ssa Daniela Gianotti

Riservatezza

In riferimento alla normativa sulla privacy che regola il trattamento dei dati sensibili Legge 31 dicembre 1996, n. 675 "Tutela delle persone e di altri soggetti rispetto al trattamento dei dati personali" pubblicata nella *Gazzetta Ufficiale* n. 5 dell'8 gennaio 1997 - Supplemento Ordinario n. 3 e del codice in materia dei dati personali, informativa ai sensi dell'art. 13 del D.Lgs. 196/2003

Noi cercheremo di mantenere la Sua cartella clinica riservata (ma non possiamo garantirlo). Comunque, i dati raccolti che la identificano (compresa la cartella clinica) ed il consenso informato da Lei firmato saranno custoditi sotto chiave dalle seguenti persone:

- Agenzia Federale che controlla le ricerche umane
- Colorado Multiple Institution Review Board
- Investigatore e gruppo di ricerca per questo studio
- Lo sponsor o un agente per lo sponsor
- Un regolatore ufficiale delle istituzioni dove la ricerca viene condotta, per assicurare conformità con le politiche e il monitoraggio della sicurezza degli studi.

I risultati di questa ricerca potrebbero essere esposti durante congressi o pubblicati in articoli. In ogni caso, il Suo nome sarà sempre tenuto segreto.

(Danni) Problemi e risarcimento

Se deciderà di partecipare a questo studio, Le verrà richiesto di informare il suo Medico Curante. Se avrà domande riguardanti eventuali danni (problemi) legati allo studio Lei potrà contattare la Dottoressa Brown al n° 303 266 0155 e/o il suo medico. La Dottoressa Brown sarà informata su ogni possibile problema cui il Suo bambino potrà avere durante lo studio. Se il Suo bambino dovesse avere problemi in questa ricerca le verrà consegnato il riferimento di un Centro Medico dove verranno effettuate le cure di cui avrà bisogno.

Autorizzazione

Io ho letto questo protocollo dello studio o mi è stato letto. Io ho capito i possibili rischi e benefici dello studio. So che la partecipazione allo studio è volontaria. Ho scelto di far partecipare allo studio il mio bambino. Sono a conoscenza che potrò interrompere tale partecipazione e che il mio bambino riceverà ugualmente tutte le cure mediche abituali. Mi è stata consegnata una copia di consenso informato.

Nome stampato del partecipante allo studio

.....
firma

.....
data

.....
Firma della persona che ha illustrato il consenso

.....
firma del ricercatore

versione 25/07/2008

Allegato 1

CAPITOLO 6

CONCLUSIONI

In conclusione, lo **STUDIO A** mostra chiaramente che nel latte materno sono presenti vari carboidrati diversi dal glucosio e una quota ben dosabile di alcool-zuccheri. Dato che questi sono stati rilevati in concentrazioni aumentate anche nel sangue fetale, rispetto a quello materno, è ragionevole attribuire un significato nutrizionale alla loro presenza. E' presente tuttavia una certa discrepanza tra le concentrazioni di questi componenti nel latte umano e nelle varie formulazioni per nati a termine e pretermine. Di notevole importanza saranno dunque i risultati comparativi dello studio condotto sul metabolismo post-prandiale del neonato a termine sano con i dati dei patologici: neonati pretermine, con difetto di crescita intrauterino, o nati da madri diabetiche. Auspichiamo che questo nuovo braccio dello studio possa permettere di comprendere meglio la funzione degli alcool-zuccheri e di fornire anche nuove evidenze per il miglioramento dell'umanizzazione del latte di formula.

Per quanto concerne lo **STUDIO B**, in conclusione, il riscontro plasmatico nel neonato a termine sano, di diversi carboidrati presenti nel latte umano oltre al glucosio, sottolinea la loro importanza nella nutrizione neonatale; lo studio del metabolismo di questi carboidrati nel neonato è di fondamentale importanza per la comprensione di alcune alterazioni della crescita neonatale come avviene nei gravi pretermine, nei nati da madri diabetiche o con ritardo di crescita intrauterina (IUGR), anche se studi ulteriori sono necessari per definire il loro ruolo individuale nel metabolismo e nella crescita neonatale.

Ulteriori ricerche sono indispensabili e la futura applicazione di tali conoscenze nella pratica clinica , apre nuovi orizzonti di supporto nutrizionale dei piccoli nati.

BIBLIOGRAFIA

1. Livesey G. Health potential of polyols as sugars replacers, with emphasis on low glicemic properties. *Nutr Res Rev* 2003; 16: 163-191
2. Prada A, Brusati V, Paolini C.L, Marconi A.M, Battaglia F.C. Il metabolismo del glucosio e dei carboidrati alterativi nella mamma e nel feto. *Riv.Ital. Med. Per.* 2005; 8-n.1: 7-10
3. Marconi A.M, Paolini C, Buscaglia M, Zerbe G, Battaglia FC, Pardi G. The impact of gestational age on the maternal-fetal glucose concentration difference. *Obstet Gynecol* 1996; 87: 937-942
4. Milner RDG, Fekete M, Assan R. *Arch of Dis in Child* 1972; 17: 186-189
5. Teng CC, Tjoa S, Fennessey PV, Wilkening RB, Battaglia FC. Transplacental carbohydrate and sugar alcohol concentrations and their uptakes in ovine pregnancy. *Exp Biol Med (Maywood)* 2002; 227:189-95
6. Brusati V, Jozwik M, Jozwik M, Teng C, Paolini C, Marconi AM et al. Fetal and maternal non-glucose carbohydrates and polyols concentrations in normal human pregnancies at term. *Pediatr Res* 2005; 58:700-4
7. Panneerselvam K, Freeze HH: Mannose enters mammalian cell using a specific transporter that is sensitive to glucose. *J Biol Chem* 1996; 271: 9417-9421

8. Pannerselvam K, Etchinson JR, Freeze HH: Human fibroblasts prefer mannose over glucose as source of mannose for n-glycosylation: evidence for the functional importance of transported mannose. *J Biol Chem* 1997; 272: 23123-23129
9. Jauniaux E, Hempstock J, Teng C, Battaglia FC, Burton GJ. Polyol concentrations in the fluid compartments of the human conceptus during the first trimester of pregnancy: maintenance of redox potential in a low oxygen environment. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90:1171-5
10. Bougneres PF. Stable isotope tracers and the determination of fuel fluxes in newborn infants. *Biol of the Neonate* 1987; 52 (1): 87-96
11. Lucas A, Aynsley-Green A, Bloom SR. Gut hormones and the first meals. *Clin Scien* 1981; 60: 349-353
12. Livesey G. Energy values of dietary fibre and sugar alcohols for man. *Nutr Res Rev* 1992; 5: 61-84
13. Battaglia FC, Meschia G, Blechner JN, Barron DH. The free myoinositol concentration of adult and fetal tissues of several species. *Q J Exp Physiol Cogn Med Sci* 1961; 46: 188-193
14. Groenen PM, Peer PG, Wevers RA, Swinkels DW, Franke B, Mariman EC et al. Maternal myo-inositol, glucose, and zinc status is associated with the risk of offspring with spina bifida. *Am J Obstet Gynecol* 2003; 189:1713-9

15. Kok RD, Steegers-Theunissen R, Eskes T, Van den Berg P. Decreased relative brain tissue levels of inositol in fetal hydrocephalus. *Am J Obstet Gynecol* 2003; 188: 978-980
16. Weigensberg MJ, Garcia-Palmer Fj, Freinkel N. Uptake of myo-inositol by early-somite rat conceptus. Transport kinetics and effects of hyperglycemia. *Diabetes* 1990; 39: 575-582
17. Cunningham MD, Desai NS, Thompson SA. Amniotic fluid phosphatidylglycerol in diabetic pregnancies. *Am J Obstet Gynecol* 1978; 719:131
18. Hallman M, Pohjavuori M, Bry K. Inositol supplementation in respiratory distress syndrome. *J Pediatr* 1987; 110: 604
19. Hallman M, Bry K, Hoppu K. Inositol supplementation in premature infants with respiratory distress syndrome. *New Engl J Med* 1992; 326: 1285-1287
20. Howlett A, Ohlsson A. Inositol for respiratory distress syndrome. *Cochrane Database Syst Rev* 2003; 4: CD000366
21. Jedziniak JA, Chylack LT, Cheng NM, Gillis MK, Kalustian AA, Tug WH. The sorbitol pathway in the human lens: aldose reductase and polyol dehydrogenase. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1981; 20: 314-326
22. Lee AY, Chung SS. Contribution of polyol pathway to oxidative stress in diabetic cataract. *FASEB J* 1999; 13: 23-30

23. Nicol CJ, Zielenski J, Tsui LC, Wells PG. An embryoprotective role for the glucose-6-phosphate dehydrogenase in developmental oxidative stress and chemical teratogenesis. *FASEB J* 2000; 14: 111.127
24. Cavalli C, Teng C, Battaglia FC, Bevilacqua G. Free sugar and sugar alcohol concentrations in human breast milk. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2006; 42:215-21
25. Aynsley-Green A, Bloom SR, Williamson DH, Turner RC. Endocrine and metabolic response in the human newborn to first feed of breast milk 1977; 52: 291-295
26. Lucas A, Boyes S, Bloom SR, Aynsley-Green A. Metabolic and endocrine responses to a milk feed in six-day-old term infants: differences between breast and cow's milk formula feeding. *Acta Paediatr Scand* 1981; 70:195-200
27. Zarlengo KM, Battaglia FC, Fennessey P, Hay WW, Jr. Relationship between glucose utilization rate and glucose concentration in preterm infants. *Biol Neonate* 1986; 49:181-9
28. Ugur Serpil, Haktan M, Cakir E, Senocak M, Telci A. Serum insulin glucose levels in breast-fed and formula-fed infants in the first week of life. *Clin Therap* 1988; 10: 678-687
29. Spedale SB, Battaglia FC, Sparks JW. Hepatic metabolism of glucose, galactose, and lactate after milk feeding in newborn lambs. *Am J Physiol* 1992; 262:E46-E51

30. Kliegman RM, Sparks JW. Perinatal galactose metabolism. *J Pediatr* 1985; 107:831-41
31. Siegel CD, Sparks JW, Battaglia FC. Patterns of serum glucose and galactose concentrations in term newborn infants after milk feeding. *Biol Neonate* 1988; 54:301-6
32. Sparks JW, Avery GB, Fletcher AB, Simmons MA, Glinsmann WH. Parenteral galactose therapy in the glucose-intolerant premature infant. *J Pediatr* 1982; 100:255-9
33. Loberant N, Barak M, Gaitini D, Herskovits M, Ben Elisha M, Roguin N. Closure of the ductus venosus in neonates: findings on real-time gray-scale, color-flow Doppler, and duplex Doppler sonography. *AJR Am J Roentgenol* 1992; 159:1083-1085
34. Loberant N, Herskovits M, Barak M, Ben Elisha M, Herschkowitz S, Sela S et al. Closure of the ductus venosus in premature infants: findings on real-time gray-scale, color-flow Doppler, and duplex Doppler sonography. *AJR Am J Roentgenol* 1999; 172:227-9
35. Kondo M, Itoh S, Kunikata T, Kusaka T, Ozaki T, Isobe K et al. Time of closure of ductus venosus in term and preterm neonates. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2001; 85:F57-F59
36. Botti JJ, Edelstone DI, Caritis SN, Mueller-Heubach E. Portal venous blood flow distribution to liver and ductus venosus in newborn lambs. *Am J Obstet Gynecol* 1982; 144:303-8

37. Townsend SF, Rudolph CD, Rudolph AM. Changes in ovine hepatic circulation and oxygen consumption at birth. *Pediatr Res* 1989; 25:300-4
39. Murayama K, Nagasaka H, Tate K, Ohsone Y, Kanazawa M, Kobayashi K et al. Significant correlations between the flow volume of patent ductus venosus and early neonatal liver function: possible involvement of patent ductus venosus in postnatal liver function. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2006; 91:F175-F179
38. Nishimura Y, Tajima G, Dwi BA, Sakamoto A, Ono H, Sakura N et al. Differential diagnosis of neonatal mild hypergalactosaemia detected by mass screening: clinical significance of portal vein imaging. *J Inherit Metab Dis* 2004; 27:11-8
40. Ono H, Mawatari H, Mizoguchi N, Eguchi T, Sakura N, Hamakawa M. Delay of liver maturation as a cause of transient neonatal galactosemia. *Pediatr Int* 2000; 42:61-3
41. Garelo E, Battista S, Bar F, Niro GA, Cappello N, Rizzetto M et al. Evaluation of hepatic function in liver cirrhosis: clinical utility of galactose elimination capacity, hepatic clearance of D-sorbitol, and laboratory investigations. *Dig Dis Sci* 1999; 44:782-8
42. Addario L, Scaglione G, Tritto G, Di Costanzo GG, De Luca M, Lampasi F et al. Prognostic value of quantitative liver function tests in viral cirrhosis: a prospective study. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2006; 18:713-20

43. Tang HS, Hu OY. Assessment of liver function using a novel galactose single point method. *Digestion* 1992; 52:222-31
44. Narkewicz MR, Sondheimer HM, Ziegler JW, Otanni Y, Lorts A, Shaffer EM et al. Hepatic dysfunction following the Fontan procedure. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2003; 36:352-7
45. Bellotti M, Pennati G, De Gasperi C, Bozzo M, Battaglia FC, Ferrazzi E. Simultaneous measurements of umbilical venous, fetal hepatic, and ductus venosus blood flow in growth-restricted human fetuses. *Am J Obstet Gynecol* 2004; 190:1347-58
46. Kiserud T, Kessler J, Ebbing C, Rasmussen S. Ductus venosus shunting in growth-restricted fetuses and the effect of umbilical circulatory compromise. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2006; 28:143-9
47. Stahl B, Thurl S, Zeng J, Karas M, Hillenkamp F, Steup M et al. Oligosaccharides from human milk as revealed by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal Biochem* 1994; 223:218-26
48. Engfer MB, Stahl B, Finke B, Sawatzki G, Daniel H. Human milk oligosaccharides are resistant to enzymatic hydrolysis in the upper gastrointestinal tract. *Am J Clin Nutr* 2000; 71:1589-96
49. Coppa GV, Pierani P, Zampini L, Bruni S, Carloni I, Gabrielli O. Characterization of oligosaccharides in milk and feces of breast-fed infants by high-performance anion-exchange chromatography. *Adv Exp Med Biol* 2001; 501:307-14

