



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
DIPARTIMENTO di SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea in Scienze Biologiche

L'analisi lipidomica delle vescicole extracellulari, derivate dal tessuto adiposo, rivela una composizione lipidica specifica delle EV che può essere informativa dello stato metabolico obeso.

Lipidomic analysis of adipose-derived extracellular vesicles reveals specific EV lipid sorting informative of the obese metabolic state

Tesi di Laurea di:
Anita Della Valle

Sessione autunnale 2023/2024

Docente Referente
Prof. Andrea Frontini

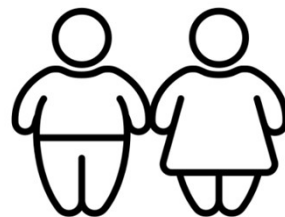
SUMMARY

«Le vescicole cellulari derivanti dal tessuto adiposo (AdEVs) trasportano lipidi che potrebbero contribuire allo sviluppo di disfunzioni metaboliche correlate all'obesità. Questo studio ha l'obiettivo di definire le caratteristiche lipidiche delle AdEVs del modello murino attraverso un approccio LC – MS/MS sia in un contesto metabolico sano che in uno obeso. Il diverso raggruppamento del lipidoma delle AdEVs e del tessuto adiposo viscerale (VAT), attraverso l'analisi delle componenti principali, mostra una selezione lipidica specifica da parte delle AdEVs rispetto al secretoma del VAT. Nel complesso le analisi mostrano nelle AdEVs un arricchimento in ceramidi, sfingomieline e fosfatidilgliceroli rispetto al VAT d'origine, il cui contenuto lipidico è strettamente correlato allo stato obeso ed è influenzato dalla dieta. L'obesità, inoltre, impatta sul lipidoma delle AdEVs, rispecchiando le alterazioni lipidiche osservate nel plasma e nel VAT. Per concludere, il nostro studio identifica pattern lipidici specifici del plasma, del VAT e delle AdEVs che forniscono informazioni sullo stato metabolico. Le specie lipidiche arricchite nelle AdEVs nel contesto obeso potrebbero costituire possibili biomarcatori o intermediari delle disfunzioni metaboliche correlate all'obesità.»

L'obesità e l'organo adiposo

L'**obesità** è una condizione patologica caratterizzata da un accumulo eccessivo di grasso che porta ad uno stato infiammatorio cronico di basso grado

- Colpisce più del 40% della popolazione adulta mondiale



Cardiopatie

Insulina resistenza (T2D)

Sindrome metabolica

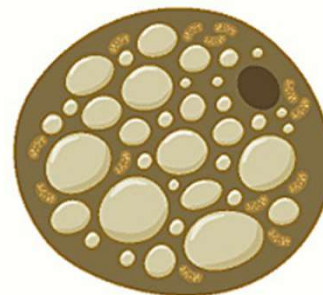
Neoplasie maligne

Il tessuto adiposo (AT) si può distinguere in:



Tessuto adiposo bianco (WAT) :

- adipociti costituiti da un'unica grossa goccia lipidica
- funzione di accumulo energetico



Tessuto adiposo bruno (BAT):

- adipociti formati da numerose gocce lipidiche
- funzione di consumo energetico

Il grasso è organizzato in compartimenti viscerali e sottocutaneo

Presenta diversi citotipi:

- Adipociti
- Cellule staminali del tessuto adiposo (ADSC)
- Macrofagi
- Cellule endoteliali

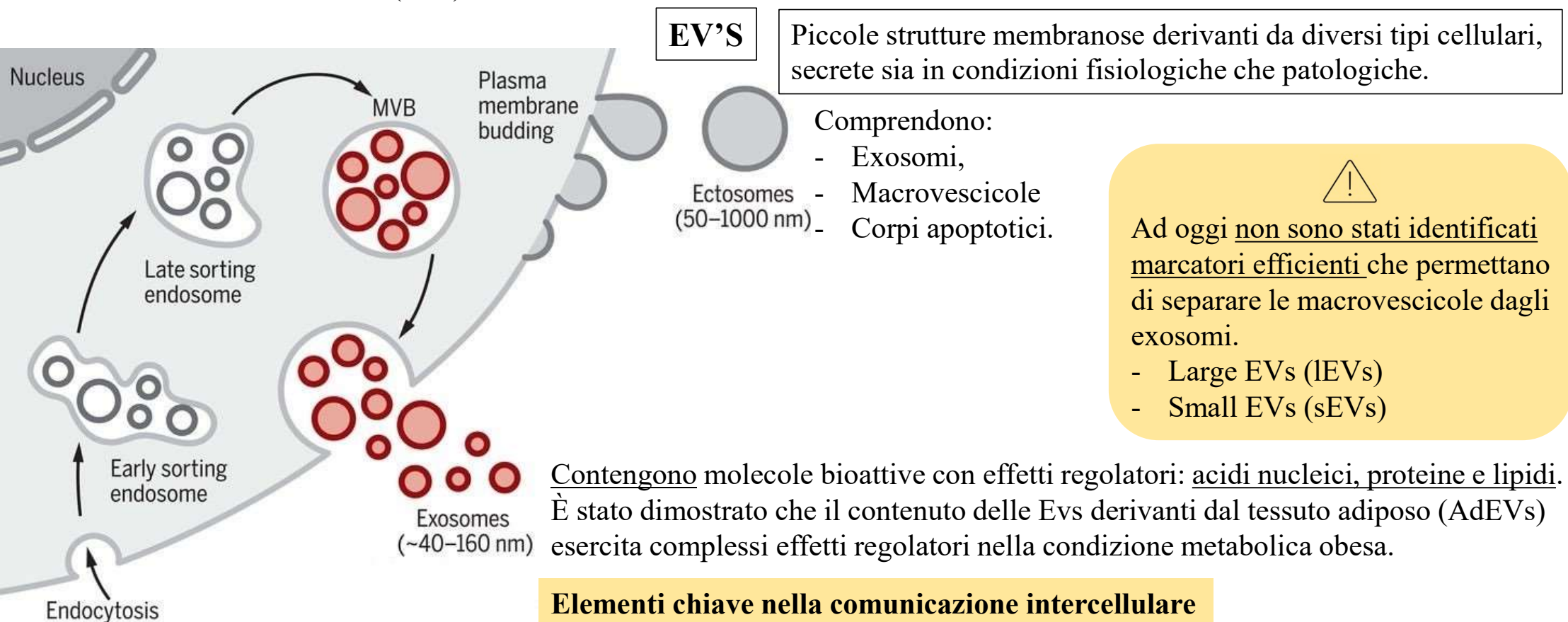
Contribuiscono al **secretoma** del
AT

Funzione
endocrina
dell'organo
adiposo

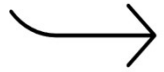
Funzione esocrina del TA

Il tessuto adiposo secerne:

- Adipochine: leptina → ipotalamo → sensazione di sazietà
- Vescicole extracellulari (EVs)

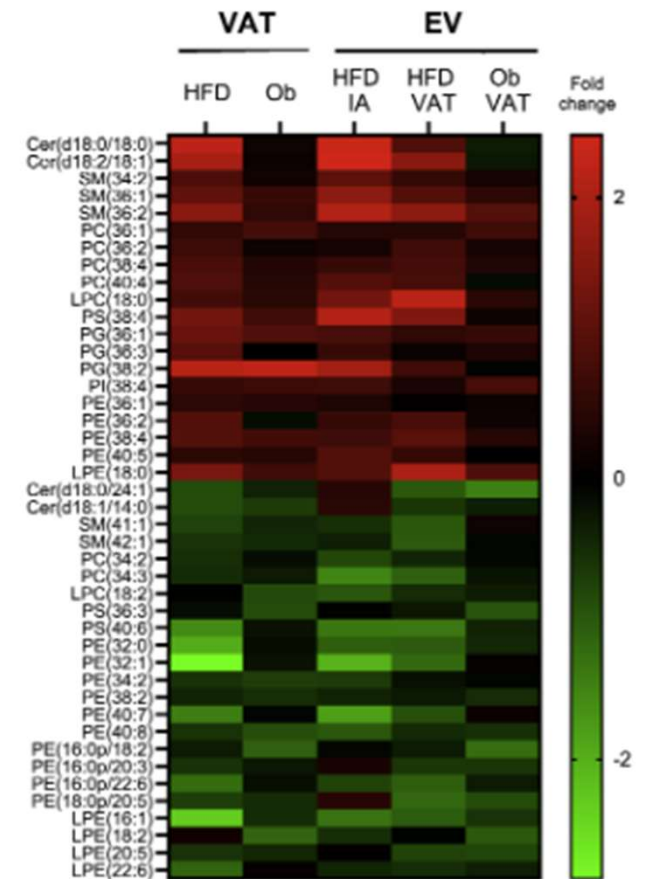


Lipidomica

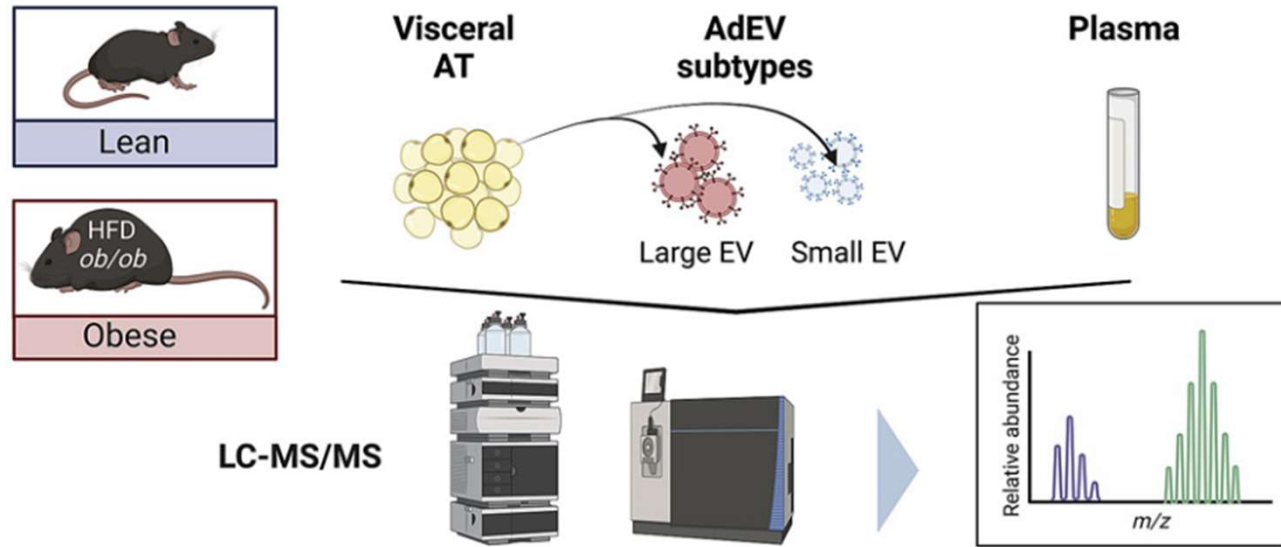


Analisi sistematica e quantitative delle differenti classi lipidiche, come fosfolipidi, trigliceridi, steroli, e acidi grassi, presenti in una cellula, in un tessuto o in un organo

- Sono state identificate fino a 2000 specie lipidiche diverse che permettono la stabilità delle Ev nei fluidi biologici
- Offre una visione innovativa sui lipidi trasportati dalle EVs e il loro ruolo potenziale come biomarcatori dello stato metabolico
- È stato osservato che alcuni lipidi trasportati fungono da substrati energetici in varie condizioni fisio-patologiche



Obiettivo del lavoro



Questo lavoro si è posto come obiettivo quello di **confrontare la composizione lipidica delle AdEVs**, vescicole extracellulari derivanti dal tessuto adiposo, in stati metabolici differenti (obeso e non obeso) utilizzando due modelli diversi: l'obesità genetica *Ob*, e l'obesità indotta dalla dieta, HFD (high fat diet).

Lo scopo dello studio è stato quello di dimostrare:

- Se il lipidoma delle AdEVs è dipendente dallo stato fisiopatologico del tessuto adiposo viscerale (VAT)
- Se sia possibile identificare delle classi o specie lipidiche i cui cambiamenti sono strettamente correlati allo stato metabolico obeso

Materiali e metodi

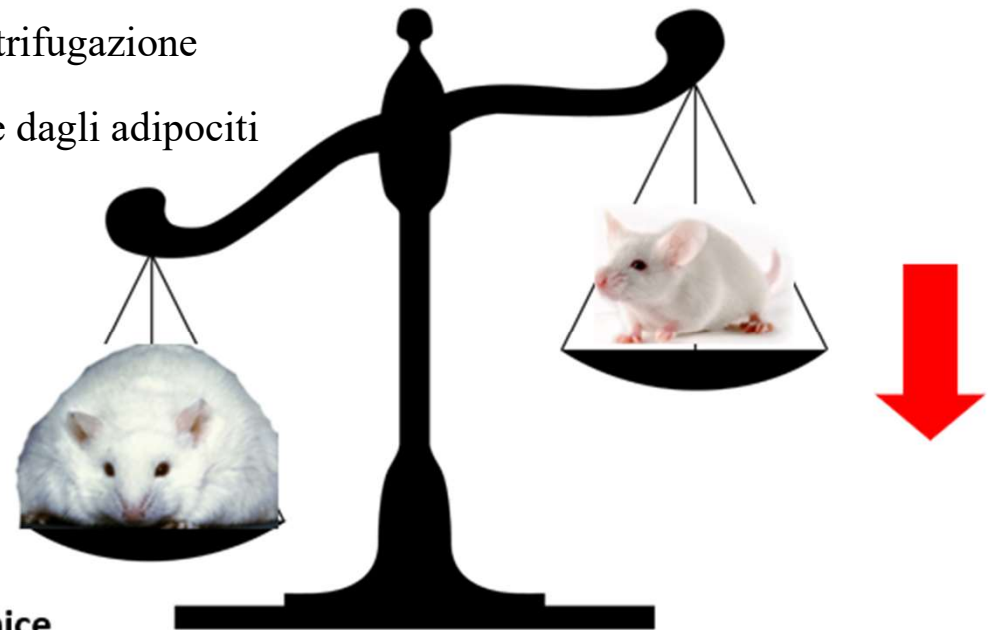
Modello sperimentale animale:

- Topo geneticamente obeso *leptina-deficienti* (ob/ob) che sviluppa iperfagia e obesità, nutriti con *standard chow diet*
- Topo *wild type* nei quali l'obesità è indotta da un'alimentazione di 15 settimane ipercalorica (High Fat Diet)

Dettaglio dei metodi:

- Raccolta del plasma: puntura intracardica, provette ETDA, centrifugazione
- Isolamento EVs dal tessuto adiposo viscerale (VAT) completo e dagli adipociti isolati (IA) dal VAT
- NTA (Nanoparticle Tracking Analysis)
- Profilo lipidico determinato grazie all'analisi LC-MS/MS (cromatografia liquida e spettrometria di massa a tandem)
- Western Blotting
- TEM (microscopia elettronica a trasmissione)

Ob/ob mice
db/db mice



L'impatto dell'obesità sul lipidoma del tessuto adiposo

Entrambi i modelli obesi (ob/ob e HFD) mostrano un aumento della massa del TA tipico del fenotipo obeso

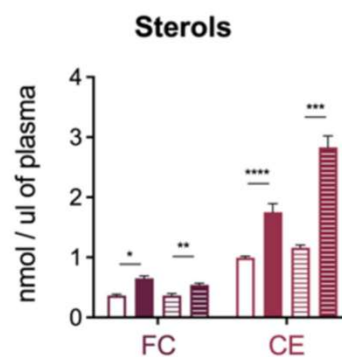
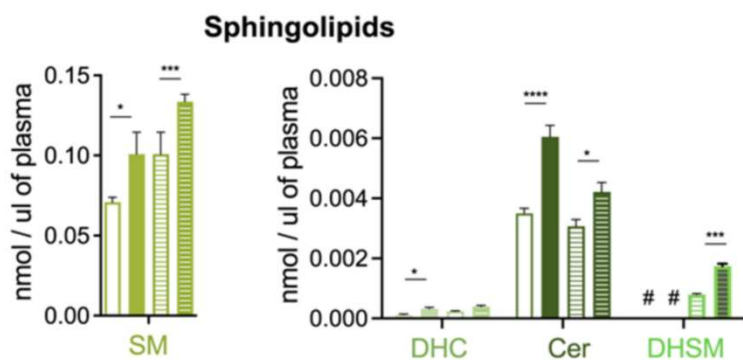
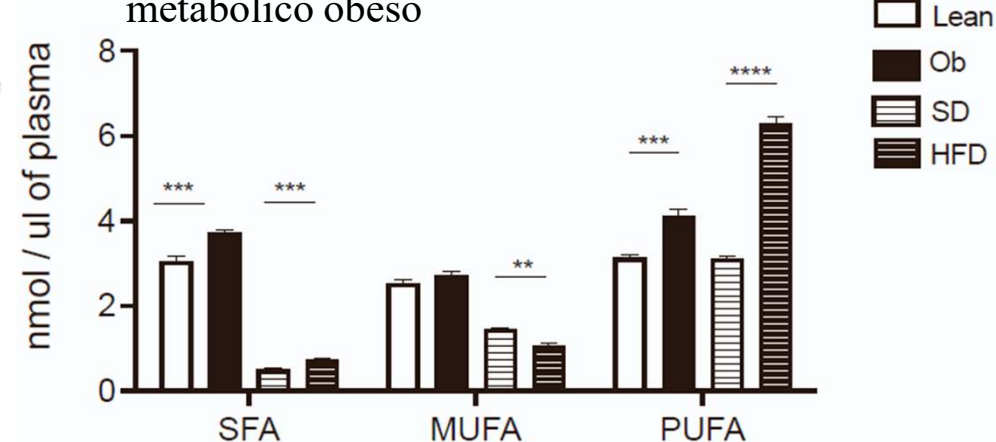
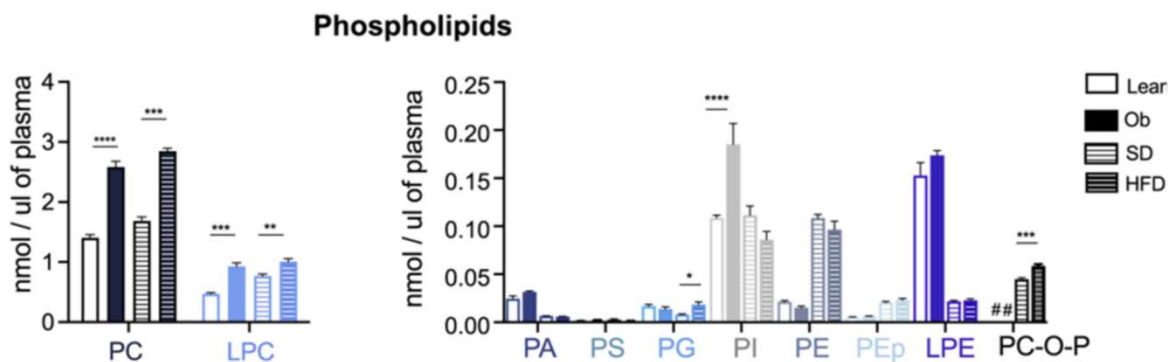


- Iperglicemia
- Iperinsulinemia

PROFILO LIPIDOMICO DEL PLASMA

È possibile osservare dei cambiamenti comuni tra le classi lipidiche del plasma nei due modelli obesi

Si possono osservare delle tipologie di acidi grassi prevalenti caratteristiche dello stato metabolico obeso



In particolare è stato osservato:

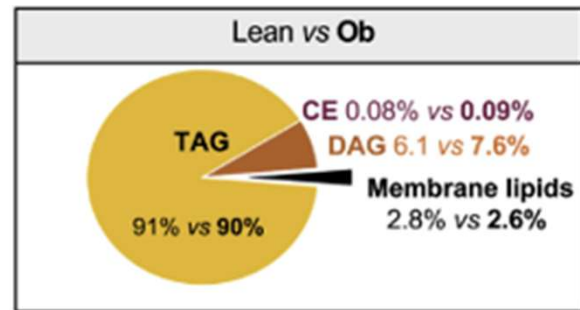
- in entrambi i modelli un arricchimento C18:0 alle spese di C16:1
- Arricchimento in C18:1 (ob/ob)
- Arricchimento in C18:2 (HFD)

L'impatto dell'obesità sul lipidoma del tessuto adiposo

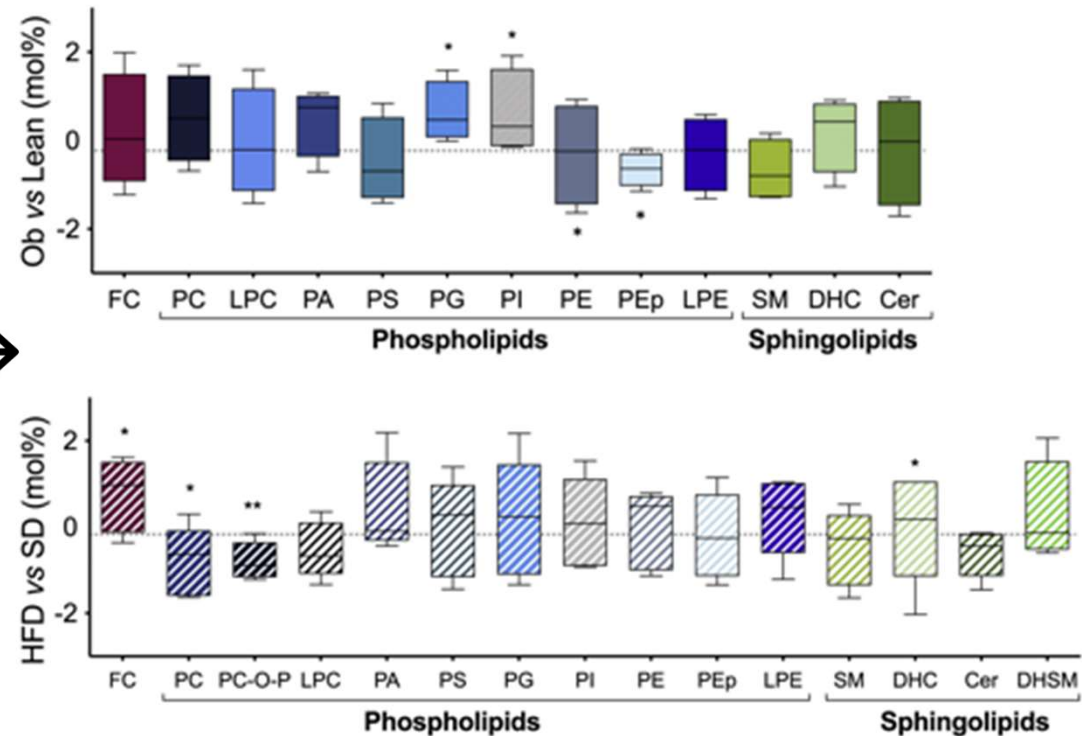
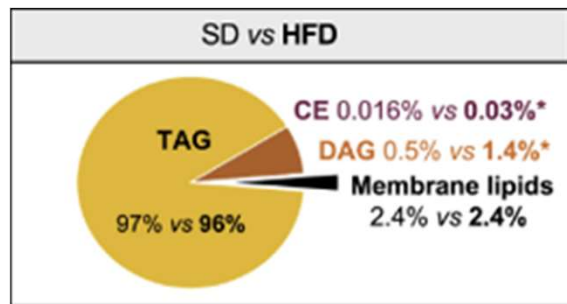
Profilo lipidomico del tessuto adiposo viscerale (VAT)

Si può osservare un'alterazioni nella composizione lipidica

Analisi dello sfingofosfolipidoma

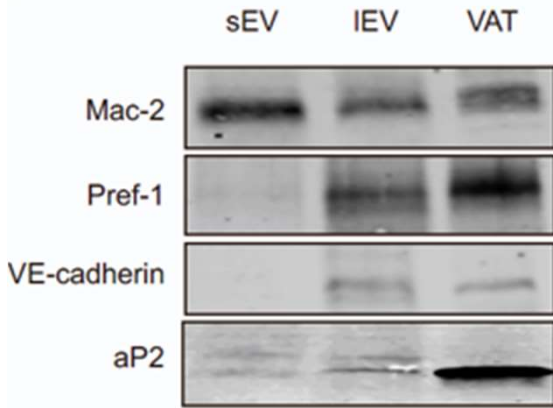
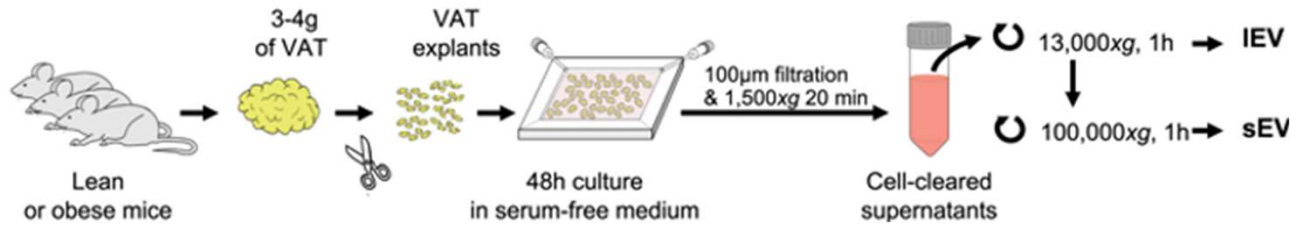


È stata effettuata un'analisi delle differenze di concentrazione nelle classi dei lipidi di membrana

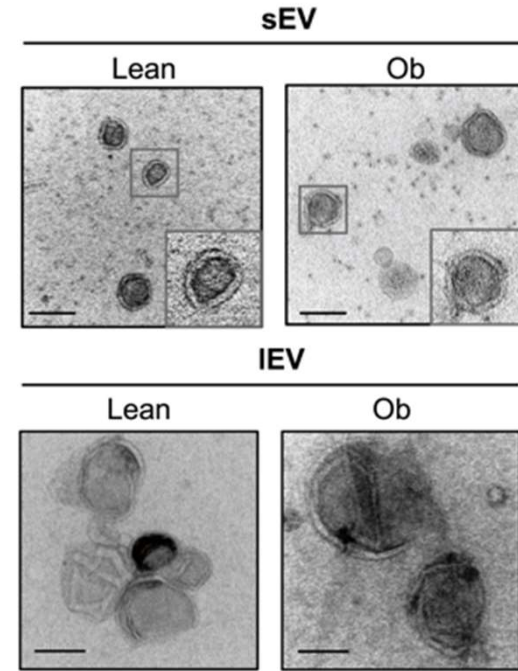


Il profilo lipidico del plasma e del tessuto adiposo viscerale dei topi ob/ob e HFD ha confermato la presenza di biomarcatori circolanti caratteristici dello stato metabolico obeso

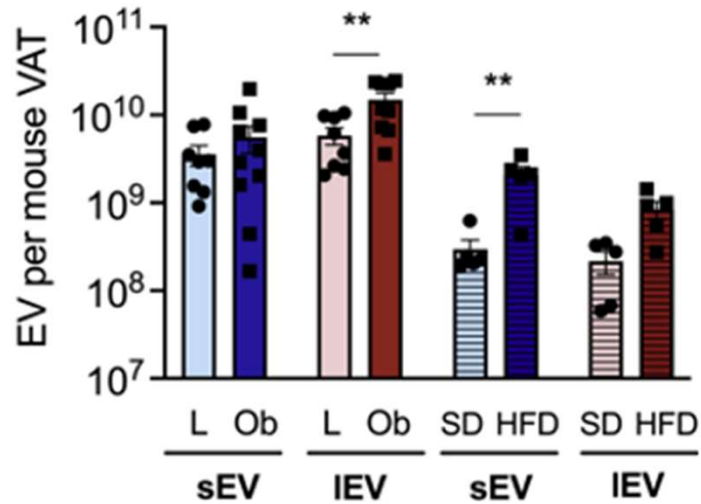
EVs isolate dal VAT



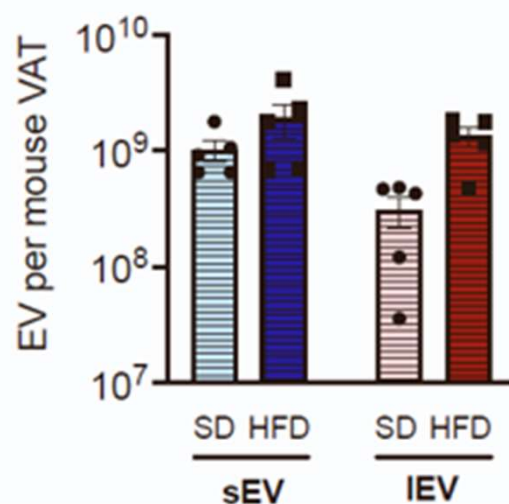
Le AdEVs sono originate da diversi tipi cellulari presenti nel tessuto adiposo.



EVs secrete da tutti i citotipi



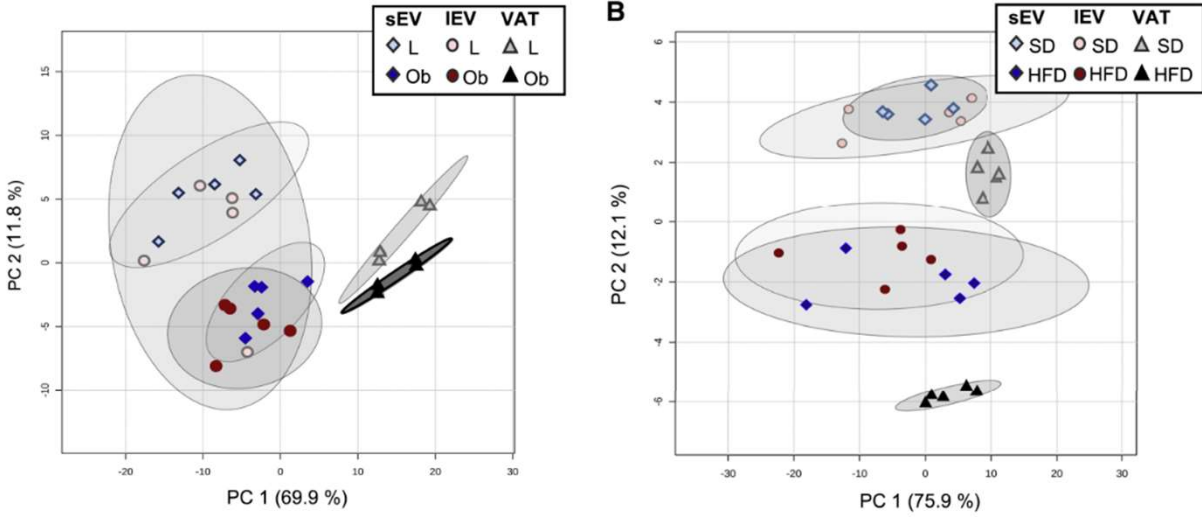
EVs secrete da adipociti isolati



Gli adipociti sembrano contribuire in maniera significativa al secretoma del tessuto adiposo viscerale

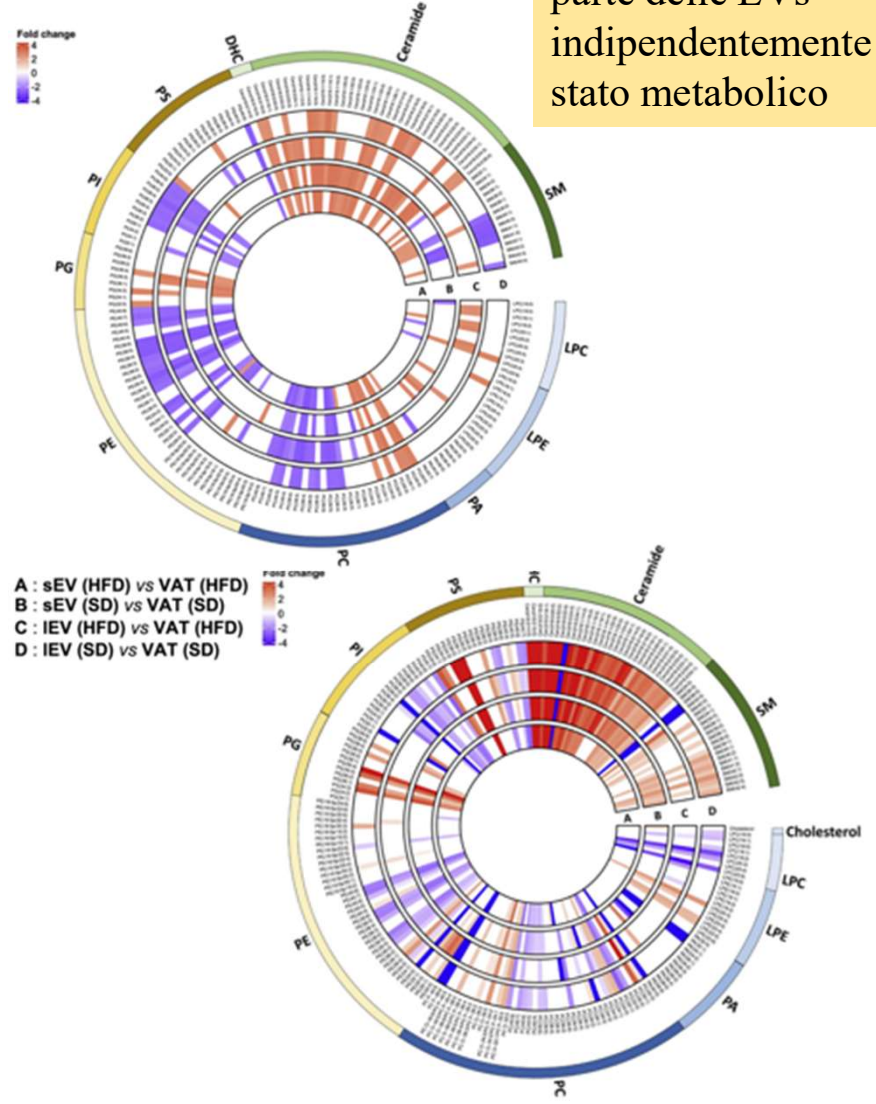
Analisi delle specie lipidiche

Utilizzo della PCA per confrontare il dataset lipidico delle AdEVs e del VAT



La differenza nella composizione lipidica delle AdEVs non è guidata dalla loro origine subcellulare, ma dallo stato metabolico.

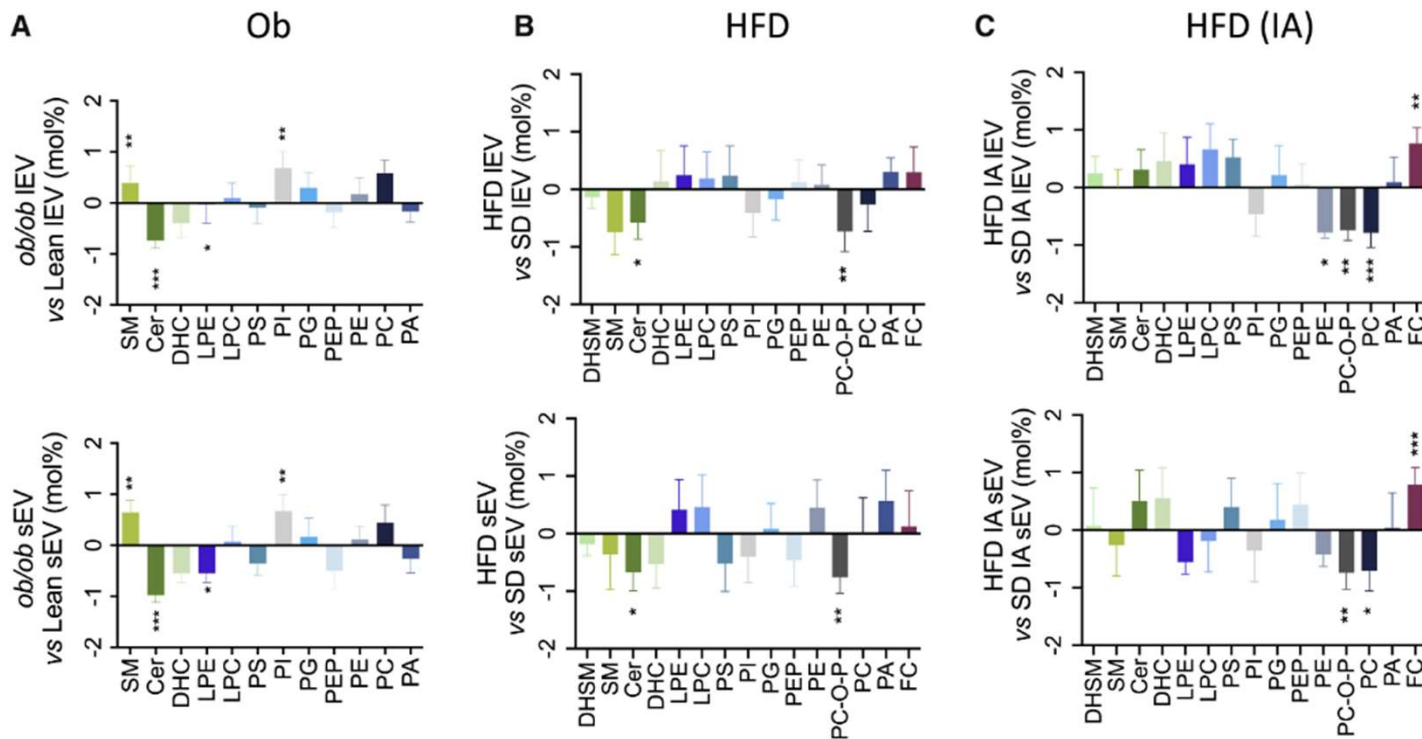
Si osserva una certa selettività lipidica da parte delle EVs indipendentemente dallo stato metabolico



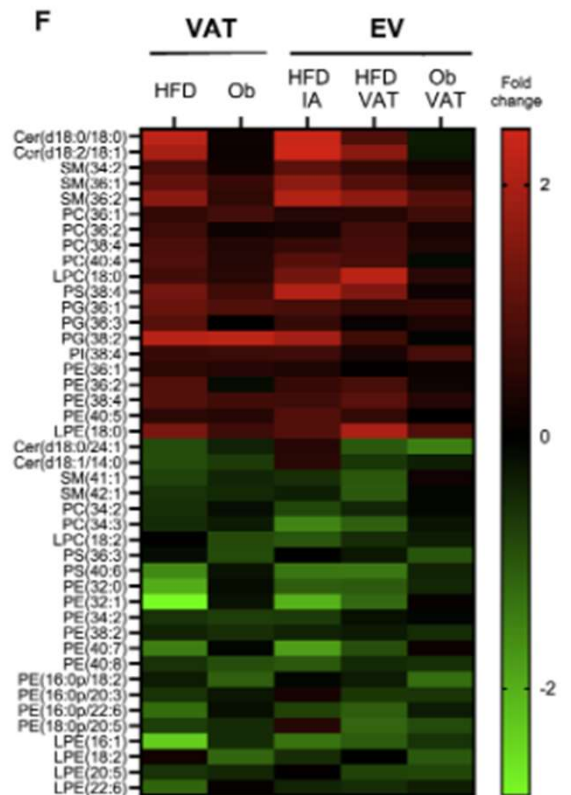
Analisi delle specie lipidiche

Composizione delle classi dei lipidi di membrana delle EVs prodotte in diversi contesti

Cambiamento simultaneo (sia aumento che impoverimento) di specie lipidiche comuni sia nelle AdEVs che nel VAT



Si possono quindi osservare delle differenze comuni indotte dallo stato metabolico obeso.



Conclusioni

Nei due modelli di topo obeso sono state identificate delle modificazioni lipidiche comuni

Sono state misurate concentrazioni maggiori di EVs nel modello di topo obeso rispetto a quello magro

Il contenuto lipidico delle EVs è selettivo rispetto al tessuto lipidico. I lipidi coinvolti possono rappresentare potenziali tracciatori delle AdEVs

La mappa lipidomica specifica delle AdEVs del modello obeso è guidata dalla composizione lipidica del VAT secretorio. Questo mostra la correlazione con lo stato metabolico obeso e la dieta

È quindi evidente il vantaggio di monitorare le AdEVs come biomarcatori periferici per l'analisi dei lipidi alterati

BIBLIOGRAFIA

Lavoro di riferimento:

- Blandin A., Dugail I., Hilairet G., *Lipidomic analysis of adipose-derived extracellular vesicles reveals specific EV lipid sorting informative of the obesity metabolic state*, Cell Reports, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2023.112169>

Informazioni prese da:

- WHO, [who/obesity-and-overweight](https://www.who.int/obesity-and-overweight)
- Skotland T., Sandvig K., Llorente A., review: *Lipids in exosomes: Current knowledge and the way forward*, Elsevier, <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2017.03.001>
- Frontini A., Cinti S., *Distribution and Development of Brown Adipocytes in the Murine and Human Adipose Organ*, Cell Metabolism, <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2010.03.004>
- Li Y, , Tang X., , Gu Y., Zhou G., Minireview: *Distribution and Development of Brown Adipocytes in the Murine and Human Adipose Organ*, Cell Metabolism, <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2010.03.004>