
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

ALESSANDRO BERTOLUZZA , MARIA ANTONIETTA
BERTOLUZZA-MORELLI, SERGIO BONORA, P. FINELLI

**Contributo allo studio sulle correlazioni fra struttura
e proprietà di composti di interesse biologico. Nota
VI. Indagine vibrazionale sulle diverse forme di
colesterolo in relazione a problemi di interesse
biomedico**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 62 (1977), n.5, p. 647–652.*
Accademia Nazionale dei Lincei

[<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1977_8_62_5_647_0>](http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1977_8_62_5_647_0)

L'utilizzo e la stampa di questo documento digitale è consentito liberamente per motivi di
ricerca e studio. Non è consentito l'utilizzo dello stesso per motivi commerciali. Tutte le
copie di questo documento devono riportare questo avvertimento.

*Articolo digitalizzato nel quadro del programma
bdim (Biblioteca Digitale Italiana di Matematica)
SIMAI & UMI*

<http://www.bdim.eu/>

SEZIONE II

(Fisica, chimica, geologia, paleontologia e mineralogia)

Chimica. — *Contributo allo studio sulle correlazioni fra struttura e proprietà di composti di interesse biologico. Nota VI. Indagine vibrazionale sulle diverse forme di colesterolo in relazione a problemi di interesse biomedico.* Nota preliminare di ALESSANDRO BERTOLUZZA (*), MARIA ANTONIETTA BERTOLUZZA-MORELLI (**), SERGIO BONORA (**) e P. FINELLI (**), presentata (***) dal Socio G. B. BONINO.

SUMMARY. — This work concerns the spectroscopic vibrational study of the different polymorphic forms of cholesterol (anhydrous, monohydrate and form II) known in the literature in order to complete a program of vibrational researches on the structure and composition of gallstones.

These three forms of cholesterol are distinguishable in i.r. spectra for the region of ν_{OH} stretching.

In particular, the structure of the water in monohydrate cholesterol has been examined relatively to a recent x-ray study.

The structure of the water in monohydrate cholesterol has a particular meaning in the study of this form of cholesterol in gallstones in relation to their formation and solubilization.

È noto come il colesterolo si trovi nel corpo umano normalmente legato alle lipoproteine o incorporato in aggregazioni con lipidi, come nelle micelle della bile, o in alcune biomembrane.

Se i livelli di colesterolo diventano più alti del normale, tendono a depositarsi cristalli di colesterolo soprattutto nei calcoli biliari [1].

Cristalli di colesterolo sono stati anche recentemente riscontrati nelle lesioni da arteriosclerosi [2], e si è pure osservato come le placche arteriosclerotiche contengano anche cristalli di idrossiapatite [3], tanto da far pensare ad una nucleazione indotta da una specie sull'altra (via probabilmente strati di molecole d'acqua) e ad una implicazione del colesterolo nei processi di calcificazione associati con gli ulteriori stadi di sviluppo di tali lesioni.

Presso la Cattedra di Chimica della Facoltà di Medicina e Chirurgia dell'Università di Bologna è stato programmato un piano di ricerca vibrazionale ultrarossa e Raman laser sul colesterolo in relazione a problemi di interesse biomedico, a carattere interdisciplinare e in stretta collaborazione con Istituti clinici della stessa Facoltà. In questa Nota vengono riportati i risultati preliminari di misure spettroscopiche ultrarosse sulle forme note di colesterolo e indicate le linee di sviluppo della ricerca che riguardano la presenza di tali forme nei calcoli biliari e l'importanza dell'acqua legata al colesterolo ai fini del processo di formazione e solubilizzazione del calcolo.

(*) Cattedra di Chimica della Facoltà di Medicina e Chirurgia della Università di Bologna. Centro Studi di Chimica e Chimica fisica applicata alle caratteristiche di impiego dei materiali, Genova.

(**) Centro di Studio per la Spettroscopia Raman dell'Università di Bologna.

(***) Nella seduta del 16 aprile 1977.

PARTE SPERIMENTALE

Le tre principali forme di colesterolo (colesterolo anidro, colesterolo monoidrato e colesterolo forma II) sono state preparate secondo le indicazioni della letteratura.

Il colesterolo anidro è stato ottenuto [4] per ricristallizzazione del prodotto commerciale (Erba R.P.) da cloroformio.

Il colesterolo monoidrato è stato ottenuto [4] dal prodotto commerciale sciolto in etanolo assoluto all'ebollizione e a riflusso. Per aggiunta di piccole quantità di acqua precipita la forma idrata sotto forma di lamelle perlacee.

La composizione chimica della forma monoidrata è stata verificata per via termogravimetrica.

Il colesterolo forma II è stato ottenuto [5] per cristallizzazione del colesterolo commerciale in presenza di tracce di colestano.

Gli spettri u.r. delle tre diverse forme di colesterolo sono riportati in fig. 1, relativamente alla regione delle vibrazioni νOH .

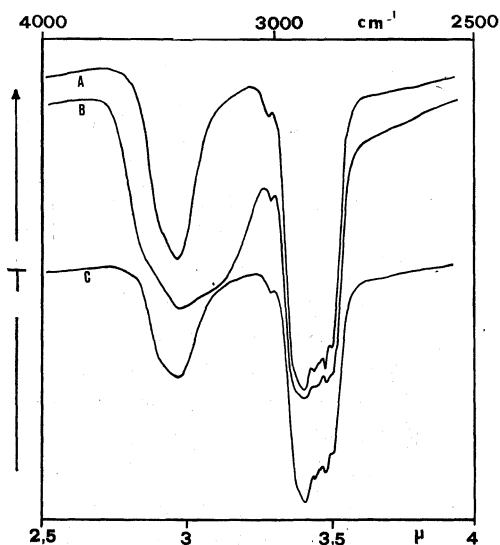


Fig. 1. - Spettri u.r. fra 4000 e 2500 cm^{-1} di A) Colesterolo anidro; B) Colesterolo monoidrato; C) Colesterolo II.

Gli spettri sono stati ottenuti su emulsioni in esaclorobutadiene, utilizzando uno spettrometro Leitz a doppio raggio, corredato di un opportuno reticolo per l'ultravioletto vicino.

DISCUSSIONE

Sono a tutt'oggi note tre principali forme di colesterolo: colesterolo anidro, colesterolo monoidrato, e colesterolo forma II.

Del colesterolo anidro si conosce più di un'indagine vibrazionale u.r. (per la più recente bibliografia vedasi [6-15]), con particolare riguardo alla regione della vibrazione di allungamento νOH fra 3600 e 3200 cm^{-1} . È noto anche uno studio di raggi X [16-17].

Del colesterolo monoidrato non risulta invece descritto in letteratura lo spettro u.r. È noto un recente studio di raggi X [18], che riassume precedenti misure, e che mostra come in questa forma le molecole di colesterolo si dispongano nel senso che i gruppi OH vengono a localizzarsi da parti opposte rispetto ad un piano e interagiscano tra loro tramite ponti a idrogeno attraverso le molecole d'acqua. La distanza media di questi legami di idrogeno è di 2,86 Å, compatibilmente con legami di idrogeno piuttosto deboli.

La forma II del colesterolo è stata proposta recentemente quale forma presente in calcoli biliari [5]. Anche di questa forma non risulta descritto lo spettro u.r. Un recente studio di raggi X [5] mostra come tale forma si differenzi da quella del colesterolo anidro soltanto per un allargamento delle distanze interplanari ed un aumento delle intensità di alcune linee dello spettro.

In fig. 1 vengono riportati gli spettri u.r. delle tre forme di colesterolo fra 4.000 e 2.500 cm^{-1} e vengono discussi relativamente alla regione delle oscillazioni di allungamento νOH fra 3600 e 3200 cm^{-1} .

Nello spettro del colesterolo anidro (fig. 1 A) compaiono due principali componenti a ~ 3435 (flesso) e a 3370 cm^{-1} .

Nello spettro del colesterolo monoidrato (fig. 1 B) sono presenti, invece, tre principali componenti a ~ 3495 (flesso), 3365 e a ~ 3230 (flesso) cm^{-1} , che emergono su un largo assorbimento di fondo.

Nello spettro del colesterolo forma II (fig. 1 C) si notano, infine, due componenti a ~ 3450 (flesso) e a 3375 cm^{-1} .

Al fine di dare una assegnazione a queste componenti, sono stati registrati gli spettri di soluzioni di colesterolo in CCl_4 a concentrazioni via via crescenti (fig. 2).

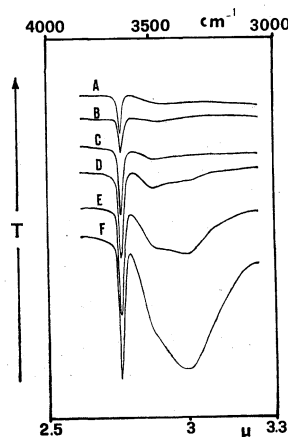


Fig. 2. — Spettri u.r. fra 4000 e 3000 cm^{-1} di soluzioni di colesterolo in CCl_4 : A) 0,015 M; B) 0,02 M; C) 0,04 M; D) 0,06 M; E) 0,10 M; F) 0,20 M.

Nello spettro della soluzione più diluita (fig. 2 A) compare una unica componente a 3620 cm^{-1} ; in quello della soluzione più concentrata (fig. 2 F) compaiono, oltre a questa componente, altre due, a 3480 (flesso) e a 3340 cm^{-1} . Quest'ultima aumenta di intensità al crescere della concentrazione del colesterolo nella soluzione.

Tale andamento si accorda con una precedente indagine vibrazionale su soluzioni anidre di colesterolo [10] e può essere opportunamente interpretato assegnando la componente a 3620 cm^{-1} alla vibrazione di allungamento νOH del monomero e le componenti a 3480 e a 3340 cm^{-1} alle vibrazioni di allungamento νOH di molecole di colesterolo associate sotto forma di aggregati di complessità via via crescente.

La presenza di componenti nell'intervallo $3495\text{--}3435$ (flesso) cm^{-1} e nell'intervallo $3375\text{--}3365\text{ cm}^{-1}$, negli spettri del colesterolo anidro, del colesterolo monoidrato e del colesterolo forma II, evidenzia la presenza di analoghi aggregati di colesterolo che interagiscono tramite ponti di idrogeno. Contemporaneamente l'assenza negli spettri di queste tre forme della componente a 3620 cm^{-1} conferma l'assenza di colesterolo in forma non associata.

La componente a 3230 cm^{-1} , che si nota soltanto nello spettro u.r. del colesterolo monoidrato, è associabile a vibrazioni di allungamento νOH di molecole di acqua presenti soltanto in questa forma di colesterolo.

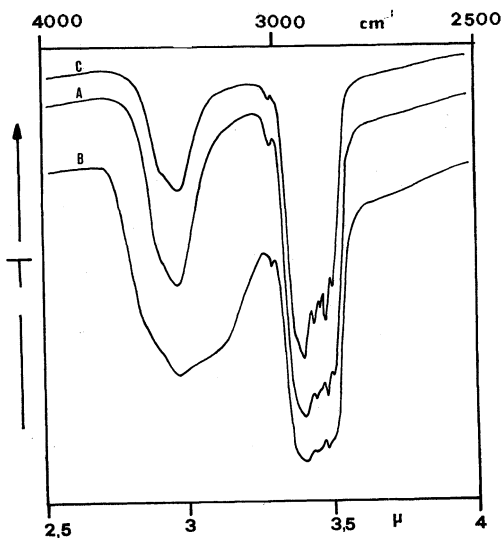


Fig. 3. - Spettri u.r. fra 4000 e 2500 cm^{-1} di A) Colesterolo anidro; B) Colesterolo monoidrato; C) Colesterolo monoidrato dopo esposizione all'aria per alcuni giorni.

Considerando che le vibrazioni di allungamento νOH nel ghiaccio cadono a $\sim 3200\text{ cm}^{-1}$ [19], ne deriva che l'acqua nel colesterolo monoidrato è sottoposta a legami ad idrogeno di « forza » confrontabile con quelli presenti nel ghiaccio.

La nostra indicazione spettroscopica conferma quanto osservato da uno studio di raggi X [18], che pure mostra una certa labilità delle interazioni di legame di idrogeno $\text{O—H}\cdots\text{O}$.

Tuttavia le molecole di acqua acquistano un ruolo assai importante nella struttura del colesterolo monoidrato, consistente nell'orientare i gruppi OH del colesterolo da parti opposte rispetto ad un piano e di « cementarli » con legami di idrogeno anche se di « forza » abbastanza debole.

È interessante osservare come il colesterolo monoidrato perda facilmente l'acqua e si trasformi in colesterolo anidro.

Abbiamo potuto verificare spettroscopicamente questo fenomeno, e in fig. 3 viene riportato lo spettro u.r. di un campione di colesterolo anidro (fig. 3 A), di un campione di colesterolo monoidrato (fig. 3 B) e di un campione di colesterolo monoidrato lasciato esposto all'aria per alcuni giorni (fig. 3 C).

Si può osservare come lo spettro del colesterolo monoidrato si trasformi in quello del colesterolo anidro.

Il risultato è compatibile con le indicazioni dello studio diffrattometrico [18], che mostra come l'acqua del colesterolo monoidrato possa migrare facilmente lungo una direzione preferenziale.

Ai fini del piano di ricerca programmato e riguardante l'indagine spettroscopica vibrazionale u.r. e Raman laser dei calcoli biliari, riteniamo che la caratterizzazione spettroscopica del colesterolo presente nei calcoli biliari secondo le forme ora discusse acquisti importanza ed interesse nello studio del meccanismo di formazione e solubilizzazione del calcolo.

È noto infatti come il colesterolo sia solubilizzato nella bile tramite combinazioni micellari di lecitina e sali biliari [20-23].

Uno studio di raggi X [24] ha mostrato come le associazioni di colesterolo e lecitina del sistema colesterolo-lecitina-acqua diano origine ad una fase lamellare, in cui molecole di colesterolo interagiscono alternativamente tramite legami idrofobi con molecole di lecitina formando strutture lamellari. Queste ultime si possono associare attraverso la parte idrofila delle molecole sia di lecitina, sia di colesterolo, con strati di molecole d'acqua.

I sali biliari agiscono competitivamente, interagendo tramite la parte idrofoba con il colesterolo e la lecitina nella realizzazione della struttura lamellare, e con la parte idrofila con l'acqua.

L'associazione colesterolo-lecitina-sali biliari-acqua provoca la solubilizzazione del colesterolo, però il meccanismo con cui tale solubilizzazione si realizza non è ancora del tutto noto.

Tuttavia è significativo osservare, a conclusione di questa Nota preliminare, come soltanto una delle forme di colesterolo possieda una struttura molto simile a quella lamellare sopra descritta. Questa forma è il colesterolo monoidrato, in cui le molecole di colesterolo si affacciano l'un l'altra con la parte idrofoba e dispongono i gruppi OH terminalmente per interagire con strati di molecole d'acqua.

L'importanza dell'acqua diventa allora quella di separare nella struttura del colesterolo monoidrato detti strati lamellari, caratterizzati da deboli legami idrofili.

Inoltre, poiché si è visto che l'acqua di separazione tra strati lamellari di colesterolo è piuttosto mobile, ciò può suggerire una facile compenetrazione fra le lamelle di colesterolo di molecole di sali biliari e di lecitina, che si dispongono affacciandosi per la parte idrofoba alle molecole di colesterolo

e indirizzando i gruppi idrofili verso gli strati d'acqua, e può indicare il meccanismo di solubilizzazione del colesterolo.

Significativo diventa allora il risultato di questa Nota preliminare, che mostra come le proprietà di composti di interesse biologico siano associabili alla particolare struttura dell'acqua in essi legata.

Gli Autori ringraziano il prof. G. B. Bonino per i suggerimenti e le discussioni riguardo alla programmazione di questo piano di ricerca, e il prof. G. Semerano direttore dell'Istituto di Chimica Generale «G. Ciamician» per le apparecchiature gentilmente messe a disposizione.

BIBLIOGRAFIA

- [1] H. BOGREN e K. LARSSON (1963) - « Biochim. Biophys. Acta », 75, 65.
- [2] D. M. SMALL e G. G. SHIPLEY (1974) - « Science », 185, 222.
- [3] M. SPECTOR, E. N. KROKOWSKY, M. SAX e J. PLETCHER (1969) - « Science », 165, 711.
- [4] R. P. COOK (1958) - *Cholesterol*, Academic Press, Londra.
- [5] D. J. SUTOR e P. J. GASTON (1972) - « Gut. », 13, 64.
- [6] T. R. HOLMAN e R. E. PAGE (1956) - « Anal. Chem. », 28, 1533.
- [7] J. A. LABARRÈRE, J. R. CHIPAULT e W. O. LUNDBERG (1958) - « Anal. Chem. », 30, 1466.
- [8] S. H. WEINMAN, J. WEINMAN e L. HENRY (1959) - « Bull. Soc. Chim. Biol. », 41, 777.
- [9] J. WEINMAN (1967) - « Bull. Soc. Chim. Fr. », 11, 4259.
- [10] F. S. PARKER e K. R. BHASKAR (1968) - « Biochemistry », 7, 1286.
- [11] N. YU. LEVCHUK (1968) - « Zh. Prikl. Spektrosk. », 9, 663.
- [12] L. JORIS, P. VON RAGUE SCHLEYER e E. OSAWA, (1968) - « Tetrahedron », 24B, 4759.
- [13] N. YU. LEVCHUK, V. G. KOVAL e I. F. TSYMBAL (1971) - « Zh. Prikl. Spektrosk. », 14, 735.
- [14] S. CRAVEN (1972) - « Appl. Spectr. », 26, 242.
- [15] V. G. KOVAL, (1974) - « Zh. Prikl. Spektrosk. », 20, 1110.
- [16] A. BERNAL e E. FANKUCHEN (1940) - « Trans. Roy. Soc., London », 239, 135.
- [17] Ref. DEWOLFF - « Tech. Phys. Dienst. Delft. », Holland.
- [18] B. M. CRAVEN (1976) - « Nature », 260, 727.
- [19] B. EISENBERG e W. KAUFMANN, (1969) - *The structure and properties of water*, at the Clarendon Press.
- [20] D. H. NEIDERHISER e H. P. ROTH (1969) - « J. Lab. Clin. Med. », 74, 993.
- [21] A. F. HOFMANN (1965) - « Gastroenterology », 48, 484.
- [22] D. R. SAUNDERS e M. A. WELLS (1969) - « Biochim. Biophys. Acta », 176, 828.
- [23] D. H. NEIDERHISER e H. P. ROTH (1972) - « Biochim. Biophys. Acta », 270, 407.
- [24] H. LECUYER e D. G. DEVICHIAN (1967) - « J. Mol. Biol. », 45, 39.