

FISIOPATOLOGIA

# LE CERAMIDI COME ATTORI EMERGENTI NELLA MALATTIA CARDIOVASCOLARE

## Ceramides as emerging players in cardiovascular disease

**RICCARDO SPAGGIARI<sup>1\*</sup>, SHARON ANGELINI<sup>1\*</sup>, FABIOLA CASTALDO<sup>1</sup>, JUANA MARIA SANZ<sup>2</sup>, DOMENICO SERGI<sup>1\*</sup>, ANGELINA PASSARO<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup>Dipartimento di Medicina Traslazionale e per la Romagna, Università degli Studi di Ferrara;

<sup>2</sup>Dipartimento di Scienze Chimiche, Farmaceutiche ed Agrarie, Università degli Studi di Ferrara

\*Gli Autori RS, SA, DS e AP hanno fornito il medesimo contributo al lavoro

### SUMMARY

An aberrant circulating lipid profile plays a pivotal role in the development and progression of cardiovascular diseases (CVD). Defective lipid metabolism also results in an impairment in ceramide homeostasis, with these sphingolipids accumulating in metabolically active tissues, such as the skeletal muscle, as well as the atherosclerotic plaques. In this regard, ceramides, and particularly ceramides C16:0, C18:0 e C24:1, are emerging as putative players in the pathogenesis of atherosclerotic disease as well as novel biomarkers able to predict cardiovascular risk. Beside these ceramide species, ceramide C24:0 has also been associated with CVD risk but its role in this context remains controversial. The aim of this narrative review is to provide an updated overview on the pathophysiological role of ceramides in the development and progression of CVD and dissect the implication of specific ceramide species as potential independent predictors of cardiovascular risk. Additionally, this manuscript will elucidate whether ceramide metabolism may be modulated through dietary interventions as a strategy to lower CVD risk.

**Key words:** *Ceramides – cardiovascular risk, MACE, high fat diet, PUFA.*

### Cenni di fisiopatologia

Le ceramidi rappresentano una sottoclasse di sfingolipidi caratterizzati da una molecola di sfingosina legata ad un acido grasso di lun-

ghezza variabile. Questi sfingolipidi sono sintetizzati attraverso tre vie metaboliche:

- 1) la sintesi “de novo” mediante l'intervento degli enzimi serina-palmitoil-transferasi (SPT) e ceramide-sintasi (CerS);

---

#### Indirizzi per la corrispondenza

Angelina Passaro

[angelina.passaro@unife.it](mailto:angelina.passaro@unife.it)

Domenico Sergi

[domenico.sergi@unife.it](mailto:domenico.sergi@unife.it)

- 2) la via dell'idrolisi della sfingomielina catalizzata dalle sfingomielinasi (SMase);
- 3) la "via di recupero" o salvage pathway (1-3).

Le ceramidi sono lipidi bioattivi come sottolineato dal loro coinvolgimento in diversi processi fisiologici che vanno oltre il loro ruolo strutturale. Infatti, non solo sono componenti della membrana plasmatica e mitocondriale, dove influenzano l'espressione recettoriale e la stabilità (4) ma sono anche in grado di modulare diversi processi fisiopatologici inclusa la proliferazione e differenziamento cellulare e l'apoptosi (5, 6). Il ruolo delle ceramidi come molecole bioattive è anche dimostrato dal loro impatto sulla salute cardio-metabolica. A tal proposito, diverse sottoclassi di ceramidi sono state implicate nello sviluppo di malattie cardiovascolari (cardiovascular disease, CVD) e/o di diabete di tipo 2 (type 2 diabetes, T2D), nonché come nuovi biomarcatori capaci di predire le suddette patologie (7, 8).

Le patologie cardiovascolari sono tra le principali cause di morte nel mondo (9) e il loro andamento epidemiologico è strettamente legato all'epidemia di obesità che a livello mondiale affligge sia i paesi sviluppati che quelli in via di sviluppo (9). L'incremento esponenziale del tasso di obesità e delle sue comorbidità, incluse le patologie cardiovascolari, a livello globale è una diretta conseguenza di uno stile di vita tipicamente occidentale e caratterizzato da inattività fisica e abitudini alimentari scorrette. In particolare, un'alimentazione sbilanciata e basata sul consumo di cibi ultra-processati, tipica della dieta occidentale, unita alla sedentarietà favorisce l'incremento di peso e il deterioramento della salute cardio-metabolica sottolineato dall'alterazione del metabolismo glucidico e lipidico. Nello specifico, l'alterazione dell'omeostasi dei lipidi circolanti ha un ruolo cardine nello sviluppo della malattia aterosclerotica nella cui patogenesi il colesterolo associato alle LDL (low density lipoprotein cholesterol, LDL-C), risulta un fattore chiave, oltre ad essere un fundamenta-

le biomarcatore della salute cardiovascolare utilizzato a livello clinico.

Ciò nonostante, le alterazioni metaboliche a carico del metabolismo lipidico e cruciali nello sviluppo delle CVD sembrano impattare anche sull'omeostasi delle ceramidi. Infatti, queste ultime stanno emergendo come potenziali nuovi biomarcatori del rischio cardiometabolico (10, 11).

Questa revisione narrativa della letteratura punta a fornire un aggiornamento sul ruolo delle ceramidi come marcatori o attori nello sviluppo di malattia cardiovascolare, oltre a chiarire come l'alimentazione possa modularne i livelli, sia nel sangue che nei tessuti.

### **Il ruolo delle ceramidi nella malattia aterosclerotica**

Tra i fattori metabolici e mediatori infiammatori coinvolti nel processo aterosclerotico, il principale rimane il LDL-C. Ciononostante le ceramidi sono state delineate come ulteriori fattori indipendenti in grado di predire lo sviluppo di CVD, specie alcune sottoclassi quali C16:0, C18:0 e C24:0 (12, 13). A ulteriore conferma di ciò, l'inclusione delle ceramidi in un modello di stratificazione del rischio, contenente altri fattori di rischio tradizionali, tra cui proteina C reattiva, ha incrementato la capacità predittiva nei confronti di CVD (14). Tali lipidi sono rilevabili, non soltanto nel sangue, ma in diversi fluidi biologici, compreso il liquido cerebrospinale e sinoviale, e pertanto di interesse come possibili biomarcatori di malattia, non solo nell'ambito delle CVD (15), ma anche in altre patologie, tra cui demenza e cancro (16). Gli effetti biologici delle singole sottoclassi, però, rimangono oggetto di studio con opinioni in letteratura sono spesso discordanti. Ad esempio, l'incremento dei livelli delle ceramidi C16:0, C18:0 e C24:1 e viceversa la riduzione dei livelli della ceramide C24:0 sono stati associati a mortalità cardiovascolare e eventi cardiovascolari avversi (major adverse

cardiovascular events, MACE) (15, 17, 18) o ad insorgenza di coronaropatia nel paziente diabetico (19). Le ceramidi stanno emergendo come utili nello sviluppo di nuovi score per la stratificazione prognostica degli outcomes cardiovascolari, analogamente a quanto accade per il LDL-C (10). Un esempio deriva

**Tabella 1** - Associazione tra rischio cardiovascolare, specifiche ceramidi e i loro rapporti.

Ceramide	Associazione descritta
C14:0	Epatosteatosi nell'adolescenza (34)
C16:0	Disfunzione endoteliale (23), scompenso cardiaco (21, 39), MACE (17, 24), coronaropatia in diabete tipo 2 (19), vulnerabilità di placca (24, 32) e mortalità (15, 24)
C18:0	Scompenso cardiaco (21, 39), MACE (17, 24), coronaropatia in diabete tipo 2 (19), vulnerabilità di placca (24, 32) e mortalità (15, 24)
C20:0	Scompenso cardiaco (21, 39)
C20:1	Scompenso cardiaco (21, 39)
C22:1	Scompenso cardiaco (21, 39)
C24:0	Disfunzione endoteliale (23) tuttavia inversamente associata ad età avanzata/tabagismo (30), scompenso cardiaco (21, 39), MACE (17), vulnerabilità di placca (32) e morte cardiovascolare (15)
C24:1	Scompenso cardiaco (21, 39), MACE (17, 24), coronaropatia in diabete tipo 2 (19), vulnerabilità di placca (24, 32) e mortalità (15, 24)
Rapporto	Associazione descritta
C16:0/C24:0	Mortalità in pazienti coronaropatici (16) e incidenza di malattia cardiovascolare (38, 15)
C18:0/C24:0	Mortalità in pazienti coronaropatici (16) e incidenza di malattia cardiovascolare (38, 15)
C24:1/C24:0	Disfunzione endoteliale (23), mortalità in pazienti coronaropatici (16) ed incidenza di malattia cardiovascolare (38, 15)
C24:0/C16:0	Associazione inversa con età avanzata/tabagismo(30), progressione di scompenso cardiaco e morte (21)

MACE = eventi cardiovascolari avversi ("Major Adverse Cardiovascular Events"). Tabella adattata da (11).

dal Coronary Event Risk Test, che si è dimostrato capace di stratificare in modo affidabile i MACE nei pazienti con patologia coronarica stabile, basandosi sulle ceramidi e i loro rapporti derivati (20). Inoltre, la ceramide C16:0 è risultata essere associata positivamente all'insorgenza di scompenso cardiaco nel trial PREDIMED (21). Sono emerse inoltre evidenze discordanti sulla ceramide C24:0 in quanto, mentre alcune evidenze supportano una sua associazione positiva con la disfunzione endoteliale ed l'infarto miocardico (22), altre suggeriscono che questa ceramide è negativamente associata alla mortalità cardiovascolare (Tabella 1) (19, 22-34).

A livello fisiopatologico le ceramidi appaiono direttamente coinvolte nell'aterosclerosi, grazie alla loro capacità di attivare risposte pro-infiammatorie e promuovere disfunzione endoteliale. Inoltre, questi sfingolipidi sono stati identificati all'interno della placca ateromastica ove agiscono da facilitatori per l'internalizzazione del C-LDL ossidato nella tonaca intima (7) e ne favoriscono l'aggregazione (35). In aggiunta, sembrano essere capaci di influenzare l'attività dell'inflammasoma NLRP3 (nucleotide-binding oligomerization domain, leucine-rich repeat-containing protein 3) promuovendo la sintesi di citochine infiammatorie (36) oltre che determinare disfunzione endoteliale, interferendo con la produzione di ossido nitrico da parte dell'endotelio stesso e favorendo lo sviluppo di agenti ossidanti (37) (Figura 1).

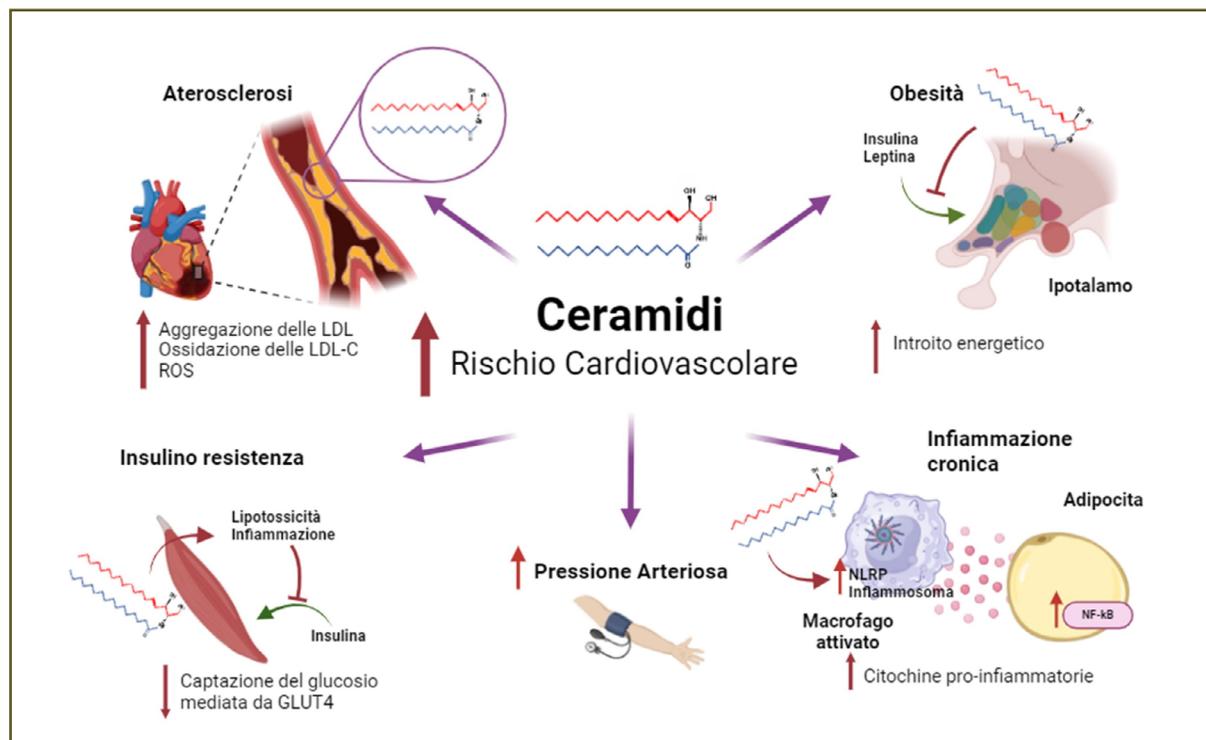
Per ottimizzare il loro valore predittivo nei confronti di CVD, oltre a prendere in considerazione esclusivamente i livelli di ceramidi circolanti, sono stati elaborati anche dei rapporti tra le diverse sottoclassi. Nello specifico, i rapporti tra la ceramidi C18:0/C24:0 o C16:0/C24:0 sono stati associati sia a patologie metaboliche, come nel caso del T2D, sia all'incidenza di patologie aterosclerotiche (Tabella 1, Figura 1) (15, 19, 22, 25-34, 38). Invece il rapporto inverso (ceramidi C24:0/C16:0) appare inversamente correlato con la disfunzione ventrico-

lare ed il rischio di sviluppare scompenso cardiaco (39).

Le ceramidi appaiono rilevanti anche nella patogenesi dell'ipertensione arteriosa, l'obesità e il T2D, tutti fattori di rischio per le malattie cardiovascolari (Figura 1). È stato osservato, infatti, come i pazienti ipertesi presentino incrementate ceramidi circolanti che rientrano nei range quando sono correttamente trattati con terapia antipertensiva (7). Analogamente, in uno studio su modelli murini di Spijkers et al. (40), è stata descritta una concentrazione più elevata di ceramidi all'interno delle carotidi di topi ipertesi rispetto ai normotesi. A ulteriore supporto di ciò, l'inibizione della SPT ed il conseguente calo dei valori delle ceramidi C16:0, C24:1 e C24:0 nel cardiomiocita sembra

limitare la progressione a scompenso cardiaco, una possibile complicanza dell'ipertensione arteriosa (41) (Figura 1).

Quanto al ruolo delle ceramidi nella patogenesi dell'obesità, questi sfingolipidi, perlomeno su modelli animali, sembrerebbero impattare sul controllo dell'omeostasi energetica da parte dell'ipotalamo promuovendo un bilancio energetico positivo e favorendo quindi l'incremento ponderale (Figura 1). In modelli murini la somministrazione di ceramidi a livello intracerebroventricolare, si traduce in un accumulo della ceramide C16:0 a livello ipotalamico con conseguente attivazione di risposte infiammatorie locali, ridotto dispendio energetico ed incremento ponderale (42). L'incremento dei livelli delle ceramidi a livello ipotalamico sembra in-



**Figura 1** - L'impatto delle ceramidi sul rischio cardiovascolare. Potenziali meccanismi attraverso cui le ceramidi influenzano il rischio cardiovascolare. LDL, lipoproteine a bassa densità; ROS, specie reattive dell'ossigeno; GLUT4, trasportatore di glucosio-4; NLRP, dominio di oligomerizzazione legante i nucleotidi, ricco di residui di leucina e contenente un dominio di pirina; NF- $\kappa$  $\beta$ , fattore-nucleare-kappa-beta. Questa figura è stata creata utilizzando BioRender.com e adattata da (11).

terferire con i segnali ormonali coinvolti nell'omeostasi di fame e sazietà, essendo implicati nel promuovere gli effetti oressizzanti della grelina e nell'inibire gli effetti anoressizzanti espletati dalla leptina (43). Sempre in modelli animali, è stata dimostrata la capacità di un regime dietetico iperlipidico di promuovere l'accumulo di ceramidi a livello ipotalamico, suggerendo che questi sfingolipidi possano rappresentare dei mediatori degli effetti obesogeni promossi da diete iperlipidiche (44, 45).

Tale disfunzione ipotalamica indotta dall'aumento dei livelli di ceramidi, sembra avere un effetto anche in termini di metabolismo glucidico; infatti, l'inibizione della sintesi delle ceramidi all'interno dell'ipotalamo è risultato in un miglioramento della sensibilità insulinica e dell'omeostasi del glucosio a livello periferico (46). Non stupisce quindi un possibile coinvolgimento di questi lipidi nello sviluppo del T2D. Infatti, la lipotossicità, definita, tra l'altro, come il deposito di lipidi in sedi ectopiche, ha sicuramente un ruolo importante nello sviluppo dell'insulino resistenza e del T2D (47). In particolare, l'accumulo di ceramidi a livello muscolare rappresenta un fattore chiave nello sviluppo di insulino resistenza (*Figura 1*) (48, 49). Nel muscolo, le ceramidi riducono la capacità dell'insulina di promuovere l'assorbimento di glucosio, sia inibendo la traslocazione insulino-dipendente del trasportatore GLUT4 (glucose transporter type 4), sia alterando la fosforilazione della proteina chinasi B (AKT), enzima chiave nella via di trasduzione del segnale insulinico, determinando quindi insulino-resistenza (50). L'accumulo di questi sfingolipidi impatta negativamente sulla sensibilità insulinica a livello muscolare tramite l'attivazione della forma atipica della proteina chinasi C (PKC $\zeta$ ), della proteina fosfatasi 2A, della via della protein-chinasi-R/c-Jun N- chinasi terminale (51) e della Pbx-reculation-protein-1/p160 (52). A conferma di ciò, in alcuni modelli murini obesi è stato dimostrato che inibendone la sintesi, si osservava un miglioramento della sensibilità insulinica (53).

Le principali ceramidi imputate risultano ancora una volta essere C18:0 e C16:0, seppur quale delle due rivesta un ruolo preponderante rimane ancora oggetto di discussione anche nell'uomo (25, 54). Ad esempio, più alti livelli di ceramide C18:0 sono stati rilevati nel muscolo scheletrico di volontari obesi e con T2D, a parità di ceramidi totali (26) mentre la sintesi de novo di ceramide C16:0 a livello del tessuto adiposo sembra il principale driver di resistenza insulinica (27).

Pertanto, alcune classi di ceramidi non solo sono coinvolte direttamente o indirettamente nella patogenesi di CVD, ma risultano anche dei biomarcatori di notevole interesse per migliorare la nostra capacità di stratificazione del rischio cardiovascolare.

### **Effetto della qualità degli acidi grassi sull'omeostasi delle ceramidi**

La dieta svolge un ruolo chiave nello sviluppo delle malattie cardiovascolari e pertanto non sorprende il coinvolgimento della dieta nella regolazione dell'omeostasi delle ceramidi.

Alcuni nutrienti sono noti per la loro capacità di promuovere la sintesi e l'accumulo delle ceramidi sia in circolo che nei tessuti, altri invece per ridurne i livelli. Tra i nutrienti in questione, i lipidi giocano un ruolo cruciale. Infatti, gli acidi grassi costituiscono il componente principale dello scheletro degli sfingolipidi, e sono anche in grado di modulare la sintesi delle ceramidi. Dunque non sorprende che in modelli animali il consumo di una dieta iperlipidica ricca di acidi grassi saturi a catena lunga (LCSFA) induca l'aumento delle ceramidi circolanti e tissutali (55-59). In particolare, in topi nutriti con una dieta iperlipidica è stato evidenziato un incremento dei livelli delle ceramidi C16:0 e C22:0 nel fegato (55, 56) e della ceramide C18:0 nel muscolo scheletrico (57-59). Alla base del legame tra una dieta iperlipidica ricca di acidi grassi saturi (SFA) e l'accumulo di ceramidi vi è il ruolo degli acidi grassi come substrato ne-

cessario per la sintesi delle ceramidi stesse (60). Tra questi, l'acido palmitico rappresenta uno dei principali componenti della dieta iperlipidica nonché precursore della sintesi de novo delle ceramidi. In aggiunta, la dieta iperlipidica è anche coinvolta nella regolazione degli enzimi chiave di questi processi anabolici, come SPT (61) e CerS (62). L'aumento dell'espressione degli enzimi coinvolti nella sintesi delle ceramidi non avviene senza conseguenze. A tal proposito, in modelli murini con steatosi epatica e sottoposti ad una dieta iperlipidica è stato osservato un aumento dello stress del reticolo endoplasmatico probabilmente esacerbato dalla concomitante upregolazione di CerS6 (63), enzima coinvolto nella sintesi della ceramide C16:0, a sua volta associata a mortalità cardiovascolare (25). Al contrario, le ceramidi a catena lunga, come le ceramidi C22:0 e C24:0, specie se presenti in proporzioni maggiori rispetto a ceramidi a catena più corta come la C16:0, sono state inversamente associate al rischio di malattia coronarica (30). Le diete iperlipidiche, inoltre, inducono un aumento di sfingomieline nel fegato, e questo potrebbe rappresentare un ulteriore meccanismo attraverso il quale l'eccessivo consumo di SFA contribuisce all'accumulo di ceramidi (Figura 2). A tal proposito, l'aumento della sintesi de novo di sfingomieline si riflette anche in un incremento di questa categoria di sfingolipidi all'interno delle lipoproteine VLDL e LDL, dove fungono da substrato per la sfingomielinasi associata alle LDL. L'arricchimento in sfingomieline delle VLDL e LDL alimenta quindi la sintesi di ceramidi all'interno delle lipoproteine stesse, potenziandone l'aggregabilità e la suscettibilità all'ossidazione (64). La disfunzione e ridotta capacità ossidativa dei mitocondri potrebbe rappresentare un ulteriore anello di congiunzione tra diete iperlipidiche e l'aumento delle ceramidi, sia circolanti che tissutali. Infatti, il sovraccarico energetico ed in particolare di SFA sembrerebbe promuovere inflessibilità metabolica e ridurre la capacità ossidativa dei mitocondri (65)

compromettendo processi catabolici come la beta-ossidazione (66) e pertanto determinando una aumentata biodisponibilità degli acidi grassi, come l'acido palmitico che, invece di essere diretto verso la beta-ossidazione, funge da substrato per vie anaboliche, inclusa la sintesi di nuove ceramidi (47).

Tuttavia, la capacità delle diete iperlipidiche di promuovere la sintesi delle ceramidi appare anche influenzata dalla tipologia degli acidi grassi consumati. Infatti, una dieta iperlipidica arricchita di SFA, contrariamente a quanto accade nel caso di regimi iperlipidici arricchiti con acidi grassi insaturi (67-70), aumenta significativamente il contenuto di ceramidi nei cardiomiociti e nel muscolo scheletrico di modelli murini (71).

Anche la lunghezza degli acidi grassi che costituiscono i trigliceridi introdotti con la dieta gioca un ruolo nella sintesi de novo delle ceramidi nonché nell'idrolisi delle sfingomieline. A tal proposito, contrariamente a quanto accade con le tipiche diete iperlipidiche arricchite in lardo, una dieta arricchita di trigliceridi costituiti da acidi grassi a media catena (MCSFA) ha ridotto l'espressione di CerS6 e sfingomielina fosfodiesterasi 3, enzimi implicati nella sintesi delle ceramidi (72). Viceversa, incrementando l'introito di LCSFA rispetto a MCSFA in una dieta obesogena, si osserva un aumento dell'epatosteatosi e dell'infiammazione (73). Da un punto di vista meccanicistico, la capacità di MCSFA di contrastare l'accumulo di ceramidi sembrerebbe legata al loro impatto positivo sul metabolismo ossidativo. I MCSFA sono infatti in grado di aumentare il rapporto tra adenosina monofosfato e adenosina trifosfato, con conseguente attivazione della proteina chinasi attivata dall'adenosina monofosfato (AMPK), che si traduce nell'inibizione dei processi anabolici, compresa la sintesi di ceramidi, e l'attivazione di pathway catabolici, inclusa la beta-ossidazione (72).

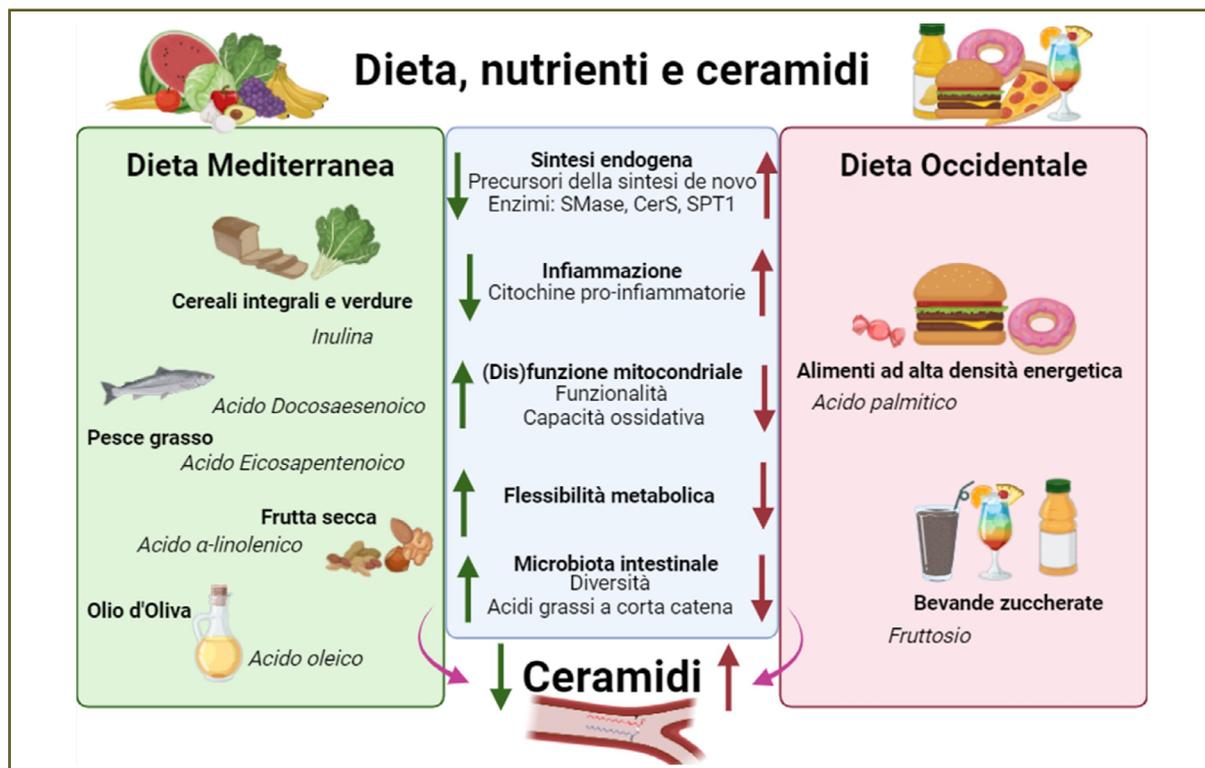
Pertanto, i lipidi, ed in particolare i LCSFA, sembrano influenzare i livelli di ceramidi circolanti e tissutali, tuttavia questa relazione ben evi-

denziata nei modelli animali è ancora dibattuta in ambito clinico. Ad esempio, uno studio trasversale con 2860 partecipanti ha mostrato che l'assunzione di SFA era direttamente associata a concentrazioni più elevate di sfingolipidi 16:1;O2 circolanti, incluse le ceramidi e loro derivati (sfingomieline e sfingosina 1-fosfati) (74), mentre uno studio su undici soggetti con T2D, ha mostrato che l'aderenza ad una dieta iperlipidica isocalorica per 3 settimane, rispetto a una dieta ricca di carboidrati, non è in grado di modificare i livelli di ceramide nel tessuto muscolare e la sensibilità all'insulina (75). L'incapacità della dieta ricca di grassi di aumentare i livelli di ceramide nel muscolo scheletrico potrebbe dipendere dall'aumento dei livelli di adiponectina in risposta a questo regime dietetico e dal fatto che le diete utilizzate in questo studio erano isocaloriche (75). Sorprendentemente, infatti, in questo studio i livelli di adiponectina sono risultati aumentati dopo 3 settimane di sovralimentazione lipidica e, poiché l'adiponectina rappresenta un'adipochina in grado di stimolare l'ossidazione degli acidi grassi, la biogenesi mitocondriale e il catabolismo delle ceramidi, il suo aumento potrebbe rappresentare un meccanismo compensatorio innescato dall'aumentata assunzione di grassi (75). Quando si considerano studi sull'uomo, ci sono altri fattori oltre alla dieta che possono influenzare l'omeostasi delle ceramidi. Tra questi, la dimensione e la posizione delle gocce lipidiche intramuscolari può influire sulla capacità delle diete iperlipidiche di indurre l'accumulo di ceramidi nel muscolo scheletrico umano. In effetti, è stato dimostrato che il numero di goccioline lipidiche intramuscolari piccole e distribuite nel tessuto muscolare a livello periferico è associata a una maggiore efficienza di ossidazione dei lipidi in risposta ad una dieta iperlipidica. Ciò comporta un ridotto accumulo di precursori per la sintesi della ceramidi, nonché un miglioramento della sensibilità all'insulina (76).

Come già descritto, soprattutto nei modelli animali, i LCSFA sembrano essere i principali mediatori della sintesi delle ceramidi, specie se

forniti con regimi dietetici ipercalorici. Al contrario, altri tipi di acidi grassi, come gli acidi grassi polinsaturi (PUFA) e monoinsaturi, non sembrano agire come promotori della sintesi delle ceramidi ma piuttosto, in alcuni casi, contrastare l'accumulo di ceramidi indotto dai LCSFA (67-70). In particolare, il consumo di olio di pesce ha ridotto specifiche sottoclassi di ceramidi plasmatiche (C16:0, C22:0, C24:0 e C26:0) e abbassato la pressione sanguigna e il trombossano circolante, migliorando così la funzione endoteliale (67) (*Figura 2*). Tuttavia, la supplementazione di olio di pesce ricco in acidi grassi  $\omega$ -3 ha anche aumentato i glucosilceramidi C20:0 e C24:1 (67). Effetti simili sono stati osservati anche nei tessuti, in particolare nel muscolo scheletrico murino, dove gli  $\omega$ -3 hanno attenuato l'aumento della ceramide C18:0 indotto da una dieta iperlipidica arricchita con LCSFA, nonostante non siano state rilevate variazioni nel peso corporeo o nei livelli di triacilgliceroli tra i gruppi analizzati (68, 69). Allo stesso modo, nel fegato gli  $\omega$ -3 PUFA dall'olio di pesce hanno contrastato l'accumulo di ceramidi indotto da una dieta ricca di grassi e zuccheri (70). Anche in questo caso, l'effetto degli  $\omega$ -3 PUFA sui livelli circolanti di ceramidi e l'accumulo nei tessuti sembra essere influenzato dalla loro qualità e dalla fonte. Ad esempio, nei topi, il consumo di olio di Krill è stato più efficace dell'olio di pesce nel ridurre il contenuto epatico di ceramidi (77). Questo effetto è in accordo con l'ipotesi che l'olio di Krill abbia un effetto antinfiammatorio più potente rispetto all'olio di pesce (77) e potrebbe essere in grado di ridurre i livelli di citochine proinfiammatorie, riducendo così l'attivazione di SMase (77) (*Figura 2*).

Tra i PUFA, l'acido docosaesaenoico (DHA) ed eicosapentaenoico (EPA) sono di particolare interesse per la loro capacità di regolare i livelli e la sintesi delle ceramidi. In modelli murini, la supplementazione di DHA e EPA è stata dimostrata influenzare la concentrazione e la qualità delle ceramidi totali, in particolare riducendo le specie sature e aumentando quelle



**Figura 2** - L'impatto di pattern dietetici e dei nutrienti sul metabolismo delle ceramidi. Il diverso effetto della Dieta Mediterranea comparata alla dieta occidentale, inclusi specifici nutrienti, sulla regolazione dei meccanismi che sostengono all'omeostasi delle ceramidi. CerS, ceramide sintasi; SMase, sfingomielinasi; SPT1, serina-palmitoil-transferasi-1. Questa figura è stata creata utilizzando BioRender.com e adattata da (11).

insature come C24:1 nel tessuto adiposo e nel tessuto scheletrico muscolare, contribuendo a una miglior sensibilità insulinica e a una riduzione delle citochine infiammatorie (78). Anche negli studi sull'uomo, gli  $\omega$ -3 PUFA del pesce sono stati in grado di diminuire il livello delle ceramidi circolanti, come osservato in uno studio pilota condotto su pazienti affetti da coronaropatia, mentre il consumo di pesce magro, povero in questi acidi grassi, non ha avuto tale effetto (79). Altri acidi grassi insaturi, come l'acido oleico, sono stati implicati nel contrastare l'effetto degli SFA sulla sintesi delle ceramidi. In un'analisi del lipidoma condotta su un gruppo di donne, in cui si comparava una dieta ricca di acido palmitico con una ricca di acido oleico, è stato dimostrato che, mentre la

prima ha promosso una maggiore adiposità e insulino-resistenza, la seconda ha portato a una riduzione dei livelli di ceramide, sia circolanti che nel tessuto muscolare (80). Dato il potenziale anti-infiammatorio dell'acido oleico, è possibile che la riduzione dei livelli di ceramidi sia attribuibile, almeno in parte, alla sua capacità di abbassare i livelli di citochine pro-infiammatorie, note per promuovere l'attivazione degli enzimi coinvolti nella sintesi di ceramide (80).

### Regolazione del metabolismo delle ceramidi attraverso diversi regimi dietetici

Non soltanto i lipidi sembrano in grado di influenzare la produzione delle ceramidi, ma

anche gli zuccheri, in particolare il fruttosio. La somministrazione di fruttosio liquido nei topi ha incrementato i livelli di ceramidi nel fegato, determinato iperleptinemia e resistenza alla leptina del fegato stesso, probabilmente causata dall'attivazione della fosfatasi 2A per azione della ceramide (81). La capacità del fruttosio di promuovere l'accumulo epatico di ceramidi potrebbe dipendere dal suo impatto negativo sul microbiota intestinale, tale effetto infatti risulta attenuato quando somministrato in contemporanea con antibiotici (82).

Il microbiota intestinale può rappresentare un ulteriore fattore che lega dieta, metabolismo lipidico e salute metabolica. Infatti, in uno studio clinico su volontari sani è stato dimostrato che l'assunzione di inulina e acidi grassi  $\omega$ -3 ha ridotto la ratio dei livelli di ceramidi circolanti C16:0/C24:0 legate a CVD. Questo effetto può essere dovuto all'attività prebiotica di inulina e acidi grassi  $\omega$ -3 (83). In un altro studio interventistico è stato dimostrato che una dieta ipocalorica arricchita con fibre solubili, elevato apporto proteico e carboidrati a basso indice glicemico, può aumentare la diversità genica nel microbiota, che, a sua volta, è inversamente correlata ai livelli di ceramidi circolanti, in particolare C18:1 (84).

Oltre che dai singoli nutrienti, i livelli delle ceramidi possono anche essere modulati da diversi regimi dietetici. La dieta occidentale contiene nutrienti in grado di favorire la sintesi delle ceramidi, ovvero LCSFA e fruttosio, mentre ciò non è vero per la dieta mediterranea. Quest'ultima, infatti, è caratterizzata da un ridotto introito di cibi ultra processati, LCSFA, e zuccheri raffinati, e da un'elevata quantità di fibre, acidi grassi insaturi, come  $\omega$ -3 PUFAs e acidi grassi monoinsaturi, ma anche polifenoli, i quali è stato dimostrato migliorino la salute cardiometabolica (85).

La dieta chetogenica rappresenta un ulteriore approccio nutrizionale in grado potenzialmente di modulare l'omeostasi delle ceramidi. Infatti, in modelli murini, la dieta chetogenica,

down-regolava CerS6 mentre up-regolava CerS2, un effetto che ha prevenuto l'accumulo di ceramidi a lunga catena potenzialmente dannose (C16:0 e C18:0), mentre ha incrementato l'accumulo delle ceramidi a lunghissima catena che espletano effetti metabolicamente protettivi a livello epatico (86). Analogamente alla dieta chetogenica, la restrizione calorica è capace di diminuire il contenuto epatico delle ceramidi seppur tali effetti sembrano essere tessuto-specifici: ad esempio, la restrizione calorica non ha influenzato i livelli complessivi delle ceramidi nel miocardio dei topi, seppur riducendo le ceramidi C20:0 e C22:0 con una conseguente attenuazione della lipotossicità miocardica (87).

La dieta può quindi svolgere un ruolo importante nel modellare l'omeostasi delle ceramidi, ma le evidenze sulla capacità dei diversi regimi dietetici di modulare i livelli e il tipo di ceramidi circolanti rimangono scarse, soprattutto in ambito clinico. Resta pertanto da chiarire se l'effetto della dieta sulla salute cardiovascolare sia effettivamente mediata dalla modulazione del metabolismo delle ceramidi.

## Conclusioni

Le ceramidi sono fattrici patogenetiche emergenti nello sviluppo dell'aterosclerosi, anche in considerazione del loro ruolo nell'obesità e nell'insulino-resistenza e della loro capacità di attivare risposte pro-infiammatorie (11). La loro capacità di predire gli eventi cardiovascolari, le rende un papabile ed innovativo biomarcatore clinico per una miglior stratificazione del rischio cardiovascolare individuale. Tuttavia, questo potere predittivo appare specifico per le ceramidi C16:0, C18:0 e C24:1, anche indipendentemente da altri fattori di rischio (10, 88). L'alimentazione appare in grado di influenzare l'omeostasi delle ceramidi. Di fatto, gli stessi regimi dietetici e fattori nutrizionali generalmente associati ad un aumentato rischio cardiovascolare, quali i LCSFA, il fruttosio o la

dieta occidentale, vanno anche a promuovere la sintesi delle ceramidi, sia in modelli animali che nell'uomo. Viceversa, i nutrienti che sono associati ad una riduzione del rischio, quali gli  $\omega$ -3 PUFA, ne riducono la sintesi, seppur tale effetto sia descritto principalmente su modelli animali. Rimane tuttavia da chiarire se le ceramidi possano essere considerate un target nutrizionale per migliorare la salute cardiometabolica. Alla luce di queste osservazioni, futuri

studi saranno necessari per definire se appositi interventi nutrizionali possano modulare direttamente, a livello ematico e tissutale, l'omeostasi delle ceramidi determinando di conseguenza un effettivo beneficio clinico. Nonostante questi aspetti rimangano da chiarire, le ceramidi rappresentano un promettente biomarcatore di qualità della dieta e di salute cardiometabolica ed un eventuale target nutrizionale per la riduzione del rischio cardiovascolare.

### RIASSUNTO

Un assetto lipidico alterato è un fattore cardine nello sviluppo e progressione delle patologie cardiovascolari. Modifiche nell'omeostasi dei lipidi possono determinare anche variazioni nei livelli delle ceramidi circolanti, le quali si accumulano sia nei tessuti metabolicamente attivi, come il muscolo scheletrico, che a livello della placca aterosclerotica. Le ceramidi, ed in particolari alcune sottoclassi quali C16:0, C18:0 e C24:1, sono di interesse sia da un punto di vista fisiopatologico nella progressione della malattia aterosclerotica, ma anche come possibili biomarcatori per una migliore valutazione del rischio cardiovascolare individuale, nonostante vi siano evidenze contrastanti per quanto riguarda la ceramide C24:0. Lo scopo di questa revisione narrativa della letteratura è di approfondire queste possibili implicazioni cliniche, in particolar modo focalizzandosi sulla possibilità tramite una dieta o eventuali nutrienti specifici di agire rimodulando il metabolismo delle ceramidi.

**Parole chiave:** *Ceramidi - rischio cardiovascolare - MACE - dieta iperlipidica - PUFA.*

### Bibliografia

- Merrill AH. De Novo Sphingolipid Biosynthesis: A Necessary, but Dangerous, Pathway. *J Biol Chem.* 277: 25843-25846, 2002.
- Garcia-Ruiz C, Mato JM, Vance D, et al. Acid sphingomyelinase-ceramide system in steatohepatitis: A novel target regulating multiple pathways. *J Hepatol.* 62: 219-233, 2015.
- Kitatani K, Idkowiak-Baldys J, Hannun YA. The sphingolipid salvage pathway in ceramide metabolism and signaling. *Cell Signal.* 20: 1010-1018, 2008.
- McGurk KA, Keavney BD, Nicolaou A. Circulating ceramides as biomarkers of cardiovascular disease: Evidence from phenotypic and genomic studies. *Atherosclerosis.* 327: 18-30, 2021.
- Ruvolo PP. Intracellular signal transduction pathways activated by ceramide and its metabolites. *Pharmacol Res.* 47: 383-392, 2003.
- Holland WL, Summers SA. Sphingolipids, insulin resistance, and metabolic disease: new insights from in vivo manipulation of sphingolipid metabolism. *Endocr Rev.* 29: 381-402, 2008.
- Shu H, Peng Y, Hang W, et al. Emerging Roles of Ceramide in Cardiovascular Diseases. *Aging Dis.* 13: 232-245, 2022.
- Yang J, Wang M, Yang D, et al. Integrated lipids biomarker of the prediabetes and type 2 diabetes mellitus Chinese patients. *Front Endocrinol.* 13: 1065665, 2022.
- Powell-Wiley TM, Poirier P, Burke LE, et al. Obesity and Cardiovascular Disease: A Scientific Statement from the American Heart Association. *Circulation.* 143: e984-e1010, 2021.
- Summers SA. Could Ceramides Become the New Cholesterol? *Cell Metab.* 27: 276-280, 2018.
- Spaggiari R, Angelini S, Di Vincenzo A, et al. Ceramides as Emerging Players in Cardiovascular Disease: Focus on Their Pathogenetic Effects and Regulation by Diet. *Adv Nutr Bethesda Md.* 15: 100252, 2024.
- Wang DD, Toledo E, Hruby A, et al. Plasma Ceramides, Mediterranean Diet, and Incident Cardiovascular Disease in the PREDIMED Trial (Prevención con Dieta Mediterránea). *Circulation.* 135: 2028-2040, 2017.
- Vasile VC, Meeusen JW, Medina Inojosa JR, et al. Ceramide Scores Predict Cardiovascular Risk in the Community. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 41: 1558-1569, 2021.
- Havulinna AS, Sysi-Aho M, Hilvo M, et al. Circulating Ceramides Predict Cardiovascular Outcomes in the

- Population-Based FINRISK 2002 Cohort. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 36: 2424-2430, 2016.
15. Öörni K, Jauhiainen M, Kovanen PT. Why and how increased plasma ceramides predict future cardiovascular events? *Atherosclerosis.* 314: 71-73, 2020.
  16. Kurz J, Parnham MJ, Geisslinger G, Schiffmann S. Ceramides as Novel Disease Biomarkers. *Trends Mol Med.* 25: 20-32, 2019.
  17. Laaksonen R, Ekroos K, Sysi-Aho M, et al. Plasma ceramides predict cardiovascular death in patients with stable coronary artery disease and acute coronary syndromes beyond LDL-cholesterol. *Eur Heart J.* 37: 1967-1976, 2016.
  18. Meeusen JW, Donato LJ, Bryant SC, et al. Plasma Ceramides: A Novel Predictor of Major Adverse Cardiovascular Events After Coronary Angiography. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 38: 1933-1939, 2018.
  19. Cao R, Fang Z, Li S, et al. Circulating Ceramide: A New Cardiometabolic Biomarker in Patients with Comorbid Acute Coronary Syndrome and Type 2 Diabetes Mellitus. *Front Physiol.* 11: 1104, 2020.
  20. Hilvo M, Meikle PJ, Pedersen ER, et al. Development and validation of a ceramide- and phospholipid-based cardiovascular risk estimation score for coronary artery disease patients. *Eur Heart J.* 41: 371-380, 2020.
  21. Wittenbecher C, Eichelmann F, Toledo E, et al. Lipid Profiles and Heart Failure Risk: Results From Two Prospective Studies. *Circ Res.* 128: 309-320, 2021.
  22. Hadas Y, Vincek AS, Youssef E, et al. Altering Sphingolipid Metabolism Attenuates Cell Death and Inflammatory Response After Myocardial Infarction. *Circulation.* 141: 916-930, 2020.
  23. Akhiyat N, Vasile V, Ahmad A, et al. Plasma Ceramide Levels Are Elevated in Patients with Early Coronary Atherosclerosis and Endothelial Dysfunction. *J Am Heart Assoc.* 11: e022852, 2022.
  24. Junqueira DLM, Stach A, Caixeta A, et al. Plasma Ceramides in Cardiovascular Disease Risk Stratification. *Arq Bras Cardiol.* 118: 768-777, 2022.
  25. Raichur S, Wang ST, Chan PW, et al. CerS2 Haploinsufficiency Inhibits  $\beta$ -Oxidation and Confers Susceptibility to Diet-Induced Steatohepatitis and Insulin Resistance. *Cell Metab.* 20: 919, 2014.
  26. Bergman BC, Brozinick JT, Strauss A, et al. Muscle sphingolipids during rest and exercise: a C18:0 signature for insulin resistance in humans. *Diabetologia.* 59: 785-798, 2016.
  27. Chathoth S, Ismail MH, Alghamdi HM, et al. Insulin resistance induced by de novo pathway-generated C16-ceramide is associated with type 2 diabetes in an obese population. *Lipids Health Dis.* 21: 24, 2022.
  28. Thorens B, Rodriguez A, Cruciani-Guglielmacci C, et al. Use of preclinical models to identify markers of type 2 diabetes susceptibility and novel regulators of insulin secretion - A step towards precision medicine. *Mol Metab.* 27S (Suppl.): S147-S154, 2019.
  29. Wigger L, Cruciani-Guglielmacci C, Nicolas A, et al. Plasma Dihydroceramides Are Diabetes Susceptibility Biomarker Candidates in Mice and Humans. *Cell Rep.* 18: 2269-2279, 2017.
  30. Peterson LR, Xanthakis V, Duncan MS, et al. Ceramide Remodeling and Risk of Cardiovascular Events and Mortality. *J Am Heart Assoc.* 7, 2018.
  31. Cheng JM, Suoniemi M, Kardys I, et al. Plasma concentrations of molecular lipid species in relation to coronary plaque characteristics and cardiovascular outcome: Results of the ATHEROREMO-IVUS study. *Atherosclerosis.* 243: 560-566, 2015.
  32. Pan W, Dong H, Sun R, et al. Plasma Ceramides in Relation to Coronary Plaque Characterization Determined by Optical Coherence Tomography. *J Cardiovasc Transl Res.* 14: 140-149, 2021.
  33. Lee TH, Cheng CN, Chao HC, et al. Plasma ceramides are associated with outcomes in acute ischemic stroke patients. *J Formos Med Assoc Taiwan Yi Zhi.* 121: 43-50, 2022.
  34. Maldonado-Hernández J, Saldaña-Dávila GE, Piña-Aguero MI, et al. Association between Plasmatic Ceramides Profile and AST/ALT Ratio: C14:0 Ceramide as Predictor of Hepatic Steatosis in Adolescents Independently of Obesity. *Can J Gastroenterol Hepatol.* 2017: 3689375, 2017.
  35. Ruuth M, Nguyen SD, Vihervaara T, et al. Susceptibility of low-density lipoprotein particles to aggregate depends on particle lipidome, is modifiable, and associates with future cardiovascular deaths. *Eur Heart J.* 39: 2562-2573, 2018.
  36. Chaurasia B, Talbot CL, Summers SA. Adipocyte Ceramides-The Nexus of Inflammation and Metabolic Disease. *Front Immunol.* 11: 576347, 2020.
  37. Choi RH, Tatum SM, Symons JD, et al. Ceramides and other sphingolipids as drivers of cardiovascular disease. *Nat Rev Cardiol.* 18: 701-711, 2021.
  38. Ramos P, Jenkins SM, Donato LJ, et al. The Biological Variability of Plasma Ceramides in Healthy Subjects. *J Appl Lab Med.* 7: 863-870, 2022.
  39. Park LK, Barry VG, Hong J, et al. Links between ceramides and cardiac function. *Curr Opin Lipidol.* 33: 47-56, 2022.
  40. Spijkers LJA, Akker RFP van den, Janssen BJA, et al. Hypertension is associated with marked alterations in sphingolipid biology: a potential role for ceramide. *PLoS One.* 6: e21817, 2011.
  41. Ji R, Akashi H, Drosatos K, et al. Increased de novo ceramide synthesis and accumulation in failing myocardium. *JCI Insight.* 2, 2017.
  42. Contreras C, González-García I, Martínez-Sánchez N, et al. Central ceramide-induced hypothalamic lipotoxicity and ER stress regulate energy balance. *Cell Rep.* 9: 366-377, 2014.
  43. Magnan C, Le Stunff H. Role of hypothalamic de novo ceramides synthesis in obesity and associated

- metabolic disorders. *Mol Metab.* 53: 101298, 2021.
44. Sergi D, Williams LM. Potential relationship between dietary long-chain saturated fatty acids and hypothalamic dysfunction in obesity. *Nutr Rev.* 78: 261-277, 2020.
  45. Borg ML, Omran SF, Weir J, et al. Consumption of a high-fat diet, but not regular endurance exercise training, regulates hypothalamic lipid accumulation in mice. *J Physiol.* 590: 4377-4389, 2012.
  46. Campana M, Bellini L, Rouch C, et al. Inhibition of central de novo ceramide synthesis restores insulin signaling in hypothalamus and enhances  $\beta$ -cell function of obese Zucker rats. *Mol Metab.* 8: 23-36, 2018.
  47. Sergi D, Naumovski N, Heilbronn LK, et al. Mitochondrial (Dys)function and Insulin Resistance: From Pathophysiological Molecular Mechanisms to the Impact of Diet. *Front Physiol.* 10: 532, 2019.
  48. Bergman BC, Hunerdosse DM, Kerege A, et al. Localisation and composition of skeletal muscle diacylglycerol predicts insulin resistance in humans. *Diabetologia.* 55: 1140-1150, 2012.
  49. Amati F, Dubé JJ, Alvarez-Carnero E, et al. Skeletal muscle triglycerides, diacylglycerols, and ceramides in insulin resistance: another paradox in endurance-trained athletes? *Diabetes.* 60: 2588-2597, 2011.
  50. Hajduch E, Balendran A, Batty IH, et al. Ceramide impairs the insulin-dependent membrane recruitment of Protein Kinase B leading to a loss in downstream signalling in L6 skeletal muscle cells. *Diabetologia.* 44: 173-183, 2001.
  51. Hage Hassan R, Pacheco De Sousa AC, Mahfouz R, et al. Sustained Action of Ceramide on the Insulin Signaling Pathway in Muscle Cells: Implication of the double-stranded RNA-activated Protein Kinase. *J Biol Chem.* 291: 3019-3029, 2016.
  52. Cimmino I, Lorenzo V, Fiory F, et al. A peptide antagonist of Prep1-p160 interaction improves ceramide-induced insulin resistance in skeletal muscle cells. *Oncotarget.* 8: 71845-71858, 2017.
  53. Yang G, Badeanlou L, Bielawski J, et al. Central role of ceramide biosynthesis in body weight regulation, energy metabolism, and the metabolic syndrome. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 297: E211-E224, 2009.
  54. Turpin-Nolan SM, Hammerschmidt P, Chen W, et al. CerS1-Derived C18:0 Ceramide in Skeletal Muscle Promotes Obesity-Induced Insulin Resistance. *Cell Rep.* 26: 1-10.e7, 2019.
  55. Yalcin EB, Tong M, Cao K, et al. High Fat Diet Mediated Alterations in Serum Sphingolipid Profiles in An Experimental Mouse Model Measured by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *Eur J Biol Biotechnol.* 4: 25-32, 2023.
  56. Montandon SA, Somme E, Loizides-Mangold U, et al. Multi-technique comparison of atherogenic and MCD NASH models highlights changes in sphingolipid metabolism. *Sci Rep.* 9: 16810, 2019.
  57. Bonen A, Jain SS, Snook LA, et al. Extremely rapid increase in fatty acid transport and intramyocellular lipid accumulation but markedly delayed insulin resistance after high fat feeding in rats. *Diabetologia.* 58: 2381-2391, 2015.
  58. Eum JY, Lee GB, Yi SS, et al. Lipid alterations in the skeletal muscle tissues of mice after weight regain by feeding a high-fat diet using nanoflow ultrahigh performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 1141: 122022, 2020.
  59. Lukaszuk B, Miklosz A, Zendzian-Piotrowska M, et al. Changes in the Diaphragm Lipid Content after Administration of Streptozotocin and High-Fat Diet Regime. *J Diabetes Res.* 2017: 3437169, 2017.
  60. Sokolowska E, Blachnio-Zabielska A. The Role of Ceramides in Insulin Resistance. *Front Endocrinol.* 10: 577, 2019.
  61. Longato L, Tong M, Wands JR, Monte SM de la. High fat diet induced hepatic steatosis and insulin resistance: Role of dysregulated ceramide metabolism. *Hepatol Res Off J Jpn Soc Hepatol.* 42:412-27, 2012.
  62. Choi S, Snider AJ. Sphingolipids in High Fat Diet and Obesity-Related Diseases. *Mediators Inflamm.* 2015: 520618, 2015.
  63. Kim YR, Lee EJ, Shin KO, et al. Hepatic triglyceride accumulation via endoplasmic reticulum stress-induced SREBP-1 activation is regulated by ceramide synthases. *Exp Mol Med.* 51: 1-16, 2019.
  64. Deevska GM, Sunkara M, Morris AJ, Nikolova-Karakashian MN. Characterization of secretory sphingomyelinase activity, lipoprotein sphingolipid content and LDL aggregation in *ldlr*<sup>-/-</sup> mice fed on a high-fat diet. *Biosci Rep.* 32: 479-490, 2012.
  65. Langley MR, Yoon H, Kim HN, et al. High fat diet consumption results in mitochondrial dysfunction, oxidative stress, and oligodendrocyte loss in the central nervous system. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 1866: 165630, 2020.
  66. Mansouri A, Gattolliat CH, Asselah T. Mitochondrial Dysfunction and Signaling in Chronic Liver Diseases. *Gastroenterology.* 155: 629-647, 2018.
  67. Elsen LWJ van den, Spijkers LJA, Akker RFP van den, et al. Dietary fish oil improves endothelial function and lowers blood pressure via suppression of sphingolipid-mediated contractions in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens.* 32: 1050-1058; discussion 1058, 2014.
  68. Lanza IR, Blachnio-Zabielska A, Johnson ML, et al. Influence of fish oil on skeletal muscle mitochondrial energetics and lipid metabolites during high-fat diet. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 304: E1391-E1403, 2013.
  69. Chacińska M, Zabielski P, Książek M, et al. The Impact of OMEGA-3 Fatty Acids Supplementation on Insulin Resistance and Content of Adipocytokines and

- Biologically Active Lipids in Adipose Tissue of High-Fat Diet Fed Rats. *Nutrients*. 11, 2019.
70. Taltavull N, Ras R, Mariné S, et al. Protective effects of fish oil on pre-diabetes: a lipidomic analysis of liver ceramides in rats. *Food Funct*. 7: 3981-3988, 2016.
  71. Blachnio-Zabielska AU, Chacinska M, Vendelbo MH, Zabielski P. The Crucial Role of C18-Cer in Fat-Induced Skeletal Muscle Insulin Resistance. *Cell Physiol Biochem Int J Exp Cell Physiol Biochem Pharmacol*. 40: 1207-1220, 2016.
  72. Mourad S, Abdualkader AM, Li X, Jani S, et al. A high-fat diet supplemented with medium-chain triglycerides ameliorates hepatic steatosis by reducing ceramide and diacylglycerol accumulation in mice. *Exp Physiol*. 109: 350-364, 2024.
  73. Žáček P, Bukowski M, Mehus A, et al. Dietary saturated fatty acid type impacts obesity-induced metabolic dysfunction and plasma lipidomic signatures in mice. *J Nutr Biochem*. 64: 32-44., 2019
  74. Seah JYH, Chew WS, Torta F, et al. Dietary Fat and Protein Intake in Relation to Plasma Sphingolipids as Determined by a Large-Scale Lipidomic Analysis. *Metabolites*. 11, 2021.
  75. Helge JW, Tobin L, Drachmann T, et al. Muscle ceramide content is similar after 3 weeks' consumption of fat or carbohydrate diet in a crossover design in patients with type 2 diabetes. *Eur J Appl Physiol*. 112: 911-918, 2012.
  76. Covington JD, Johannsen DL, Coen PM, et al. Intramyocellular Lipid Droplet Size Rather Than Total Lipid Content is Related to Insulin Sensitivity After 8 Weeks of Overfeeding. *Obes Silver Spring Md*. 25: 2079-2087, 2017.
  77. Skorve J, Hilvo M, Vihervaara T, et al. Fish oil and krill oil differentially modify the liver and brain lipidome when fed to mice. *Lipids Health Dis*. 14: 88, 2015.
  78. Walchuk C, Wang Y, Suh M. The impact of EPA and DHA on ceramide lipotoxicity in the metabolic syndrome. *Br J Nutr*. 125: 863-875, 2021.
  79. Lankinen M, Schwab U, Erkkilä A, et al. Fatty fish intake decreases lipids related to inflammation and insulin signaling—a lipidomics approach. *PLoS One*. 4: e5258, 2009.
  80. Kien CL, Bunn JY, Poynter ME, et al. A lipidomics analysis of the relationship between dietary fatty acid composition and insulin sensitivity in young adults. *Diabetes*. 62: 1054-1063, 2013.
  81. Vilà L, Roglans N, Alegret M, et al. Suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS-3) and a deficit of serine/threonine (Ser/Thr) phosphoproteins involved in leptin transduction mediate the effect of fructose on rat liver lipid metabolism. *Hepatology*. 48: 1506-1516, 2008.
  82. Crescenzo R, Mazzoli A, Luccia BD, et al. Dietary fructose causes defective insulin signalling and ceramide accumulation in the liver that can be reversed by gut microbiota modulation. *Food Nutr Res*. 61: 1331657, 2017.
  83. Deng P, Hoffman JB, Petriello MC, et al. Dietary inulin decreases circulating ceramides by suppressing neutral sphingomyelinase expression and activity in mice. *J Lipid Res*. 61: 45-53, 2020.
  84. Kayser BD, Prifti E, Lhomme M, et al. Elevated serum ceramides are linked with obesity-associated gut dysbiosis and impaired glucose metabolism. *Metabolomics Off J Metabolomic Soc*. 15: 140, 2019.
  85. Sanz JM, Sergi D, Colombari S, et al. Dietary Acid Load but Not Mediterranean Diet Adherence Score Is Associated with Metabolic and Cardiovascular Health State: A Population Observational Study From Northern Italy. *Front Nutr*. 9: 828587, 2022.
  86. Jani S, Eira DD, Stefanovic M, Ceddia RB. The ketogenic diet prevents steatosis and insulin resistance by reducing lipogenesis, diacylglycerol accumulation and protein kinase C activity in male rat liver. *J Physiol*. 600: 4137-4151, 2022.
  87. AlGhatrif M, Watts VL, Niu X, et al. Beneficial cardiac effects of caloric restriction are lost with age in a murine model of obesity. *J Cardiovasc Transl Res*. 6: 436-445, 2013.
  88. Zietzer A, Düsing P, Reese L, et al. Ceramide Metabolism in Cardiovascular Disease: A Network with High Therapeutic Potential. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 42: 122-1228, 2022.