

# Aggiornamento dalla letteratura

Francesco Giorgino, Anna Leonardini

Università degli Studi di Bari, Dipartimento dell'Emergenza e dei Trapianti di Organi (DETO), Medicina Interna, Endocrinologia e Malattie Metaboliche

Articolo n. 1/il Diabete n. 1/Marzo 2006

## The kinase LKB<sub>1</sub> mediates glucose homeostasis in liver and therapeutic effects of metformin

*La chinasi LKB<sub>1</sub> media l'omeostasi del glucosio nel fegato e gli effetti terapeutici della metformina*

Shaw RJ, Lamia KA, Vasquez D, Koo SH, Bardeesy N, Depinho RA, Montminy M, Cantley LC. Science 310 (5754):1642-1646, 2005

### Riassunto

*Il gene onco-soppressore della sindrome di Peutz-Jegher codifica per una treonina chinasi, LKB<sub>1</sub>, che fosforila ed attiva la chinasi AMPK. La delezione di LKB<sub>1</sub> nel fegato di topi adulti determina la perdita quasi completa dell'attività di AMPK. La perdita della funzione di LKB<sub>1</sub> causa iperglicemia con aumento dell'espressione di geni coinvolti nella gluconeogenesi e nella lipogenesi. Quando nel fegato manca LKB<sub>1</sub>, TORC<sub>2</sub>, un coattivatore trascrizionale di CREB, viene defosforilato, entra nel nucleo e induce così l'espressione di PGC-1 $\alpha$ , che a sua volta porta ad un aumento della gluconeogenesi. La riduzione dei livelli di TORC<sub>2</sub> nel fegato mediante l'uso di adenovirus esprimenti small hairpin RNA (shRNA) riduce l'espressione di PGC-1 $\alpha$  e normalizza la glicemia in topi resi knock-out per LKB<sub>1</sub> a livello epatico, indicando che TORC<sub>2</sub> è un target fondamentale della via del segnale intracellulare LKB<sub>1</sub>/AMPK che regola la gluconeogenesi. Infine, viene dimostrato che la metformina, uno dei farmaci maggiormente prescritti per la terapia del diabete mellito tipo 2, richiede la presenza di LKB<sub>1</sub> nel fegato per svolgere la sua azione ipoglicemizzante.*

### Commento

La protein chinasi AMPK rappresenta un regolatore fondamentale della risposta cellulare in condizioni di bassa energia e viene attivata in risposta al digiuno ed a situazioni di stress marcato quando le concentrazioni intracellulari di ATP diminuiscono e le concentrazioni di AMP aumentano. Nei mammiferi AMPK ha un ruolo critico in molti processi metabolici: nei muscoli regola l'ingresso e l'utilizzazione del glucosio e l'ossidazione degli acidi grassi, nel fegato è coinvolta nella sintesi degli acidi grassi e nella gluconeogenesi, a livello ipotalamico media l'assunzione di cibo. AMPK è costituita da tre subunità: la subunità catalitica  $\alpha$  ad attività chinasica, e la subunità  $\beta$  e la subunità  $\gamma$  con funzioni di regolazione. In condizioni di dispendio energetico, l'AMP si lega direttamente a livello della subunità  $\gamma$  di AMPK e ne determina un cambio conformazionale che espone la sequenza di attivazione localizzata sulla subunità  $\alpha$ , permettendone così la fosforilazione da parte di un'altra chinasi che si trova a monte di AMPK. Nell'uomo, ma anche in molte altre specie di mammifero, l'attivazione di AMPK si realizza mediante la fosforilazione della Thr172 presente nella subunità  $\alpha$ . Recentemente è stato dimostrato che LKB<sub>1</sub> è una chinasi in grado di attivare AMPK in condizioni di dispendio energetico in numerose linee cellulari di mammiferi. Alla luce di queste nuove conoscenze, si è ipotizzato che LKB<sub>1</sub> possa svolgere un ruolo centrale nella regolazione del metabolismo energetico.

AMPK è una proteina che viene regolata anche da altri stimoli. Nel fegato, AMPK è regolata dalle adipochine, come l'adiponectina e la resistina, che servono rispettivamente a stimolare e inibire l'attivazione della proteina. L'esercizio fisico e diversi farmaci che vengono utilizzati nella terapia del diabete mellito tipo 2 attivano AMPK nel muscolo e nel fegato e si pensa che da un punto di vista terapeutico essi agiscano in parte attraverso la stimolazione di queste vie intracellulari sia nel tessuto epatico sia nel tessuto muscolare. Comunque, anche la CAMKK $\beta$  (Ca<sup>2+</sup> calmodulin-dependent protein kinase kinase  $\beta$ ) attiva AMPK. CAMKK $\beta$  fosforila ed attiva AMPK in risposta all'aumento delle concentrazioni intracellulari di calcio, mentre LKB<sub>1</sub> sembra essere responsabile per la regolazione di AMPK in condizione di stress energetico quando si realizza un accumulo intracellulare di AMP.

In questo studio viene stabilito il ruolo fondamentale di LKB<sub>1</sub> nell'attivazione di AMPK in tessuti importanti da un punto di vista metabolico. Al fine di valutare il ruolo di LKB<sub>1</sub> nell'attivazione di AMPK e gli effetti della mancanza di LKB<sub>1</sub> sull'omeostasi del glucosio, sono stati creati topi adulti knock-out per il gene di LKB<sub>1</sub> a livello epatico. I risultati di questo lavoro forniscono la prova diretta che l'onco-soppressore LKB<sub>1</sub> è il principale attivatore di AMPK nel fegato. Non è possibile escludere il ruolo, eventualmente secondario, di altre chinasi, ma in tutte le circostanze esaminate la perdita di LKB<sub>1</sub> determina la perdita della fosforilazione di AMPK. In maniera analoga, LKB<sub>1</sub> sembra essere la principale chinasi responsabile della fosforilazione di AMPK nel muscolo scheletrico.

In questo lavoro viene anche illustrata una nuova via di trasduzione del segnale che regola la gluconeogenesi epatica. L'attivazione di LKB<sub>1</sub> regola l'attivazione di chinasi sottostanti (AMPK e altre) che fosforilano, inattivandolo, il coattivatore trascrizionale TORC<sub>2</sub>. Questa via normalmente regola gli input cellulari e ormonali ed influenza negativamente sugli eventi trascrizionali che promuovono la sintesi di enzimi della gluconeogenesi. In assenza di LKB<sub>1</sub>, nessuna chinasi è in grado di fosforilare TORC<sub>2</sub> e pertanto la gluconeogenesi aumenta poiché vengono a mancare i fattori fisiologici di controllo metabolico.

Il risvolto da un punto di vista clinico dell'identificazione di questa nuova via di controllo del segnale intracellulare è dato dalla valutazione della risposta terapeutica alla metformina, farmaco diffusamente utilizzato nella terapia del diabete mellito tipo 2. L'attivazione di AMPK è richiesta per l'azione ipoglicemizzante della metformina nell'animale sperimentale. La delezione di LKB<sub>1</sub> nel fegato non altera l'attivazione di AMPK nel muscolo ma è in grado di eliminare l'effetto della metformina sul controllo della glicemia. Questo risultato indica che nel topo la metformina svolge la sua azione ipoglicemizzante attraverso la riduzione della gluconeogenesi epatica, mediata da LKB<sub>1</sub> e AMPK. Infine, LKB<sub>1</sub> agisce anche come onco-soppressore. Quindi la riduzione dei livelli di LKB<sub>1</sub> potrebbe svolgere un ruolo nel processo carcinogenetico. Questi risultati rinforzano l'emergente legame che esiste fra il controllo fisiologico del metabolismo e il cancro. Le vie intracellulari che interessano l'insulina e LKB<sub>1</sub> rappresentano un network fondamentale nelle cellule eucariotiche che governa la crescita cellulare in risposta ai nutrienti ambientali. La disregolazione di questi meccanismi potrebbe contribuire sia all'insorgenza del diabete che a quella dei tumori.

Articolo n. 2/il Diabete n. 1/Marzo 2006

## Intensive diabetes treatment and cardiovascular disease in patients with type 1 diabetes *Trattamento intensivo del diabete e malattia cardiovascolare in pazienti con diabete tipo 1*

The Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (DCCT/EDIC) Study Research Group. N Engl J Med 353(25):2643-2653, 2005

### Riassunto

**Background.** *La terapia insulinica intensiva con il raggiungimento di valori di glicemia vicini alla normalità riduce il rischio di complicanze microvascolari e neurologiche. Nel Diabetes Control and Complications Trial (DCCT) è stato indagato se l'uso della terapia intensiva (mediante 3 o più iniezioni giornaliere di insulina o mediante terapia con microinfusore, e con aggiustamento della dose insulinica in base all'automonitoraggio della glicemia capillare quattro volte al giorno) rispetto alla terapia convenzionale modifica l'incidenza a lungo termine della malattia cardiovascolare.*

**Metodi.** Il DCCT ha assegnato in maniera casuale 1441 pazienti con diabete mellito tipo 1 al trattamento convenzionale o al trattamento intensivo; la durata media di osservazione è stata di circa 6.5 anni dal 1983 al 1993. Il 93% di questi pazienti è stato successivamente seguito, sino al primo febbraio del 2005, nello studio osservazionale *Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (EDIC)*. La malattia cardiovascolare (definita come infarto del miocardio non fatale, ictus cerebrale, morte da malattia cardiovascolare, angina confermata da modificazioni ischemiche durante test da sforzo o da ostruzione clinicamente significativa evidenziata durante angiografia coronarica, o la necessità di rivascolarizzazione con angioplastica o bypass delle arterie coronarie) veniva valutata mediante misure standardizzate e classificata da una commissione indipendente.

**Risultati.** In questi 17 anni di follow-up, 46 eventi cardiovascolari si sono verificati in 31 pazienti che avevano ricevuto il trattamento intensivo nel DCCT, rispetto a 98 eventi nei 52 pazienti che avevano ricevuto il trattamento convenzionale. Il trattamento intensivo riduceva il rischio di eventi cardiovascolari del 42% (intervallo di confidenza 95%, 9–63%;  $p=0.02$ ) e il rischio di infarto non fatale, ictus cerebrale o morte per malattia cardiovascolare del 57% (intervallo di confidenza 95%, 12–79%;  $p=0.02$ ). La riduzione dei valori di emoglobina glicata ottenuta mediante trattamento intensivo durante il DCCT è risultata significativamente associata alla riduzione del rischio di malattia cardiovascolare. La presenza di microalbuminuria e albuminuria è risultata anche associata a un significativo incremento del rischio di malattia cardiovascolare, ma le differenze tra i due gruppi rimanevano significative ( $p \leq 0.05$ ) anche dopo correzione per questi fattori.

**Conclusioni.** La terapia insulinica intensiva dimostra di avere effetti benefici a lungo termine sul rischio di malattia cardiovascolare in pazienti con diabete mellito tipo 1.

### Commento

Il diabete mellito tipo 1 è associato con complicanze a lungo termine che interessano gli occhi, i reni, il sistema nervoso somatico e vegetativo. Sebbene le basi fisiopatologiche di queste complicanze rimangano incerte, l'iperglicemia sembra giocare un ruolo centrale. Studi epidemiologici hanno dimostrato una forte associazione tra i livelli di glicemia e l'insorgenza di queste complicanze. Il *Diabetes Control and Complications Trial (DCCT)* e lo studio *Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (EDIC)*, quest'ultimo follow-up del DCCT, hanno dimostrato un effetto benefico del trattamento insulinico intensivo sullo sviluppo e sulla progressione della retinopatia, nefropatia e neuropatia. Gli obiettivi glicemici del trattamento terapeutico intensivo erano un livello di glicemia a digiuno tra 70 e 120 mg/dl e un picco post-prandiale inferiore a 180 mg/dl. L'obiettivo terapeutico per l'emoglobina glicata era un valore  $<6.05\%$ .

La malattia cardiovascolare è maggiormente prevalente tra i pazienti affetti da diabete mellito tipo 1 o tipo 2 rispetto alla popolazione non diabetica. Il diabete mellito tipo 1 è associato a un incremento di 10 volte delle malattie cardiovascolari rispetto alla popolazione adulta sana stratificata in base all'età. Un'associazione tra l'iperglicemia e la malattia cardiovascolare è stata suggerita da alcuni studi, ma non da tutti, condotti su pazienti diabetici tipo 1. Durante il DCCT, pochi eventi cardiovascolari si sono realizzati nel gruppo in trattamento intensivo rispetto al gruppo in terapia convenzionale, ma il piccolo numero di eventi in una coorte relativamente giovane precludeva la capacità di comprendere la relazione tra la terapia intensiva e il rischio di malattia cardiovascolare. Utilizzando i risultati a lungo termine ottenuti nella coorte DCCT/EDIC, è stato invece possibile valutare se la terapia intensiva è in grado di ridurre il rischio di eventi cardiovascolari nei pazienti con diabete mellito tipo 1. Rispetto alla terapia tradizionale, la terapia intensiva era in grado di ridurre il rischio di eventi cardiovascolari del 42% e il rischio di eventi clinici severi, tra cui l'infarto del miocardio non fatale, l'ictus cerebrale o la morte per malattia cardiovascolare, di circa il 57%. Questi risultati confermano che il trattamento intensivo rispetto al trattamento convenzionale riduce la progressione dell'arteriosclerosi, valutabile attraverso la misura dello spessore delle tonache intima e media delle carotidi e il numero delle calcificazioni delle arterie coronarie. Ricordiamo che lo studio DCCT/EDIC aveva già dimostrato come un periodo di trattamento intensivo durato per circa 6.5 anni sia in grado di ridurre il rischio di insorgenza di complicanze microangiopatiche anche a distanza di tempo, probabilmente per il fenomeno della "memoria metabolica".

Le spiegazioni degli effetti del trattamento intensivo sugli *outcomes* cardiovascolari sono molteplici. In primo luogo, gli stessi meccanismi glicemici in grado di ridurre l'incidenza di complicanze microvascolari potrebbero esse-

re applicati anche per lo sviluppo dell'aterosclerosi. I pazienti che hanno avuto un evento cardiovascolare mostravano una probabilità più alta di avere anche retinopatia e presentavano una escrezione renale di albumina superiore rispetto alla norma. L'effetto a lungo termine dell'iperglicemia sul rischio di insorgenza di complicanze microvascolari potrebbe essere mediato dalla generazione degli AGE, che sono chiamati in causa anche per la patogenesi della malattia cardiovascolare. In alternativa, gli effetti benefici della terapia intensiva sul rischio di malattia cardiovascolare potrebbero derivare dalla riduzione dell'incidenza delle complicanze microvascolari. Sia la nefropatia diabetica sia la neuropatia autonoma sono state proposte come fattori di rischio cardiovascolari. La terapia intensiva, riducendo l'insorgenza di queste complicanze, potrebbe quindi ridurre l'insorgenza della malattia cardiovascolare.

Il follow-up, durato virtualmente per più di 2 decenni, di pazienti diabetici che all'inizio non avevano evidenze cliniche di malattia cardiovascolare, né erano ipertesi o ipercolesterolemici, ha facilitato lo studio della valutazione dell'incidenza di eventi cardiovascolari. Tuttavia, nella valutazione dei risultati di questo studio vanno fatte alcune considerazioni. Infatti, il numero totale di eventi rimane relativamente basso, rendendo impossibile l'accertamento definitivo degli effetti della terapia sui differenti tipi di eventi cardiovascolari. Inoltre, alcuni degli eventi cardiovascolari esaminati, come la necessità di rivascolarizzazione, sono dipendenti dalla decisione medica. È da notare anche il fatto che la quota di infarti del miocardio silenti è stata relativamente alta rispetto a quella di altri studi. Infine, durante gli studi DCCT ed EDIC, i pazienti erano strettamente monitorati e sottoposti a contemporanee terapie che potrebbero aver modificato il rischio di malattia cardiovascolare. Però, l'unica differenza statisticamente significativa tra i 2 gruppi in trattamento che potrebbe aver influenzato gli *outcomes* cardiovascolari è stato il più largo uso di  $\beta$ -bloccanti nel gruppo in terapia convenzionale. Questo potrebbe aver ridotto la differenza rispetto al gruppo in trattamento intensivo in riferimento al numero di eventi cardiovascolari.

La terapia insulinica intensiva, effettuata per un periodo di circa 6.5 anni, si dimostra quindi più efficace rispetto alla terapia insulinica convenzionale nel ridurre l'incidenza di malattia cardiovascolare a lungo termine nel diabete tipo 1. Questo rinforza l'originale messaggio del DCCT che la terapia intensiva dovrebbe essere ottimizzata il più precocemente possibile in pazienti diabetici tipo 1. La riduzione relativa del rischio di infarto non fatale del miocardio, di ictus cerebrale e di morte per patologia cardiovascolare del 57%, supera la riduzione del rischio ottenuta con altri tipi di intervento, come l'utilizzo di farmaci ipocolesterolemizzanti o antipertensivi. Pertanto, la riduzione del rischio di eventi cardiovascolari ottenuta mediante ottimizzazione del compenso glicemico con terapia insulinica intensiva ha risvolti in primo luogo sulla salute del paziente ma anche importanti implicazioni di politica sanitaria e di carattere economico.

