

## Articolo n. 2

**Serum levels of advanced glycation endproducts and other markers of protein damage in early diabetic nephropathy in type 1 diabetes.***Livelli sierici di prodotti avanzati della glicazione e di altri marcatori di danno proteico nella nefropatia diabetica precoce nel diabete tipo 1.**PLoS One 2012;7: e35655.*

Perkins BA, Rabbani N, Weston A, Ficociello LH, Adaikalakoteswari A, Niewczas M, Warram J, Krolewski AS, Thonalley P.

**Riassunto**

**Obiettivi.** *Determinare il ruolo delle proteine plasmatiche danneggiate da processi di glicazione, ossidazione o nitrosilazione in pazienti diabetici tipo 1 con insorgenza di microalbuminuria o declino della velocità di filtrazione glomerulare (definito come riduzione precoce del GFR).*

**Metodi.** *Dallo studio Joslin Kidney Study, sono stati selezionati 30 pazienti con normoalbuminuria di lunga data e 55 pazienti con microalbuminuria di recente insorgenza. I pazienti con microalbuminuria sono stati seguiti con un follow-up della durata variabile da 8 a 12 anni, durante il quale 33 hanno mostrato un valore stabile di GFR e 22 una riduzione di questo parametro. I livelli medi di GFR al baseline erano simili tra i 3 gruppi analizzati. I prodotti di glicazione, ossidazione e nitrosilazione sono stati misurati nelle proteine e nell'ultrafiltrato mediante cromatografia liquida associata a spettrometria di massa.*

**Risultati.** *Sebbene non vi fosse alcuna differenza significativa tra i pazienti con microalbuminuria stabile e quelli con riduzione precoce del GFR, i livelli di 6 proteine oggetto di glicazione, ossidazione o nitrosilazione (addotti proteici) e di 4 "addotti liberi" sono risultati significativamente differenti nei pazienti con microalbuminuria rispetto ai controlli normoalbuminurici. Inoltre, si osservava una diminuzione di 3 addotti proteici e altri 3 aumentavano in presenza di microalbuminuria, mentre 3 "addotti liberi" si riducevano e uno aumentava nella microalbuminuria. La principale differenza si riscontrava per l'N'-formilchineturena (NFK) - che reagiva con residui proteici per formare un addotto - e per l'"addotto libero" con l'N(ω)-carbossimetilarginina (CMA), i cui livelli erano marcatamente più bassi in presenza di microalbuminuria.*

**Conclusioni.** *Nel diabete tipo 1 e nella microalbuminuria si realizzano processi complessi di danno delle proteine plasmatiche mediante reazioni di glicazione, ossidazione e nitrosilazione ed entrambe le condizioni correlano con la proteolisi di prodotti "addotti liberi". Pazienti che hanno meccanismi efficienti di eliminazione delle proteine modificate da questo tipo di reazioni potrebbero avere un aumento del rischio di sviluppare microalbuminuria, ma non una riduzione precoce del GFR. I risultati supportano l'ipotesi che i meccanismi responsabili dell'insorgenza della microalbuminuria differiscano da quelli coinvolti nelle fasi precoci di declino della funzione renale.*

**Commento**

In presenza di diabete le proteine subiscono un danno dovuto rispettivamente a processi di glicazione, ossidazione e nitrosilazione. In modelli sperimentali animali è stato in precedenza dimostrato un aumento del danno delle proteine glomerulari e questo correlava con l'insorgenza precoce di nefropatia diabetica. La glicazione, l'ossidazione e la nitrosilazione delle proteine plasmatiche e i relativi "addotti liberi" – aminoacidi glicosilati, ossidati o sottoposti a nitrosilazione (formati rispettivamente dalla proteolisi di proteine precedentemente glicate, ossidate o nitrosilate) – aumentavano in presenza di diabete. Agenti farmacologici che inducono la remissione della microalbuminuria nel diabete clinico, come i bloccanti del recettore dell'angiotensina e alte dosi di tiamina, riducevano il danno glomerulare e delle proteine plasmatiche e i livelli dei relativi "addotti liberi". In questo studio gli Autori

hanno ipotizzato che le proteine plasmatiche danneggiate da processi di glicazione, ossidazione e nitrosilazione e i relativi “addotti liberi” potrebbero far parte dei meccanismi chiamati in causa per lo sviluppo di microalbuminuria e/o del rapido declino del GFR. A tal fine, lo studio ha analizzato una coorte di pazienti diabetici tipo 1 con normoalbuminuria seguiti longitudinalmente per lo sviluppo di microalbuminuria e successivo rapido declino del GFR. È stata riscontrata una stretta associazione con l’insorgenza recente di microalbuminuria di 6 proteine plasmatiche modificate da reazione di glicazione, ossidazione e nitrosilazione e di 4 “addotti liberi” proteici modificati. Contrariamente alle ipotesi prevalenti relative ai marcatori plasmatici di danno proteico, la maggior parte dei pazienti presentava livelli di questi addotti proteici e degli “addotti liberi” più bassi al momento della comparsa della microalbuminuria rispetto ai soggetti normoalbuminurici da lungo tempo, a prescindere dalle successive modifiche del GFR. Questi marcatori generalmente non si associavano o correlavano inversamente con i livelli di emoglobina glicata e non vi era una forte associazione tra di loro.

I punti di forza di questo studio sono molteplici: l’analisi di una coorte di nuovi casi di microalbuminuria, l’utilizzo delle migliori metodiche disponibili per la valutazione di marcatori di proteine sottoposte a processi di glicazione, nitrosilazione e ossidazione, l’analisi di una gamma completa di addotti proteici e la discriminazione tra addotti proteici plasmatici derivati da reazioni di glicazione, ossidazione e nitrosilazione e dei relativi “addotti liberi”. Tuttavia, in questo studio sono da riconoscere anche delle potenziali limitazioni. Per prima cosa i residui aggiunti per la glicazione, l’ossidazione e la nitrosilazione alle proteine plasmatiche potrebbero essere formati e riparati non solo durante la circolazione sistemica, ma anche a livello renale, come avviene per il recupero dell’albumina. Allo stesso modo, gli “addotti liberi” glicati, ossidati e sottoposti a nitrosilazione in parte provengono dalla digestione e assorbimento a livello del tratto gastrointestinale a seguito dell’ingestione di proteine danneggiate. Tuttavia, questa è di solito una fonte minore per gli “addotti liberi” analizzati in questo studio. Inoltre, il ritrovamento di un sottoinsieme di “addotti liberi” con una concentrazione plasmatica inferiore implica che l’esposizione alimentare è un meccanismo improbabile del precoce danno renale. In secondo luogo, lo studio ha un limitato potere statistico nel risolvere associazioni complesse di meccanismi di danno proteico responsabili dello sviluppo di microalbuminuria e di un rapido declino del GFR. In terzo luogo, non è stata indagata l’esistenza di effetti simili nei pazienti diabetici tipo 2 che gli Autori preannunciano essere un obiettivo importante per gli studi futuri.

Gli Autori, pertanto, concludono che processi complessi influenzano i livelli di proteine danneggiate in pazienti diabetici tipo 1 microalbuminurici con e senza precoce declino del GFR. Gli effetti osservati in presenza di microalbuminuria potrebbero correlare con alterazioni della permeabilità del filtro glomerulare delle proteine danneggiate e con modifiche del riassorbimento tubulare degli “addotti liberi”. Saranno necessarie ulteriori ricerche per valutare l’eventuale coinvolgimento di questi meccanismi che potrebbero essere responsabili della disfunzione renale in pazienti diabetici tipo 1.

