

# La “memoria metabolica”: la nuova sfida nella terapia del diabete

Antonio Ceriello

Warwick Medical School, University of Warwick, UK

**I**l diabete è un problema di salute pubblica grave e di crescente rilevanza che comporta una riduzione dell'aspettativa di vita e un aumento della morbilità a causa di complicanze specificatamente legate alla malattia. La principale caratteristica del diabete è l'iperglicemia, un fattore di stress che può essere controllato sotto il profilo clinico mediante la somministrazione esogena di insulina o di farmaci che determinano un aumento della secrezione di insulina, una diminuzione del rilascio di glucosio da parte del fegato, un aumento del consumo di glucosio nella muscolatura scheletrica e nel grasso, un ritardo nell'assorbimento del glucosio degli alimenti e che, per quanto riguarda i farmaci più recenti, agiscono attraverso il sistema incretinico (1).

Tali miglioramenti, unitamente a un più efficace controllo glicemico e alla disponibilità di *markers* migliori per tale controllo, hanno portato a una correzione molto più efficace dell'iperglicemia. Nonostante i progressi ottenuti nel trattamento della patologia, le complicanze vascolari debilitative continuano a presentarsi nella maggior parte dei pazienti diabetici.

Nello studio sul Controllo del Diabete e delle sue Complicanze (*Diabetes Complications and Control Trial*, DCCT) i pazienti diabetici tipo 1 sono stati sottoposti a regimi di trattamento standard o intensivo al fine di normalizzare i livelli di glucosio. In virtù del fatto che la progressione delle complicanze microvascolari ha registrato una profonda diminuzione nei pazienti sotto stretto controllo per il glucosio, il DCCT si è concluso dopo un periodo di studio medio di 6,5 anni e tutti i pazienti sono stati sottoposti a una terapia intensiva (2).

In particolare, nello studio *Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications* (EDIC) (un follow-up del DCCT) i pazienti in regime di trattamento standard

durante il DCCT presentavano ancora una maggiore incidenza di complicanze rispetto ai loro equivalenti, sottoposti a una terapia intensiva per tutta la durata dello studio, diversi anni dopo essere passati alla terapia intensiva (3, 4). Inoltre, dati recenti ottenuti nell'EDIC suggeriscono anche che l'influenza del controllo della glicemia, effettuato precocemente, sulla progressione in eventi macrovascolari può manifestarsi in modo più evidente con un follow-up di maggiore durata (5, 6).

I dati ottenuti nello Studio Prospettico sul Diabete nel Regno Unito (*United Kingdom Prospective Diabetes Study*, UKPDS) sembrano essere conformi a quanto riscontrato. Nello specifico, le persone con valori di glucosio plasmatico a digiuno (FPG) più bassi al momento della diagnosi presentavano nel tempo un minore numero di complicanze vascolari ed esiti clinici avversi rispetto a persone con valori di FPG più alti, nonostante essi presentassero tassi di aumento della glicemia simili (7); ciò suggerisce che il controllo metabolico precoce determina effetti benefici duraturi anche nel diabete tipo 2 (DMT2). La conferma dell'esistenza della “memoria metabolica” anche nel DMT2 è comunque arrivata dal follow-up a lungo termine dell'UKPDS. Questo studio ha dimostrato che, come nel caso dello studio EDIC, i pazienti che fin dall'inizio hanno ricevuto un trattamento antidiabetico più aggressivo conservano a distanza di circa 20 anni di follow-up un vantaggio nell'incidenza delle complicanze sia micro sia macroangiopatiche rispetto ai pazienti che sono stati messi in terapia più aggressiva solo dalla fine dello studio UKPDS, anche se durante il follow-up i due gruppi di pazienti hanno raggiunto livelli di emoglobina glicata (HbA<sub>1c</sub>) sovrapponibili (8).

Tale condizione riscontrata nel DMT2 è diventata ancora più evidente nel recente follow-up a lungo ter-

mine dello STENO-2 Study (9). In questo studio, dopo un periodo medio di 13,3 anni (7,8 anni di intervento multifattoriale con stretto controllo della glicemia e utilizzo di *blockers* del sistema renina-angiotensina, aspirina e farmaci per la riduzione dei lipidi e ulteriori 5,5 anni di follow-up), si è evidenziata una significativa riduzione dei casi di morte per cause cardiovascolari nei pazienti con DMT2 e microalbuminuria (9).

La scoperta più interessante riguarda il fatto che, sebbene la differenza significativa nei livelli dei fattori di rischio per le patologie cardiovascolari esistente tra i gruppi di studio alla fine dello studio di intervento (7,8 anni) sia scomparsa alla fine del periodo di follow-up (5,5 anni), i fattori di rischio, inclusa l'HbA<sub>1c</sub>, tendevano a convergere nei due gruppi di studio, mentre le curve relative al primo evento cardiovascolare continuavano a essere divergenti (9). Gli autori sottolineano che, sebbene il disegno sperimentale dello studio non permettesse di individuare il momento esatto in cui i fattori di rischio sono migliorati nel gruppo trattato con la terapia convenzionale, il miglioramento si è con ogni probabilità verificato precocemente durante il periodo di follow-up, dal momento che tutti i pazienti sono stati sottoposti a trattamento intensivo al completamento dello studio. Questo fatto suggerisce che un intervento eseguito in fase precoce, se paragonato a uno tardivo, potrebbe costituire, con ogni probabilità, la spiegazione della persistente divergenza negli endpoint cardiovascolari, piuttosto che una semplice relazione *time-to-effect* (9).

Complessivamente, le osservazioni sopra citate sostengono la tesi che l'ambiente glicemico nella fase iniziale viene tenuto a memoria e gli autori del DCCT/EDIC riportano questo fenomeno come "memoria metabolica" (6).

### Riscontri ottenuti in fase sperimentale che supportano il concetto di "memoria metabolica" e suoi possibili collegamenti con lo stress ossidativo

#### *In vitro e negli animali*

Diversi anni fa è stata segnalata la possibile esistenza di una "memoria iperglicemica" per una sovrapproduzione di fibronectina e collagene nelle cellule endoteliali di ratti diabetici che persiste dopo la normalizzazione dei livelli di glucosio (10). Il fenomeno della "memoria metabolica" è stato inoltre segnalato in

modelli animali di complicanze del diabete: la retinopatia ha continuato a progredire per un periodo di tempo considerevole anche dopo la correzione dell'iperglicemia nel cane (11) e nei ratti il trapianto delle isole (del Langherans) dopo diversi mesi di diabete ha arrestato la progressione della retinopatia in modo meno efficace rispetto a quando l'intervento è eseguito dopo sole poche settimane di malattia (12).

Brownlee ha recentemente evidenziato un eccesso di anione superossido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), una specie reattiva, nei mitocondri delle cellule endoteliali, in risposta all'iperglicemia, con l'instaurarsi di complicanze del diabete (13). Questa recente intuizione si ricollega, inoltre, alle 4 vie fondamentali che si presume siano coinvolte nello sviluppo di tali complicanze [aumento del flusso della via dei polioli, aumento della formazione dei prodotti finali della glicazione avanzata (AGE), attivazione della proteina chinasi C e aumento del flusso della via dell'esosamina] nella formulazione di un'ipotesi unificatrice in merito agli effetti dell'iperglicemia sullo sviluppo di complicanze del diabete (13-16).

Tuttavia, se l'eccesso di specie reattive rappresenta un elemento centrale nello sviluppo di complicanze diabetiche associate all'iperglicemia, potrebbe tale eccesso spiegare la persistenza del rischio di complicanze anche quando il livello di iperglicemia è diminuito o si è normalizzato?

L'effetto del ripristino di un valido controllo del glucosio sull'aumento dello stress ossidativo e nitrativo indotto dall'iperglicemia è stato in precedenza valutato nella retina di ratti mantenuti in condizioni di insufficiente controllo del glucosio prima di passare a un controllo efficace (16). Periodi di 2 o 6 mesi di controllo insufficiente (HbA<sub>1c</sub> >11,0%) nei ratti diabetici sono stati seguiti da 7 mesi di controllo efficace (HbA<sub>1c</sub> <5,5%). Il ripristino di un controllo efficace dopo 2 mesi di controllo insufficiente ha inibito il rialzo dei perossidi lipidici della retina e dei livelli di ossido di azoto (NO) per almeno il 50%, ma non ha dimostrato alcun effetto benefico sulla formazione di nitrotirosina.

Tuttavia, l'inversione dell'iperglicemia dopo 6 mesi di controllo insufficiente non ha avuto alcun effetto significativo sullo stress ossidativo e sui livelli di NO a livello della retina. Negli stessi ratti l'espressione della sintasi dell'ossido di azoto inducibile e i livelli di nitrotirosina sono rimasti aumentati di oltre l'80% in confronto a ratti normali o ratti tenuti sotto controllo efficace del glucosio per tutto il periodo (17). In uno stu-

dio analogo l'attività della caspasi-3 in ratti diabetici tenuti sotto controllo insufficiente del glucosio per 13 mesi è stata del 175% rispetto ai ratti normali (18). Il ripristino di un efficace controllo della glicemia dopo due mesi di controllo insufficiente ha portato a una parziale normalizzazione dell'attivazione della caspasi-3 indotta dall'iperglicemia (al 140% dei valori normali), mentre il ripristino di un efficace controllo dopo sei mesi di controllo insufficiente non ha prodotto effetti significativi sull'attivazione della caspasi-3.

Nello stesso studio l'attività del fattore- $\kappa$ B nucleare (NF- $\kappa$ B) è stata 2,5 volte più alta nei ratti diabetici tenuti sotto insufficiente controllo rispetto ai ratti normali. Il ripristino di un controllo efficiente dopo 2 mesi di controllo insufficiente ha determinato una parziale inversione di questo aumento, ma un controllo efficiente dopo 6 mesi di controllo insufficiente non ha determinato alcun effetto. L'inizio di un controllo efficiente poco tempo dopo l'induzione del diabete nel ratto ha impedito l'attivazione di caspasi-3 e NF- $\kappa$ B nella retina (18). In tempi più recenti anche Kowluru et al. hanno sostenuto questi risultati. In ratti diabetici 6 mesi di controllo glicemico insufficiente seguiti da 6 mesi di controllo glicemico efficiente non hanno determinato alcun effetto significativo sulla concentrazione di nitrotirosina nella retina, come anche sulla riduzione dell'attività della superossido-dismutasi manganese-dipendente (MnSOD) e sulla capacità antiossidante totale dei tessuti (19).

Simili risultati sono disponibili per il rene. Ratti diabetici sono stati tenuti sotto efficace controllo glicemico ( $HbA_{1c} = 5\%$ ) poco tempo dopo o 6 mesi dopo l'induzione dell'iperglicemia e sono stati sacrificati 13 mesi dopo l'induzione del diabete (20). Per i ratti nei quali il controllo efficiente è iniziato poco tempo dopo l'induzione del diabete lo stress ossidativo [misurato mediante i livelli di perossidi lipidici (LPO), 8-idrossi-2'-deossiguanosina (8-OHdG) e glutazione ridotto (GSH)] e i livelli di NO nelle urine e nella corteccia renale non presentavano differenze rispetto ai valori osservati nei ratti normali di controllo, ma nei casi in cui il ripristino di un controllo efficace è stato ritardato di 6 mesi dopo l'induzione del diabete lo stress ossidativo e i livelli di NO sono rimasti elevati nelle urine come anche nella corteccia renale (20).

La provata persistenza di una risposta pro-infiammatoria duratura e di insulino-resistenza indotte dall'iperglicemia dopo 48 ore di trattamento antiossidante negli adipociti in coltura (21) è in linea con questi risultati.

L'insieme di questi dati indica che lo stress ossidativo e l'NO indotti da iperglicemia, come anche l'attivazione dell'apoptosi e del NF- $\kappa$ B, possono essere impediti se il controllo glicemico efficace ha inizio in una fase molto precoce, ma non possono essere facilmente invertiti se si mantiene un controllo insufficiente per lunghi periodi di tempo. Pertanto, questi riscontri ci suggeriscono una persistenza in tali organi del danno indotto da iperglicemia, in particolar modo dell'aumento dello stress ossidativo anche dopo la normalizzazione della glicemia.

Il ruolo dello stress ossidativo nella conservazione della "memoria metabolica" è ulteriormente confermato da osservazioni recentemente dimostrate. Utilizzando lo stesso disegno sperimentale di Roy et al. (10), ossia 14 giorni di coltura in glucosio elevato seguiti da 7 giorni in glucosio normale, i dati mostrano che sia nelle cellule endoteliali sia nelle cellule della retina si verifica una persistenza della sovrapproduzione di radicali liberi dopo la normalizzazione del glucosio, accompagnata da un prolungamento dell'induzione di PKC- $\beta$ , NAD(P)H ossidasi, Bax, collagene e fibronectina, unitamente alla 3-nitrotirosina (22). Quantunque, per la prima volta, utilizzando diversi approcci a base di antiossidanti intracellulari, si è dimostrato che la riduzione della produzione intracellulare di radicali liberi, in particolar modo a livello mitocondriale, è in grado di spegnere la "memoria metabolica" (22).

Risultati analoghi sono stati riscontrati anche in ratti diabetici per i quali si è utilizzato come antiossidante l'acido  $\alpha$ -lipoico (22), una molecola che svolge un ruolo fondamentale nel metabolismo mitocondriale sia come coenzima nel ciclo dell'acido citrico, sia come potente antiossidante (23).

### *Nell'uomo*

L'endotelio è il principale organo implicato nello sviluppo di patologie cardiovascolari anche in soggetti diabetici (24). Tutti i fattori di rischio coinvolti nella patogenesi delle patologie cardiovascolari, come la dislipidemia e l'ipertensione, possono indurre disfunzioni endoteliali, fatto che si è ampiamente dimostrato essere un elemento premonitore di un futuro evento cardiovascolare (24). La presenza di disfunzioni endoteliali è stata spesso segnalata in soggetti diabetici (24). Tuttavia, sebbene diversi studi abbiano dimostrato che l'iperglicemia può indurre una disfunzione endoteliale in soggetti diabetici e non-diabetici

(25–27), non esiste una evidente dimostrazione del fatto che il controllo dell'iperglicemia sia in grado di correggere/riportare alla normalità la disfunzione endoteliale. In particolar modo, nei pazienti affetti da diabete tipo 1 (DMT1) è stata segnalata la presenza di disfunzioni endoteliali anche quando si era raggiunta una condizione di normoglicemia (28, 29). Inoltre, numerosi studi indicano che l'iperglicemia induce la disfunzione endoteliale mediante la produzione di stress ossidativo.

Uno studio condotto recentemente ha confermato che la disfunzione endoteliale persiste in pazienti diabetici tipo 1 anche dopo normalizzazione della glicemia (30).

È nota anche la possibilità di miglioramento della funzionalità endoteliale nel DMT1 mediante l'utilizzo di molecole con azione antiossidante, come la vitamina C (31) e l'acido  $\alpha$ -lipoico (32).

Tuttavia, per la prima volta, questo studio ha potuto dimostrare che la combinazione di vitamina C e normalizzazione della glicemia può quasi portare alla norma la funzionalità endoteliale nei pazienti affetti da DMT1 (30). A riguardo è inoltre interessante notare come *in vitro* l'acido  $\alpha$ -lipoico sia in grado di contrastare l'iperplasia neointimale indotta dall'iperglicemia inibendo la via metabolica dell'NF- $\kappa$ B/MMP-9 (33).

Il ruolo dello stress ossidativo in questo processo risulta essere di primaria importanza: nei casi in cui la funzionalità endoteliale è rimasta alterata 12 ore dopo la normalizzazione della glicemia o dopo 12 ore di trattamento con vitamina C i livelli di nitrotirosina, un valido marker per la perossinitrite e lo stress nitrosativo, erano ancora aumentati mentre, nei casi in cui la funzionalità endoteliale è stata normalizzata con la combinazione di controllo glicemico e vitamina C, anche la nitrotirosina è rientrata nei valori di normalità. L'aver accertato che solo un controllo simultaneo della glicemia e dello stress ossidativo è in grado di normalizzare la funzionalità endoteliale in pazienti diabetici tipo 1 è ovviamente un fatto di grande importanza. Anche un altro studio merita di essere considerato con attenzione. È stato recentemente ipotizzato che le oscillazioni dei valori di glucosio possono produrre effetti più deleteri sulla funzionalità endoteliale e sullo stress ossidativo rispetto a valori costantemente elevati di glucosio in pazienti normali e in diabetici tipo 2 (34).

In uno studio recente, in cui sono stati osservati gli effetti delle oscillazioni dei livelli glicemici sulla fun-

zionalità endoteliale e sullo stress ossidativo, nei soggetti normali la funzionalità endoteliale e i livelli di nitrotirosina non sono mai ritornati entro i livelli basali durante i periodi in cui i livelli glicemici erano normali, mentre ciò si è verificato nei pazienti diabetici (35). Al tempo stesso, sempre nei soggetti normali, si è manifestato un effetto di *carry-over* dovuto all'oscillazione dei valori di glucosio: dopo il secondo periodo di esposizione a glucosio alto il livello della disfunzione endoteliale e della nitrotirosina era peggiore rispetto a quanto osservato dopo il primo periodo di esposizione a glucosio elevato. Inoltre, la vitamina C è riuscita a normalizzare la funzionalità endoteliale e lo stress ossidativo solo nei soggetti normali ma non in quelli diabetici durante il periodo di iperglicemia, mentre nei pazienti diabetici in cui i livelli glicemici si erano normalizzati la somministrazione simultanea di vitamina C ha riportato a livelli quasi normali sia la funzionalità endoteliale sia lo stress ossidativo (35).

Una possibile ipotetica spiegazione di quanto riscontrato risiede nel fatto che due vie sono attive simultaneamente: una per l'effettivo livello glicemico e l'altra per il danno di lunga durata indotto nelle cellule endoteliali dall'iperglicemia cronica.

## Basi molecolari della “memoria metabolica”

### *AGE, glicazione delle proteine mitocondriali, stress ossidativo e “memoria metabolica”*

Gli studi sopra citati indicano che gli effetti di lunga durata dell'iperglicemia determinano un aumento dello stress ossidativo, mentre è stato precedentemente dimostrato che l'inibizione dello stress ossidativo è in grado di far cessare tali effetti (22). Si suppone che la sovrapproduzione di  $O_2^-$  a livello mitocondriale in condizioni di iperglicemia rappresenti l'“ipotesi unificatrice” che spiegherebbe lo sviluppo delle complicanze del diabete (15). Pertanto, è ragionevole pensare che i mitocondri giochino un ruolo importante nella riproduzione della “memoria metabolica”.

Si ritiene che l'iperglicemia cronica alteri la funzionalità mitocondriale mediante la glicazione delle proteine mitocondriali (36). I livelli di metilgliossale (MGO), un  $\alpha$ -dicarbonile sottoprodotto della glicolisi altamente reattivo, aumentano in soggetti diabetici (37). Il MGO reagisce immediatamente con l'arginina, la lisina e i gruppi sulfidrilici delle proteine (38), unita-

mente agli acidi nucleici (39), inducendo la formazione di un gran numero di AGE identificati in base alla struttura, sia nelle cellule target sia nel plasma (40). Il MGO esercita un effetto inibitorio sulla respirazione mitocondriale e le modificazioni indotte da esso hanno come target alcune specifiche proteine mitocondriali (41). Tali premesse sono importanti perché, per la prima volta, in uno studio recentemente condotto è stata descritta la relazione diretta tra la formazione di AGE intracellulari sulle proteine mitocondriali, la diminuzione della funzionalità mitocondriale e l'eccessiva formazione di specie reattive (42). Quindi, le proteine mitocondriali della catena respiratoria soggette a glicazione erano predisposte a produrre una maggiore quantità di  $O_2^-$ , indipendentemente dai livelli di iperglicemia. La glicazione delle proteine mitocondriali potrebbe essere un elemento che contribuisce a spiegare il fenomeno della "memoria metabolica". I mitocondri soggetti a glicazione presentano una sovrapproduzione di radicali liberi, indipendentemente dall'effettivo livello glicemico e ciò può innescare una catena di danni a livello del DNA mitocondriale (mtDNA) dalle conseguenze catastrofiche, quali diminuzione della funzionalità, ulteriore produzione di radicali liberi dell'ossigeno e lesioni cellulari (43), sostenendo così l'attivazione delle vie coinvolte nella patogenesi delle complicanze del diabete.

Inoltre, le proteine mitocondriali possono presentare danni o modifiche post-traduzionali come conseguenza di una sostanziale alterazione dello stato *redox* della cellula (43). D'altra parte, ciò potrebbe anche influire negativamente sulle proteine a destinazione mitocondriale che sono importate nella membrana esterna, nella membrana interna o nella matrice mediante specifiche componenti di trasporto del meccanismo di importazione (43). Infine, lo stress ossidativo potrebbe alterare l'espressione (44, 45) e il *turnover* (46) delle proteine mitocondriali e può forse determinare una perpetuazione del fenomeno.

La formazione di AGE è un fenomeno che si prolunga nel tempo. Nello studio DCCT la formazione di AGE è stata presa in esame in 215 pazienti sottoposti a biopsia cutanea un anno prima del completamento dello studio (47). Se paragonato a quello convenzionale, il trattamento intensivo era associato a livelli di AGE significativamente inferiori. Gli esiti in retinopatia, nefropatia e neuropatia (47) erano associati in modo significativo ai livelli di AGE ed è emerso che l'aumento dei livelli di AGE nella cute era associato in

modo significativo agli esiti in complicanze microvascolari (48) nello studio EDIC. Inoltre, si può ragionevolmente pensare che gli AGE possano anche spiegare i risultati ottenuti relativamente all'aumento dell'incidenza di complicanze cardiovascolari nello studio EDIC (6), in considerazione del fatto che è stata accertata l'associazione tra AGE e CVD (patologie cardiovascolari) anche in donne non diabetiche (49).

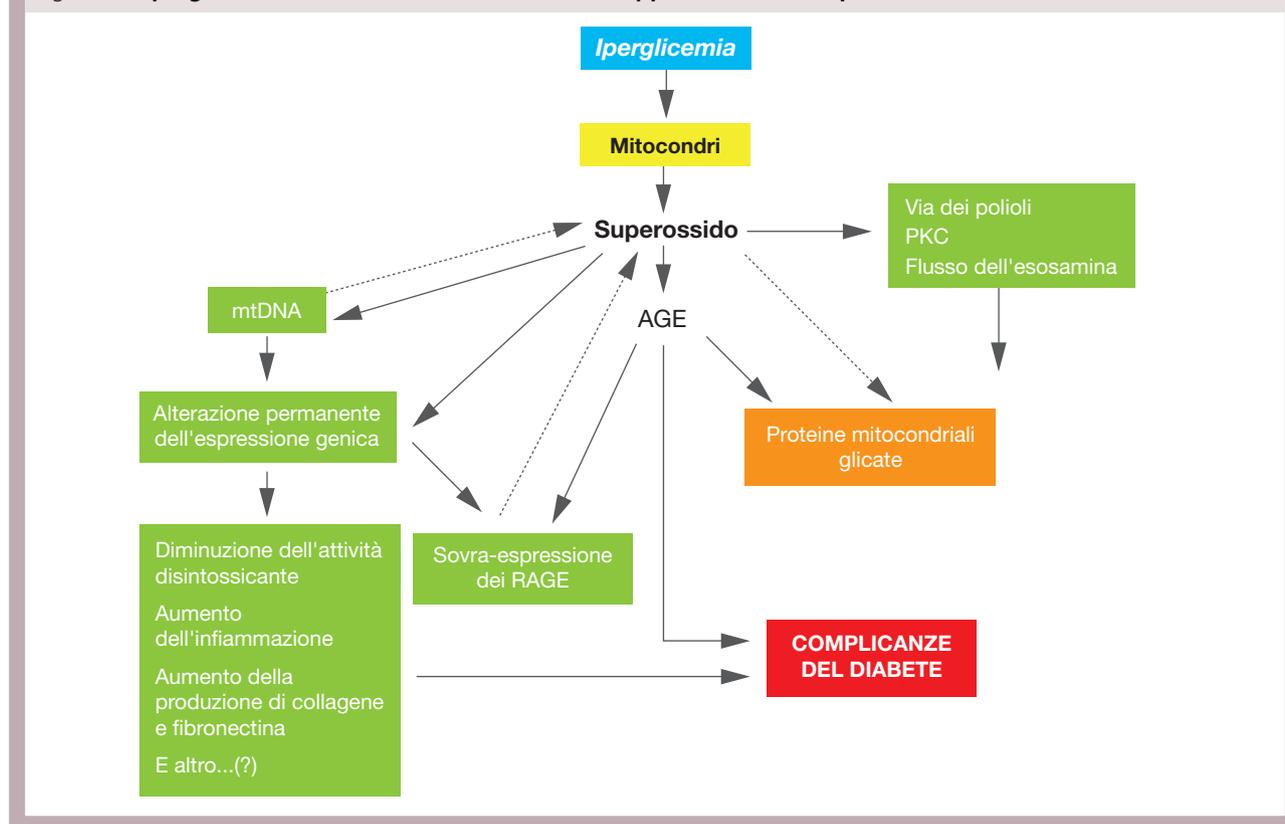
Particolarmente importante è l'evidenza clinica del fatto che la predisposizione delle proteine (con particolare riferimento al collagene) ad essere glicate risulta essere indipendente dall'effettivo livello di glucosio ambientale (48). È stata inoltre avanzata l'ipotesi che la glicazione del collagene extra-cellulare sia un marker per la glicazione delle proteine intra-cellulari e un fattore predittivo del danno degli organi bersaglio (48). Se la  $HbA_{1c}$  può essere parzialmente deglicata enzimaticamente (50), tale reazione non è stata ancora riscontrata per gli AGE incorporati nel collagene. Pertanto, si evince che la formazione di AGE nel collagene è un fenomeno irreversibile.

Quanto riscontrato indica che gli AGE e l'asse del loro recettore (RAGE) potrebbero essere coinvolti nella "memoria metabolica". Trova sempre maggiore riscontro il fatto che sia gli AGE sia il legame con il loro recettore scatenino lo stress ossidativo (51). Il legame AGE-RAGE si traduce nella produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) intracellulari e nella conseguente attivazione del fattore di trascrizione *redox*-sensibile, NF- $\kappa$ B, nelle cellule della parete vascolare; ciò favorisce l'espressione di un gran numero di geni correlati all'aterosclerosi e dei RAGE stessi (52). Quindi, è plausibile pensare che condizioni di auto-sostenibilità collegate alla formazione degli AGE contribuiscano alla formazione della "memoria metabolica" (Figura 1).

### *Stress ossidativo, espressione genica e "memoria metabolica"*

È stato recentemente ed eccellentemente dimostrato che nell'uomo l'iperglicemia condiziona l'espressione dei geni coinvolti nell'azione di disintossicazione dai radicali liberi (53). Molti geni, la maggior parte dei quali responsabili del controllo dell'azione di eliminazione dei radicali liberi, sono sotto-regolati durante l'iperglicemia, favorendo in questo modo la generazione e il mantenimento dello stress ossidativo (54). Inoltre, è di particolare interesse il fatto che un trend di crescita delle attività trascrizionali dei geni mitocondriali sia stato individuato nella "memoria" degli adipociti (21).

Figura 1 L'iperglicemia intracellulare induce una sovrapproduzione di superossido a livello mitocondriale



La sovrapproduzione del superossido rappresenta il primo evento chiave nell'attivazione di tutte le altre vie coinvolte nella patogenesi delle complicanze del diabete, quali il flusso della via dei polioli, l'aumento della formazione di AGE, l'attivazione della proteina chinasi C e l'aumento del flusso della via dell'esosamina. Le proteine mitocondriali sono soggette a glicazione in condizioni di iperglicemia e tale effetto induce i mitocondri a sovra-produrre l'anione superossido, condizione che non risulta essere dipendente dall'effettivo livello glicemico. Il legame AGE-RAGE porta alla produzione di ROS a livello intracellulare che favorisce l'espressione degli stessi RAGE. Lo stress ossidativo può alterare l'espressione genica, favorendo il permanere di un'iperazione dei radicali liberi. Il mtDNA può condizionare l'espressione genica e, allo stesso tempo, può contribuire alla sovrapproduzione di radicali liberi a livello mitocondriale. Queste condizioni di auto-sostenibilità, che portano a una permanente generazione di stress ossidativo indipendentemente dagli effettivi livelli di glicemia, possono contribuire al manifestarsi della "memoria metabolica".

Mod. da (24, 73)

D'altra parte, la scoperta di vie e geni specifici condizionati dagli ossidanti ha portato alla formulazione dell'ipotesi secondo la quale le ROS hanno la funzione di messaggeri sub-cellulari nelle vie di regolazione e di trasduzione del segnale (55). Una possibile ipotesi prevede che molti di questi geni possano rimanere sopra o sotto-regolati anche dopo la normalizzazione della glicemia. Al momento, questa è solo un'ipotesi di tipo congetturale anche se, tuttavia, in altre circostanze è stato già dimostrato che lo stress ossidativo può indurre una alterazione permanente dell'espressione genica che favorisce la senescenza della cellula (56) e che il mtDNA (DNA mitocondriale prodotto dall'insulto ossidativo) modifica stabilmente l'espressione genica come il danno ossidativo (57).

È altresì importante notare che, probabilmente per

via della sua vicinanza alla maggiore fonte di produzione di ossidanti o a causa di un sistema di riparazione del DNA poco efficace, il mtDNA è generalmente considerato anche più sensibile al danno ossidativo rispetto al DNA del nucleo (58). Un aumento del danneggiamento del mtDNA porta inevitabilmente alla compromissione della funzionalità e dell'integrità del mitocondrio. Si ritiene che i mitocondri danneggiati rilascino un maggior numero di ROS e mettano in moto un circolo vizioso per il quale l'aumento di DNA danneggiato comporta un aumento di ROS che a sua volta determina un aumento del DNA danneggiato (58).

In conclusione, si potrebbe ipotizzare che nella "memoria metabolica" la cascata di eventi coincida con quella suggerita da Brownlee (15) (la fonte di  $O_2^-$  è ancora il mitocondrio), ma anche che la produzione di

specie reattive non sia correlata alla presenza di iperglicemia (essendo essa subordinata alla precedente produzione di AGE che può sostenere la sovra-espressione del RAGE), al livello di glicazione delle proteine mitocondriali e al quantitativo di mtDNA prodotto condizioni, queste, in grado di indurre un'alterazione dell'espressione genica che può persistere anche dopo la normalizzazione della glicemia. Tale ipotesi è descritta in Figura 1.

## Implicazioni e prospettive terapeutiche

La sempre più crescente evidenza del fatto che l'iperglicemia lasci in una fase molto precoce un'impronta sullo sviluppo di future complicanze comporta importanti implicazioni terapeutiche: sembra essere obbligatorio iniziare molto precocemente un trattamento aggressivo dell'iperglicemia in pazienti diabetici. Tuttavia, se questa strategia può essere facilmente accettata in pazienti diabetici tipo 1, alcuni dubbi possono essere sollevati per i pazienti tipo 2 poiché tale approccio può prevedere un uso anticipato dell'insulina. In aggiunta, uno stretto controllo dell'iperglicemia potrebbe anche richiedere il trattamento dell'iperglicemia "postprandiale" (59, 60), non solo per via del fatto che essa è un forte apporto di HbA<sub>1c</sub> nei pazienti diabetici tipo 1 e tipo 2 (61, 62), ma anche perché si accompagna spesso a una specifica formazione sia di specie reattive (63) sia di AGE, non solo nel plasma (64), ma anche a livello intracellulare (65).

Un'altra possibile strategia è quella di ridurre la formazione di AGE, l'espressione di RAGE e la produzione di stress ossidativo in concomitanza alla normalizzazione dei livelli di glucosio. Numerosi composti hanno dimostrato la loro capacità di bloccare la formazione di AGE. La metformina e il pioglitazone hanno mostrato *in vitro* una capacità di impedire la formazione di AGE (66). Gli ACE-inibitori e i bloccanti dei recettori per l'angiotensina (AT)-1 sono composti utilizzati per il controllo della pressione arteriosa; tuttavia, essi sono anche in grado di ridurre la formazione di AGE (67). Certamente il telmisartan sotto-regola i livelli di mRNA del RAGE e conseguentemente inibisce la produzione di superossido (68). Curiosamente, questi farmaci fungono anche da antiossidanti (16) e, almeno per quanto riguarda gli AT-1 bloccanti, è stata riscontrata un'azione specifica contro lo stress ossidativo indotto

dall'iperglicemia e la "memoria metabolica" (69, 70).

L'acido  $\alpha$ -lipoico (acido tioctico o acido 6,8-ditio-octanoico o ALA) rappresenta un'altra molecola dotata di una potente azione antiossidante e viene attualmente impiegato nel trattamento della polineuropatia diabetica (71, 72). Esso gioca un ruolo fondamentale nel metabolismo mitocondriale, partecipando come cofattore enzimatico in diverse reazioni del ciclo di Krebs e, allo stesso tempo, svolgendo una importantissima attività antiossidante. Infatti, a causa del basso potenziale ossido-riduttivo del sistema lipoato/diidrolipoato, l'ALA ridotto è in grado di partecipare sia a reazioni di neutralizzazione diretta dei ROS, sia a reazioni di riduzione delle forme ossidate delle altre molecole con attività antiossidante (vitamina C e glutazione). Infine, grazie alla sua struttura, l'ALA può attraversare sia i compartimenti acquosi sia quelli lipidici della cellula. Questa peculiare proprietà dell'ALA gli consente di migliorare notevolmente la sua capacità di "intrappolare" i radicali liberi (73).

In ultimo, anche un composto antidiabetico per via orale, la gliclazide, potrebbe essere potenzialmente utile nell'abolizione della "memoria" (74). Sommando tutte queste informazioni, si potrebbe immaginare una strategia futura che preveda non solo un trattamento aggressivo precoce della glicemia, ma anche l'impiego simultaneo di composti attivi nei confronti della formazione di AGE (75), unitamente a un altro composto in grado di colpire in modo specifico la produzione di specie reattive a livello mitocondriale (76). Un intervento di questo tipo, che deve ovviamente essere validato da studi specifici, potrà sicuramente ridurre l'effetto memoria dell'iperglicemia.

## Conclusioni

Trova sempre maggiore conferma la tesi secondo la quale l'iperglicemia è in grado di lasciare, in una fase molto precoce, un'impronta nelle cellule del sistema vascolare e degli organi target, favorendo lo sviluppo futuro di complicanze. Inoltre, i riscontri ottenuti indicano che questa "memoria" può manifestarsi anche quando si raggiunge un efficace controllo della glicemia. A questo fenomeno è stato dato il nome di "memoria metabolica" (6). Quanto emerso solleva molti quesiti in merito alla gestione terapeutica del diabete. In particolare, l'esistenza di una "memoria metabolica" suggerisce che sia strettamente necessario effettuare un

trattamento aggressivo dell'iperglicemia in una fase molto precoce. Tale questione acquisisce particolare importanza proprio oggi, quando i dati ottenuti nello studio ACCORD sollevano dubbi su una terapia troppo aggressiva per l'iperglicemia.

## Bibliografia

1. Drugs for Diabetes. In Treatment Guidelines from the Medical Letter, p. 57–62, 2005.
2. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 329: 977–986, 1993.
3. Writing Team for the Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications Research Group. Effect of intensive therapy on the microvascular complications of type 1 diabetes mellitus. *JAMA* 287: 2563–2569, 2002.
4. Writing Team for the Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications Research Group. Sustained effect of intensive treatment of type 1 diabetes mellitus on development and progression of diabetic nephropathy: The Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (EDIC) study. *JAMA* 290: 2159–2167, 2003.
5. Nathan DM, Lachin J, Cleary P, Orchard T, Brillon DJ, Backlund JY, O'Leary DH, Genuth S; Diabetes Control and Complications Trial; Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications Research Group. Intensive diabetes therapy and carotid intima-media thickness in type 1 diabetes mellitus. *N Engl J Med* 348: 2294–2303, 2003.
6. Nathan DM, Cleary PA, Backlund JY, Genuth SM, Lachin JM, Orchard TJ, Raskin P, Zinman B; Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (DCCT/EDIC) Study Research Group. Intensive diabetes treatment and cardiovascular disease in patients with type 1 diabetes. *N Engl J Med* 353: 2643–2653, 2005.
7. Colagiuri S, Cull CA, Holman RR; UKPDS Group. Are lower fasting plasma glucose levels at diagnosis of type 2 diabetes associated with improved outcomes? UK Prospective Diabetes Study 61. *Diabetes Care* 25: 1410–1417, 2002.
8. Holman RR, Paul SK, Bethel MA, et al. 10-year follow-up of intensive glucose control in type 2 diabetes. *N Engl J Med* 359: 1577–1589, 2008. Epub 2008 Sep 10.
9. Gaede P, Lund-Andersen H, Parving HH, Pedersen O. Effect of a multifactorial intervention on mortality in type 2 diabetes. *N Engl J Med* 358: 580–591, 2008.
10. Roy S, Sala R, Cagliero E, Lorenzi M. Overexpression of fibronectin induced by diabetes or high glucose: Phenomenon with a memory. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 404–408, 1990.
11. Engerman RL, Kern TS. Progression of incipient diabetic retinopathy during good glycemic control. *Diabetes* 36: 808–812, 1987.
12. Hammes HP, Klinzing I, Wiegand S, et al. Islet transplantation inhibits diabetic retinopathy in the sucrose-fed diabetic Cohen rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34: 2092–2096, 1993.
13. Nishikawa T, Edelstein D, Du X-L, et al. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* 404: 787–790, 2000.
14. Du XL, Edelstein D, Rossetti L, et al. Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the exosome pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp1 glycosylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 12222–12226, 2002.
15. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 414: 813–820, 2001.
16. Ceriello A. New insights on oxidative stress and diabetic complications may lead to a "causal" antioxidant therapy. *Diabetes Care* 26: 1589–1596, 2003.
17. Kowluru RA. Effect of reinstatement of good glycemic control on retinal oxidative stress and nitrate stress in diabetic rats. *Diabetes* 52: 818–823, 2003.
18. Kowluru RA, Chakrabarti S, Chen S. Re-institution of good metabolic control in diabetic rats and activation of caspase-3 and nuclear transcriptional factor (NF-kappaB) in the retina. *Acta Diabetol* 41: 194–199, 2004.
19. Kowluru RA, Kanwar M, Kennedy A. Metabolic memory phenomenon and accumulation of peroxynitrite in retinal capillaries. *Exp Diabetes Res* 2007: ID 21976, 2007.
20. Kowluru RA, Abbas SN, Odenbach S. Reversal of hyperglycemia and diabetic nephropathy: Effect of reinstatement of good metabolic control on oxidative stress in the kidney of diabetic rats. *J Diabetes Complications* 18: 282–288, 2004.
21. Lin Y, Berg AH, Iyengar P, et al. The hyperglycemia-induced inflammatory response in adipocytes: The role of reactive oxygen species. *J Biol Chem* 280: 4617–4626, 2005.
22. Ihnat MA, Thorpe JE, Kamat CD, et al. Reactive oxygen species mediate a cellular 'memory' of high glucose stress signalling. *Diabetologia* 50: 1523–1531, 2007.
23. Biliska A, Wlodek L. Lipoic acid - the drug of the future? *Pharmacol Rep* 57: 570–577, 2005.
24. Esper RJ, Nordaby RA, Vilariño JO, et al. Endothelial dysfunction: A comprehensive appraisal. *Cardiovasc Diabetol* 5: 4, 2006.
25. Giugliano D, Marfella R, Coppola L, et al. Vascular effects of acute hyperglycemia in humans are reversed by L-arginine. Evidence for reduced availability of nitric oxide during hyperglycemia. *Circulation* 97: 1783–1790, 1997.
26. Ceriello A, Taboga C, Tonutti L, et al. Evidence for an independent and cumulative effect of postprandial hypertriglyceridemia and hyperglycemia on endothelial dysfunction and oxidative stress generation: Effects of short- and long-term simvastatin treatment. *Circulation* 106: 1211–1218, 2002.
27. Sørensen VR, Mathiesen ER, Clausen P, et al. Impaired vascular function during short-term poor glycaemic control in type 1 diabetic patients. *Diabet Med* 22: 871–876, 2005.
28. Huvers FC, De Leeuw PW, Houben AJ, et al. Endothelium-dependent vasodilatation, plasma markers of endothelial function, and adrenergic vasoconstrictor responses in type 1 diabetes under near-normoglycemic conditions. *Diabetes* 48: 1300–1307, 1999.
29. Dogra G, Rich L, Stanton K, Watts GF. Endothelium-dependent and independent vasodilation studies at normoglycaemia in type I diabetes mellitus with and without microalbuminuria. *Diabetologia* 44: 593–601, 2001.

30. Ceriello A, Kumar S, Piconi L, et al. Simultaneous control of hyperglycemia and oxidative stress normalizes endothelial function in type 1 diabetes. *Diabetes Care* 30: 649–654, 2007.
31. Mullan BA, Ennis CN, Fee HJ, et al. Pretreatment with intravenous ascorbic acid preserves endothelial function during acute hyperglycaemia (R1). *Clin Exp Pharmacol Physiol* 32: 340–350, 2005.
32. Morcos M, Borcea V, Isermann B, et al. Effect of alpha-lipoic acid on the progression of endothelial cell damage and albuminuria in patients with diabetes mellitus: An exploratory study. *Diabetes Res Clin Pract* 52: 175–183, 2001.
33. Kim HS, Kim HJ, Park KG, et al. Alpha-lipoic acid inhibits matrix metalloproteinase-9 expression by inhibiting NF-kappaB transcriptional activity. *Exp Mol Med* 39: 106–113, 2007.
34. Brownlee M, Hirsch IB. Glycemic variability: A hemoglobin A1c-independent risk factor for diabetic complications. *JAMA* 295: 1707–1708, 2006.
35. Ceriello A, Esposito K, Piconi L, et al. Oscillating glucose is more deleterious on endothelial function and oxidative stress than mean glucose in normals and type 2 diabetic patients. *Diabetes* 2008 Feb 25 [Epub ahead of print].
36. Kang Y, Edwards LG, Thornalley PJ. Effect of methylglyoxal on human leukaemia 60 cell growth: Modification of DNA G1 growth arrest and induction of apoptosis. *Leuk Res* 20: 397–405, 1996.
37. Beisswenger PJ, Howell SK, Nelson RG, et al. Alpha-oxoaldehyde metabolism and diabetic complications. *Biochem Soc Trans* 31: 1358–1363, 2003.
38. Lo TW, Westwood ME, McLellan AC, et al. Binding and modification of proteins by methylglyoxal under physiological conditions. A kinetic and mechanistic study with N alpha-acetylglycine, N alpha-acetylcysteine, and N alpha-acetyllysine, and bovine serum albumin. *J Biol Chem* 269: 32229–32305, 1994.
39. Papoulis A, al-Abed Y, Bucala R. Identification of N2-(1-carboxyethyl)guanine (CEG) as a guanine advanced glycosylation end product. *Biochemistry* 34: 648–655, 1995.
40. Thornalley PJ, Battah S, Ahmed N, et al. Quantitative screening of advanced glycation endproducts in cellular and extracellular proteins by tandem mass spectrometry. *Biochem J* 375: 581–592, 2003.
41. Rosca MG, Monnier VM, Szweda LI, Weiss MF. Alterations in renal mitochondrial respiration in response to the reactive oxoaldehyde methylglyoxal. *Am J Physiol* 283: F52–F59, 2002.
42. Rosca MG, Mustata TG, Kinter MT, et al. Glycation of mitochondrial proteins from diabetic rat kidney is associated with excess superoxide formation. *Am J Physiol* 289: F420–F430, 2005.
43. Zorov DB, Juhaszova M, Sollott SJ. Mitochondrial ROS-induced ROS release: An update and review. *Biochim Biophys Acta* 1757: 509–517, 2006.
44. Reznick RM, Shulman GI. The role of AMP-activated protein kinase in mitochondrial biogenesis. *J Physiol* 574: 33–39, 2006.
45. Gibson BW. The human mitochondrial proteome: Oxidative stress, protein modifications and oxidative phosphorylation. *Int J Biochem Cell Biol* 37: 927–934, 2005.
46. Elfering SL, Haynes VL, Traaseth NJ, et al. Aspects, mechanism, and biological relevance of mitochondrial protein nitration sustained by mitochondrial nitric oxide synthase. *Am J Physiol* 286: H22–H29, 2004.
47. Monnier VM, Bautista O, Kenny D, Sell DR, Fogarty J, Dahms W, Cleary PA, Lachin J, Genuth S. Skin collagen glycation, glycoxidation, and crosslinking are lower in subjects with long-term intensive versus conventional therapy of type 1 diabetes: relevance of glycated collagen products versus HbA1c as markers of diabetic complications. DCCT Skin Collagen Ancillary Study Group. *Diabetes Control and Complications Trial*. *Diabetes* 48: 870–880, 1999.
48. Genuth S, Sun W, Cleary P, Sell DR, Dahms W, Malone J, Sivitz W, Monnier VM; DCCT Skin Collagen Ancillary Study Group. Glycation and carboxymethyllysine levels in skin collagen predict the risk of future 10-year progression of diabetic retinopathy and nephropathy in the diabetes control and complications trial and epidemiology of diabetes interventions and complications participants with type 1 diabetes. *Diabetes* 54: 3103–3111, 2005.
49. Kilhovd BK, Juutilainen A, Lehto S, et al. High serum levels of advanced glycation end products predict increased coronary heart disease mortality in nondiabetic women but not in nondiabetic men: A population-based 18-year follow-up study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25: 815–820, 2005.
50. Wu X, Monnier VM. Enzymatic deglycation of proteins. *Arch Biochem Biophys* 419: 16–24, 2003.
51. Lander HM, Tauras JM, Ogiste JS, et al. Activation of the receptor for advanced glycation end products triggers a p21(ras)-dependent mitogen-activated protein kinase pathway regulated by oxidant stress. *J Biol Chem* 272: 17810–17814, 1997.
52. Tanaka N, Yonekura H, Yamagishi S, et al. The receptor for advanced glycation end products is induced by the glycation products themselves and tumor necrosis factor-alpha through nuclear factor-kappa B, and by 17betaestradiol through Sp-1 in human vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 275: 25781–25790, 2000.
53. Meugnier E, Faraj M, Rome S, et al. Acute hyperglycemia induces a global downregulation of gene expression in adipose tissue and skeletal muscle of healthy subjects. *Diabetes* 56: 992–999, 2007.
54. Meugnier E, Rome S, Vidal H. Regulation of gene expression by glucose. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 10: 518–522, 2007.
55. Allen RG, Tresini M. Oxidative stress and gene regulation. *Free Radic Biol Med* 28: 463–499, 2000.
56. Abdelmohsen K, Kuwano Y, Kim HH, Gorospe M. Posttranscriptional gene regulation by RNA-binding proteins during oxidative stress: Implications for cellular senescence. *Biol Chem* 389: 243–255, 2008.
57. Schroeder P, Gremmel T, Berneburg M, Krutmann J. Partial depletion of mitochondrial DNA from human skin fibroblasts induces a gene expression profile reminiscent of photoaged skin. *J Invest Dermatol* 2008 Mar 13. [Epub ahead of print].
58. Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408: 239–247, 2000.
59. Ceriello A, Hanefeld M, Leiter L, et al. Postprandial glucose regulation and diabetic complications. *Arch Intern Med* 164: 2090–2095, 2004.
60. Ceriello A. Postprandial hyperglycemia and diabetes complications: Is it time to treat? *Diabetes* 54: 1–7, 2005.
61. Rohlfing CL, Wiedmeyer HM, Little RR, et al. Defining the relationship between plasma glucose and HbA1c: Analysis of glu-

- cose profiles and HbA1c in the Diabetes Control and Complications Trial. *Diabetes Care* 25: 275–278, 2002.
62. Monnier L, Lapinski H, Colette C. Contributions of fasting and postprandial plasma glucose increments to the overall diurnal hyperglycemia of type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 26: 881–885, 2003.
  63. Ceriello A, Quagliari L, Piconi L, et al. Effect of postprandial hypertriglyceridemia and hyperglycemia on circulating adhesion molecules and oxidative stress generation and the possible role of simvastatin treatment. *Diabetes* 53: 701–710, 2004.
  64. Ahmed N, Babaei-Jadidi R, Howell SK, et al. Glycated and oxidized protein degradation products are indicators of fasting and postprandial hyperglycemia in diabetes. *Diabetes Care* 28: 2465–2471, 2005.
  65. Schiekofer S, Andrassy M, Chen J, et al. Acute hyperglycemia causes intracellular formation of CML and activation of ras, p42/44 MAPK, and nuclear factor kappaB in PBMCs. *Diabetes* 52: 621–633, 2003.
  66. Rahbar S, Natarajan R, Yerneni K, et al. Evidence that pioglitazone, metformin and pentoxifylline are inhibitors of glycation. *Clin Chim Acta* 301: 65–77, 2000.
  67. Miyata T, van Ypersele DS, Ueda Y, et al. Angiotensin II receptor antagonists and angiotensin converting enzyme inhibitors lower in vitro the formation of advanced glycation end products: Biochemical mechanisms. *J Am Soc Nephrol* 13: 2478–2487, 2002.
  68. Yoshida T, Yamagishi S, Nakamura K, et al. Telmisartan inhibits AGE-induced C-reactive protein production through downregulation of the receptor for AGE via peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activation. *Diabetologia* 49: 3094–3099, 2006.
  69. Ceriello A, Assaloni R, Da Ros R, et al. Effect of atorvastatin and irbesartan, alone and in combination, on postprandial endothelial dysfunction, oxidative stress, and inflammation in type 2 diabetic patients. *Circulation* 111: 2518–2524, 2005.
  70. Ceriello A, Piconi L, Esposito K, Giugliano D. Telmisartan shows an equivalent effect of vitamin C in further improving endothelial dysfunction after glycemia normalization in type 1 diabetes. *Diabetes Care* 30: 1694–1698, 2007.
  71. Ziegler D, Nowak H, Kempler P, et al. Treatment of symptomatic diabetic polyneuropathy with the antioxidant alpha-lipoic acid: A meta-analysis. *Diabet Med* 21: 114–121, 2004.
  72. Ziegler D, Ametov A, Barinov A, et al. Oral treatment with alpha-lipoic acid improves symptomatic diabetic polyneuropathy: The SYDNEY 2 trial. *Diabetes Care* 29: 2365–2370, 2006.
  73. Roy S, Packer L. Redox regulation of cell functions by alpha-lipoate: Biochemical and molecular aspects. *Biofactors* 7: 263–267, 1998.
  74. Corngali M, Piconi L, Ihnat M, Ceriello A. Evaluation of gliclazide ability to attenuate the hyperglycaemic 'memory' induced by high glucose in isolated human endothelial cells. *Diabetes Metab Res Rev* 24: 301–309, 2007.
  75. Lapolla A, Traldi P, Fedele D. Importance of measuring products of non-enzymatic glycation of proteins. *Clin Biochem* 38: 103–115, 2005.
  76. Sheu SS, Nauduri D, Anders MW. Targeting antioxidants to mitochondria: A new therapeutic direction. *Biochim Biophys Acta* 1762: 256–265, 2006.

