

Infiammazione, insulino-resistenza e disfunzione endoteliale: un crocevia pericoloso

Giorgio Sesti

Dipartimento di Medicina Sperimentale e Clinica, Università degli Studi "Magna Græcia" di Catanzaro

Il diabete tipo 2 (DMT2) è la malattia metabolica più diffusa nel mondo e la sua prevalenza è in continua crescita, in particolare nei paesi in via di sviluppo. L'aumentata prevalenza del DMT2 è in larga parte imputabile all'incremento dell'obesità e alla concomitante riduzione dell'attività fisica. Il DMT2 costituisce un grave problema di salute pubblica per il suo carattere di patologia progressiva associata a complicanze micro e macrovascolari e ad aumentato rischio di mortalità. Alla patogenesi del DMT2 concorrono sia una ridotta azione insulinica sui tessuti periferici (fegato, muscolo e tessuto adiposo) sia difetti della secrezione insulinica (1). Nel DMT2 l'iperglicemia non si presenta isolata, ma fa parte integrante di una costellazione di alterazioni metaboliche, definita sindrome metabolica, che comprende non solo componenti "classiche", quali dislipidemia, ipertensione arteriosa e obesità centrale, ma anche "nuove" componenti, quali alterazioni dell'assetto emocoagulativo, disfunzione endoteliale e uno stato di infiammazione cronica di basso grado.

Crescenti evidenze suggeriscono che infiammazione, insulino-resistenza e disfunzione endoteliale possano interagire tra loro nel determinare un "incrocio pericoloso" di fattori patogenetici responsabili dell'insorgenza del DMT2 e delle sue complicanze cardiovascolari. Nel corso degli ultimi anni il nostro gruppo ha affrontato l'intricato tema delle relazioni esistenti tra infiammazione, insulino-resistenza e disfunzione endoteliale attraverso un approccio multiplo clinico, genetico e molecolare. In questa rassegna saranno presentati i principali risultati degli studi compiuti dal nostro gruppo in questo campo di ricerca.

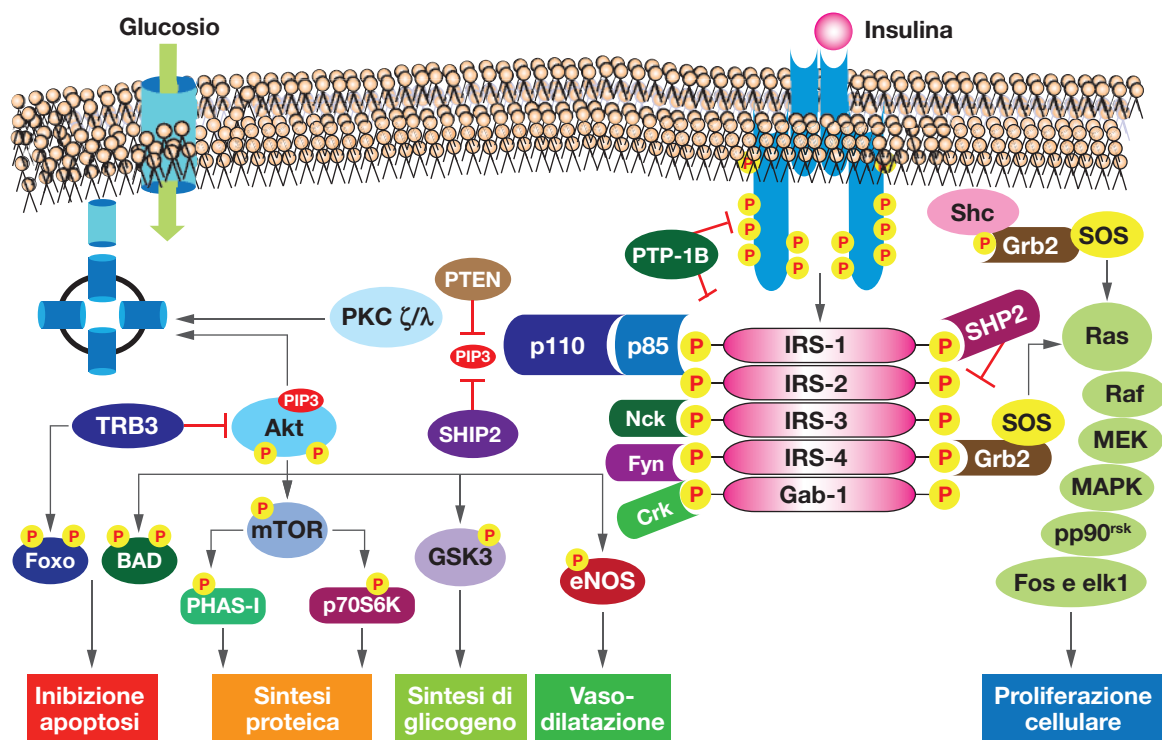
Meccanismi molecolari di insulino-resistenza

Al fine di comprendere meglio i risultati degli studi genetici e molecolari, risulta opportuno un breve cenno sulla fisiopatologia dell'insulino-resistenza e sui meccanismi molecolari che ne sono alla base.

L'insulina esercita i suoi effetti interagendo con il proprio recettore che è presente sulle membrane plasmatiche delle cellule bersaglio. Il recettore è una glicoproteina composta da due subunità α extracellulari e due subunità β , costituite da una porzione extracellulare, una transmembrana e una intracellulare (2). La porzione citoplasmatica della subunità β è dotata di un'intrinseca attività tirosino-chinasica, cioè della capacità di fosforilare i residui tirosinici di varie proteine, utilizzando l'ATP come donatore di fosfato. L'interazione dell'insulina con il recettore induce la rapida auto-fosforilazione della subunità β e, successivamente, la fosforilazione di vari substrati endogeni che agiscono da mediatori del segnale biologico attraverso l'attivazione di una cascata fosforilativa (Figura 1). Tra i diversi substrati del recettore insulinico, un ruolo chiave è svolto dalle proteine appartenenti alla famiglia dell'*insulin receptor substrate* (IRS) (nell'uomo essenzialmente IRS-1 e IRS-2) (3). I residui di tirosina fosforilati di queste proteine sono riconosciuti e legati da uno specifico dominio, chiamato SH2, che è presente in numerose proteine "adattatrici", quali la subunità regolatoria p85 della fosfatidilinositolo-(PI)3-chinasi, Grb2 e Nck. Le proteine adattatrici sono prive di attività enzimatica, ma sono in grado di interagire con altri enzimi, amplificando in tal modo la cascata di trasmissione del segnale insulinico.

Lettura Premio Celso, XXIII Congresso della Società Italiana di Diabetologia. Padova, 9-12 giugno 2010

Figura 1 Rappresentazione schematica del segnale di trasduzione dell'insulina



Essa avviene lungo due vie principali, rappresentate dai sistemi di Ras e della PI3-chinasi. L'attivazione dei sistemi di Ras e della PI3-chinasi trasmette il segnale agli effettori finali dell'azione dell'ormone all'interno della cellula o nel nucleo, modificandone in questo modo le funzioni (Figura 1). Nell'ambito della trasduzione del segnale insulinico, un ruolo chiave è svolto dall'enzima Akt che è attivato dalla PI3-chinasi e che regola una serie di azioni metaboliche dell'insulina, tra cui il trasporto di glucosio, la traslocazione dei trasportatori GLUT4 sulla membrana plasmatica, la sintesi di glicogeno e la produzione di ossido di azoto. Diversi regolatori negativi del segnale insulinico, quali gli enzimi "fosfatasi" (PTP-1, SHP-2, LAR), sono stati identificati come candidati coinvolti nella patogenesi molecolare dell'insulino-resistenza in quanto modulano la trasmissione del messaggio biologico dell'insulina a vari livelli. Oltre che dall'azione delle fosfatasi, l'inibizione delle proteine coinvolte nella trasmissione del segnale insulinico può essere causata anche da fosforilazione di residui diversi da quelli normalmente implicati nella loro attivazione. Ad esempio, l'IRS-1 è fosforilata su vari residui di serina da numerose chinasi, quali *mitogen-*

activated protein kinase (MAPK) o *Jun N-terminal protein kinase* (JNK), in risposta alla stimolazione con citochine o acidi grassi liberi. Sono state inoltre identificate delle molecole che agiscono da antagonisti naturali della trasmissione del segnale insulinico e tali proteine sono in grado di legare molecole di trasduzione del segnale insulinico e di inibirne la funzione. Una delle proteine ad azione inibitrice sul segnale di trasduzione dell'insulina è TRB-3 che è in grado di legarsi ad Akt, inibendone l'attivazione.

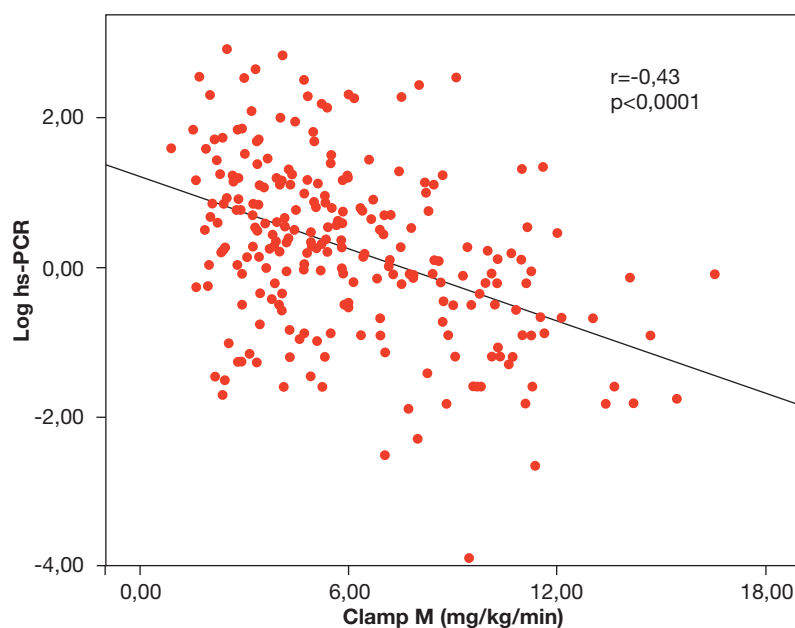
Relazione tra infiammazione e insulino-resistenza

Una prima evidenza a supporto di una stretta relazione tra infiammazione e insulino-resistenza è l'osservazione che i livelli circolanti di interleuchina (IL)-6 e di proteina C reattiva ad alta sensibilità (hsPCR) sono aumentati nei soggetti affetti da ridotta tolleranza glucidica (*impaired glucose tolerance*, IGT) e nei diabetici tipo 2 rispetto ai soggetti normo-tolleranti o con alterata glicemia a digiuno (*impaired fasting glucose*, IFG) parteci-

panti al CATAnzaro MEtabolic RiSk factors Study (CATAMERIS), uno studio osservazionale focalizzato sulla identificazione di fattori di rischio cardio-metabolici in una popolazione caucasica residente in Calabria (4). Sia i livelli circolanti di IL-6 sia quelli di hsCRP (Figura 2) sono inversamente correlati con la sensibilità insulinica, valutata mediante la tecnica del clamp euglicemico-iperinsulinemico o per mezzo di indici derivati dal carico orale di glucosio, quale l'indice di Matsuda (4, 5). Ulteriori evidenze genetiche suggeriscono un ruolo dei fattori infiammatori nella patogenesi dell'insulino-resistenza. Un primo esempio è costituito dal polimorfismo C-174G nel promotore del gene di IL-6 che è in grado di influenzarne la trascrizione. In esperimenti *in vitro* è stato dimostrato che l'allele G ha un'aumentata attività trascrizionale sia in condizioni basali sia in risposta ad altri stimoli infiammatori, quali i lipopolisaccaridi o la citochina IL-1. In uno studio condotto su soggetti non diabetici abbiamo verificato che questo polimorfismo risulta associato a un incremento dei livelli circolanti di IL-6 (maggiori nei soggetti portatori del genotipo GG) (6). I portatori del genotipo GG mostravano una riduzione della sensibilità insulinica (misurata mediante clamp euglicemico-iperinsulinemi-

co) rispetto ai portatori dell'allele C, anche dopo correzione per età, sesso e indice di massa corporea (BMI). Diverse evidenze suggeriscono che il tessuto adiposo è una delle principali fonti di IL-6 circolante. Per valutare se il polimorfismo fosse in grado di influenzare l'espressione di IL-6 nel tessuto adiposo abbiamo studiato 77 obesi sottoposti a bendaggio gastrico. I soggetti portatori del genotipo GG mostravano un aumento dell'espressione di mRNA di IL-6, valutata per mezzo della tecnica della *real-time* PCR, che risultava associata a un incremento dell'insulino-resistenza, misurata mediante l'indice HOMA (*homeostasis model assessment*) (6). Un secondo esempio di evidenza genetica che suggerisce la stretta relazione tra fattori infiammatori e insulino-resistenza è costituito da un polimorfismo del gene di IL-18 (+183A/G, rs5744292) che è localizzato nella regione 3'UTR (3'*untranslated region*). Questo polimorfismo è stato associato a una ridotta espressione di mRNA di IL-18 in linfociti immortalizzati. In uno studio condotto su 1479 soggetti non diabetici partecipanti al CATAMERIS abbiamo osservato che i portatori del genotipo AA erano caratterizzati da un incremento dei livelli circolanti di IL-18 e da una riduzione della sensibilità insulinica, misurata mediante l'indice di Matsuda (7).

Figura 2 I livelli di hs-PCR sono inversamente correlati con la sensibilità insulinica valutata mediante la tecnica del clamp euglicemico-iperinsulinemico in un gruppo di soggetti non diabetici (n=245) partecipanti al CATAMERI Study

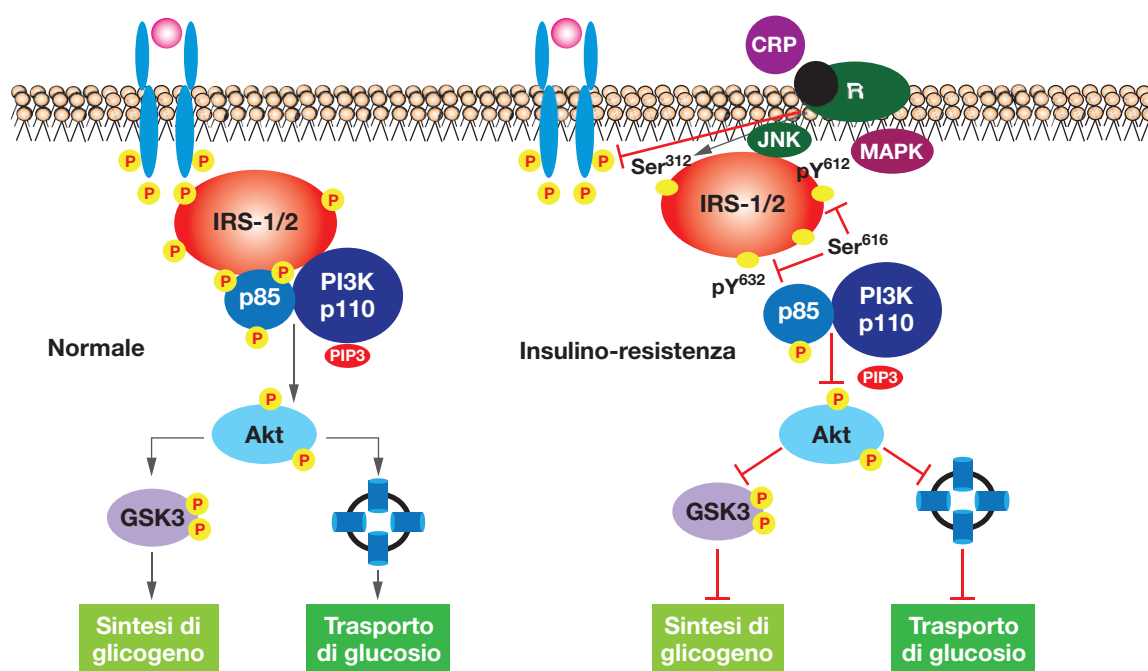


A livello molecolare sono stati descritti diversi effetti diretti delle citochine sul segnale di trasduzione dell'insulina. Uno dei meccanismi più interessanti è costituito dalla fosforilazione in serina del substrato del recettore insulinico IRS-1 mediato dall'attivazione di "stress chinasi" che sono stimulate dalle citochine infiammatorie; tra queste occorre annoverare anche la PCR. Infatti la PCR, oltre ad essere un marker sensibile di infiammazione, è dotata di azioni pro-infiammatorie dirette. In uno studio condotto su cellule L6 muscolari di ratto abbiamo dimostrato che il trattamento con PCR ricombinante, priva di contaminanti, è in grado di indurre una condizione di insulino-resistenza caratterizzata da una riduzione della traslocazione dei trasportatori GLUT4 sulla membrana plasmatica, del trasporto di glucosio in risposta all'insulina e della sintesi di glicogeno (8). Tali difetti erano associati a una riduzione della fosforilazione dei siti tirosinici del substrato IRS-1, con conseguente diminuzione dell'attivazione dell'enzima PI3-chinasi e di Akt. La riduzione della fosforilazione in tirosina di IRS-1 era causata dalla fosforilazione sulle serine 307 e 612 indotta dalle chinasi JNK e MAPK, rispettivamente, in risposta alla stimolazione con PCR (Figura 3). A riprova di ciò, il

blocco di JNK e MAPK con inibitori specifici ripristinava la normale attivazione del segnale di trasduzione dell'insulina che comprende la fosforilazione in tirosina di IRS-1, l'attivazione di PI3-chinasi e di Akt, il trasporto di glucosio, la traslocazione dei trasportatori GLUT4 sulla membrana plasmatica e la sintesi di glicogeno (8). A ulteriore conferma del ruolo diretto di PCR, abbiamo analizzato gli effetti di questa molecola in un topo transgenico che esprimeva livelli "infiammatori" di PCR. Gli animali mostravano a 6 mesi di vita un aumento della glicemia e dell'insulinemia e una ridotta tolleranza glicidica dopo somministrazione intraperitoneale di glucosio. Tali effetti metabolici erano associati a un difetto di attivazione di Akt nel muscolo scheletrico e nel fegato e a un incremento dell'attività di MAPK negli stessi organi.

Infine, in uno studio prospettico (follow-up medio 4,5 anni), condotto su 400 soggetti ipertesi di neo-diagnosi partecipanti al CATAMERIS, abbiamo osservato che elevati livelli di hsPCR (tertile più elevato) erano predittivi di sviluppo di DMT2 con un *hazard ratio* (HR) di 2,94 dopo correzione per vari fattori confondenti, quali l'età, il sesso, il BMI, il fumo, la pressione arteriosa e i livelli di colesterolo (9).

Figura 3 **Rappresentazione schematica degli effetti della PCR sul segnale di trasduzione dell'insulina in cellule muscolari di ratto**



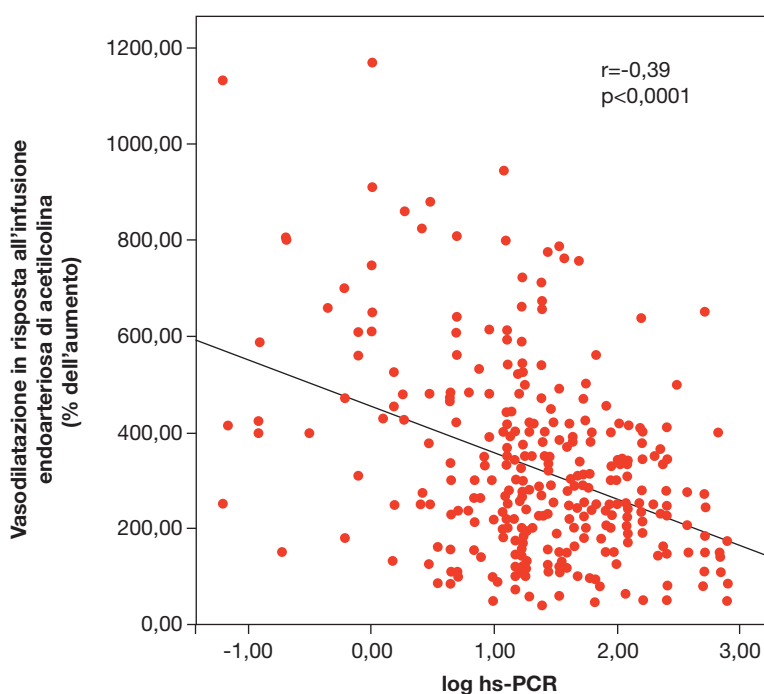
Relazione tra infiammazione e disfunzione endoteliale

Crescenti evidenze suggeriscono che l'endotelio costituisce un vero e proprio organo, capace di elaborare diverse molecole attive, in grado di modulare la funzione della parete vasale e di regolare l'attività delle cellule ematiche e delle proteine del sistema coagulativo che vengono in contatto con la sua superficie luminale. Alcune di queste molecole sono secrete dalle cellule endoteliali nelle immediate vicinanze (secrezione paracrina) per esercitare i loro effetti sulla parete vasale o sono immesse nella circolazione (secrezione endocrina) per svolgere la loro azione a distanza, come nel caso delle sostanze che concorrono al controllo della pressione arteriosa (es. ossido di azoto). Dei mediatori vasoattivi secreti dall'endotelio, l'ossido di azoto (NO) è prodotto sia costitutivamente sia in risposta all'azione di vari stimoli meccanici e neuro-ormonali, tra i quali l'insulina e la leptina (10, 11). La disfunzione endoteliale compare quando la capacità delle cellule endoteliali di elaborare le sostanze vaso-attive risulta compromessa e, in particolare, quando si attenua la produzione

endoteliale di NO. La disfunzione endoteliale è uno dei primi eventi nella patogenesi dell'aterosclerosi e si manifesta con una diminuzione della vasodilatazione flusso-mediata e con una ridotta risposta agli agonisti che normalmente determinano vasodilatazione endotelio-dipendente, quale l'acetilcolina.

Diverse evidenze suggeriscono che l'infiammazione possa indurre disfunzione endoteliale e, successivamente, aterosclerosi. Sia i livelli di IL-6 sia quelli di hs-PCR (Figura 4) sono inversamente correlati con la funzione endoteliale valutata mediante pletismografia *strain-gauge* che misura le variazioni del flusso ematico dell'avambraccio durante infusione intra-arteriosa di acetilcolina (11). Ulteriori evidenze genetiche indicano un ruolo dei fattori infiammatori nella patogenesi della disfunzione endoteliale. In uno studio, condotto in collaborazione con un gruppo di ricerca dell'Università di Tübingen, abbiamo dimostrato che il polimorfismo T-960A (rs3918359) nel promotore del gene *chemokine receptor* (CCR) 2, che codifica per il recettore della *monocyte chemoattractant protein* (MCP)-1, una chemochina capace di attirare i monociti nella parete vasale, è in grado di influenzare la tra-

Figura 4 Correlazione tra hs-PCR e funzione endoteliale misurata mediante determinazione delle variazioni del flusso ematico dell'avambraccio durante infusione intra-arteriosa di acetilcolina in un gruppo di soggetti non diabetici (n=320) partecipanti al CATAMERI Study

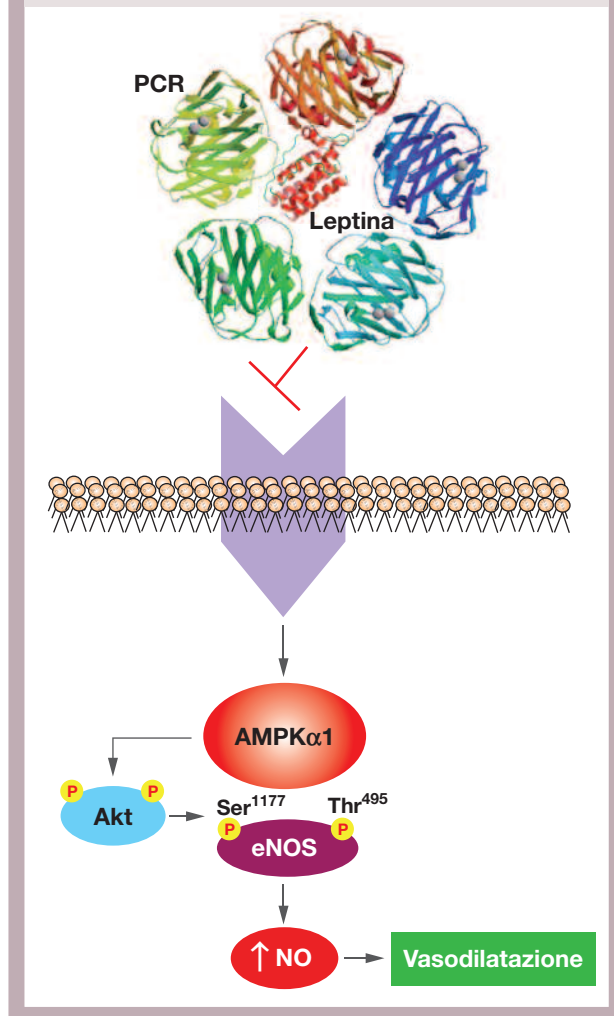


scrizione del gene e la migrazione trans-endoteliale dei monociti. I portatori del genotipo dell'allele T mostravano una riduzione della funzione endoteliale misurata mediante pletismografia *strain-gauge* o vasodilatazione flusso-indotta (12).

A livello molecolare sono stati descritti diversi meccanismi con cui molecole infiammatorie possono interferire con l'attività vaso-dilatatoria di ormoni, quali l'insulina e la leptina. È stato dimostrato che la leptina è in grado di stimolare la produzione e il rilascio di NO sia in cellule endoteliali umane sia in roditori. Attraverso studi di *silencing* di RNA, che impiegano la tecnica del *small interfering RNA* (siRNA), abbiamo verificato che la via di trasduzione utilizzata dalla leptina coinvolge l'attivazione AMPK α 1/Akt/eNOS (*endothelial NO synthase*) (Figura 5) (11). L'attivazione di questa via risulta ridotta dalla pre-incubazione con PCR. Questi risultati confermano la precedente osservazione che la PCR non solo è un marker di infiammazione e una citochina con effetti pro-infiammatori, ma è anche una *binding protein* della leptina. Questi nostri dati suggeriscono un nuovo meccanismo d'azione pro-aterogeno della PCR e sottolineano uno stretto legame tra obesità, leptino-resistenza e disfunzione endoteliale, aperto a interventi farmacologici in grado di alterare l'interazione leptina-PCR.

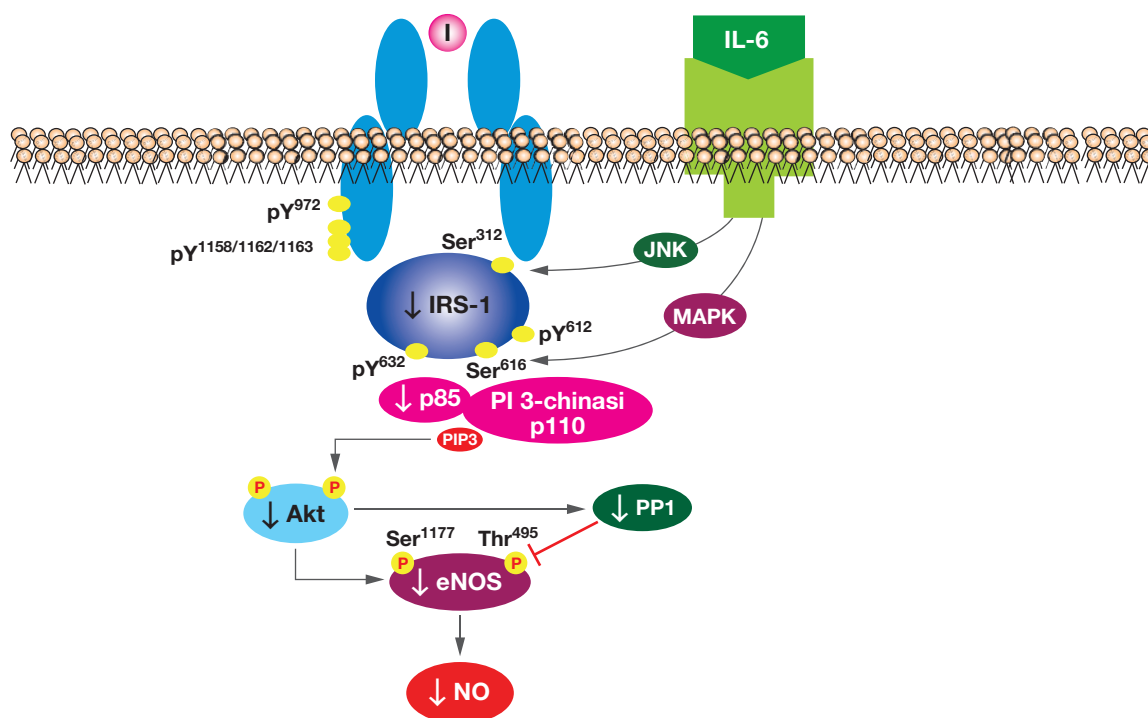
Un secondo meccanismo di disfunzione endoteliale è quello indotto dall'attivazione di "stress chinasi" in risposta a citochine infiammatorie quale IL-6. Come riportato sopra, elevati livelli circolanti di IL-6 sono associati a disfunzione endoteliale. In uno studio condotto su cellule endoteliali umane (*human umbilical vein endothelial cells*, HUVEC) abbiamo dimostrato che il trattamento con IL-6 è in grado di indurre una condizione di insulino-resistenza endoteliale caratterizzata da una riduzione dell'attivazione di eNOS e della produzione di NO (13). Tali difetti erano associati a una diminuzione della fosforilazione dei siti tirosinici (Tyr612) del substrato IRS-1 che interagiscono con la subunità regolatoria p85 dell'enzima PI3-chinasi, con conseguente riduzione della sua attività enzimatica e della fosforilazione di Akt. La diminuzione della fosforilazione in tirosina di IRS-1 era causata dalla fosforilazione in Ser307 e Ser612 indotta dalle chinasi JNK e MAPK, rispettivamente, in risposta alla stimolazione con IL-6 (Figura 6). L'attività enzimatica di eNOS è regolata dalla fosforilazione in molteplici siti tra cui la serina 1177 (Ser1177) e la treonina 495 (Thr495). Il sito Ser1177 è rapidamente fosforilato in risposta all'insulina e induce un aumento della attività

Figura 5 Rappresentazione schematica degli effetti della PCR sul segnale di trasduzione della leptina in cellule endoteliali umane



dell'enzima con conseguente sintesi di NO. Al contrario, il sito Thr495 è costitutivamente fosforilato e determina una inibizione dell'attività dell'enzima. L'insulina induce la fosforilazione di Ser1177 tramite l'attivazione di Akt, mentre causa la defosforilazione di Thr495 mediante l'attivazione Akt-dipendente della fosfatasi *protein phosphatase* (PP) 1. L'esposizione delle HUVEC a IL-6 risultava in un'alterazione dell'attivazione di eNOS sul sito Ser1177 e della defosforilazione di eNOS sul sito Thr495 in risposta all'insulina (Figura 6). L'inibizione dell'attività di JNK e MAPK, mediante RNA *silencing* degli enzimi o con inibitori specifici, ripristinava l'azione vaso-dilatatoria dell'insulina mediata dal segnale di trasduzione comprendente la via IRS-1/PI3-chinasi/Akt/eNOS insieme alla produzione e al rilascio di NO.

Figura 6 Rappresentazione schematica degli effetti di IL-6 sul segnale di trasduzione dell'insulina in cellule endoteliali umane

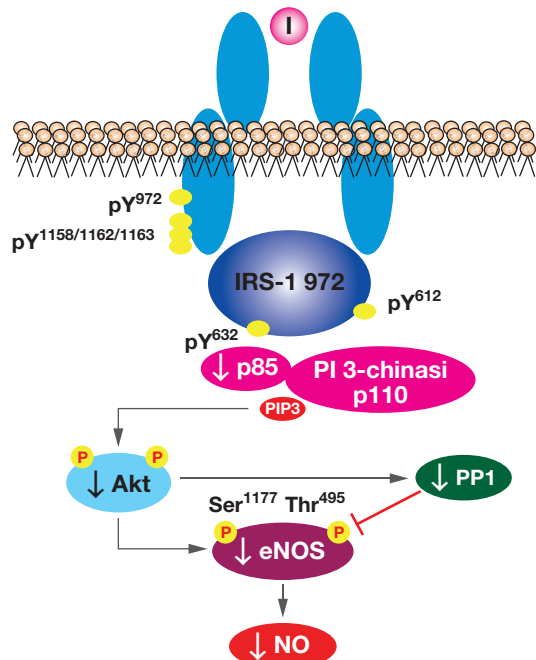


Relazione tra insulino-resistenza e disfunzione endoteliale

L'insulina esercita effetti diretti e indiretti sull'endotelio e alterazioni della funzione endoteliale sono associate a condizioni di insulino-resistenza. Una prima evidenza a supporto di una stretta relazione tra insulino-resistenza e disfunzione endoteliale deriva dall'osservazione che esiste una forte correlazione inversa tra l'indice HOMA e la funzione endoteliale, valutata mediante pletisografia *strain-gauge* in soggetti non diabetici partecipanti al CATAMERIS (9). Ulteriori evidenze genetiche suggeriscono un ruolo dell'insulino-resistenza nella patogenesi della disfunzione endoteliale. Un primo esempio è costituito dal polimorfismo Gly972Arg del substrato IRS-1 del recettore insulinico (14, 15). Questo polimorfismo causa un cambiamento aminoacidico della proteina, inducendo una alterazione della fosforilazione nei residui tirosinici Tyr941 e Tyr989 di IRS-1, due siti particolarmente importanti per l'interazione di IRS-1 con la subunità regolatoria p85 dell'enzima PI3-chinasi (16). A questo difetto di interazione si associa una riduzione dell'attività enzimatica di PI3-chinasi in

risposta all'insulina, con conseguente diminuzione dell'attivazione di Akt e dei suoi substrati (quale la glicogeno-sintasi chinasi (GSK)-3) e con riduzione della sintesi di glicogeno, del trasporto di glucosio e della traslocazione dei trasportatori GLUT4 sulla superficie cellulare. Tali effetti sono stati dimostrati sia in esperimenti in cellule muscolari scheletriche di ratto L6 trasfettate ed esprimenti la variante Gly972Arg di IRS-1 (17), sia in studi *in vivo* con animali transgenici esprimenti la variante di IRS-1 (18). Lo studio degli effetti funzionali del polimorfismo Gly972Arg di IRS-1 nell'uomo ha mostrato come questo polimorfismo si associ a una riduzione della sensibilità insulinica (misurata mediante clamp euglicemico iper-insulinemico (19)) e a una più precoce età di insorgenza di DMT2 (OR 1,48 95%CI 1,17-1,87) (20). Gli effetti vascolari del polimorfismo Gly972Arg di IRS-1 sono stati studiati in HUVEC ottenute da portatrici della variante. In tali studi è stato dimostrato che la presenza del polimorfismo altera la trasduzione del segnale dell'insulina mediato attraverso la via IRS-1/PI3-chinasi/Akt, con conseguente riduzione dell'attivazione di eNOS e della produzione di NO (Figura 7) (21). Questi risultati ricavati con linee cellu-

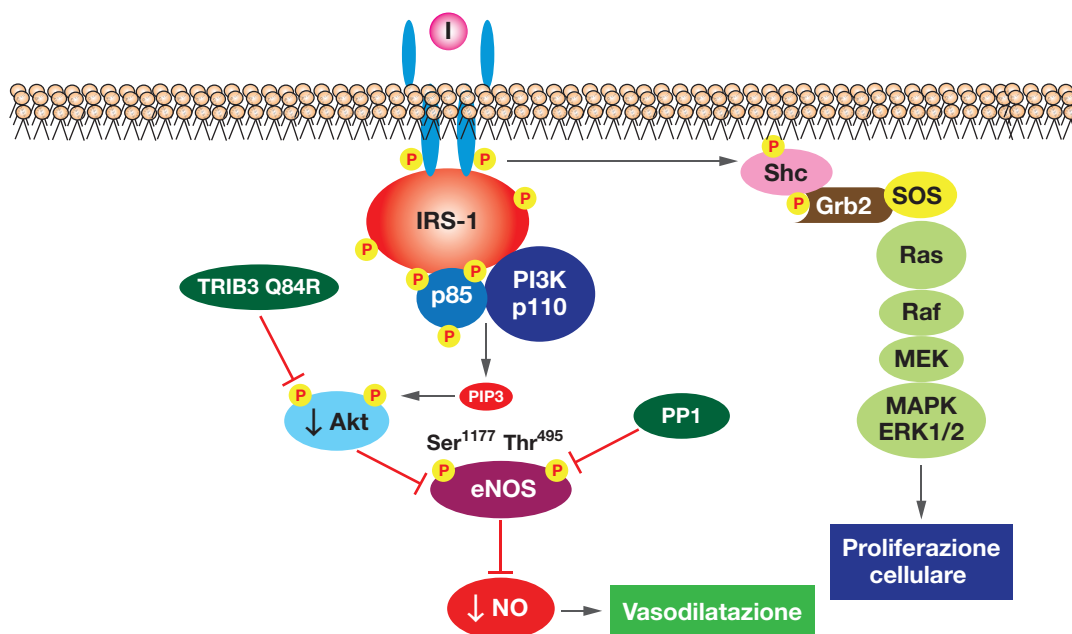
Figura 7 Rappresentazione schematica degli effetti della variante Gly972Arg di IRS-1 sul segnale di trasduzione dell'insulina in cellule endoteliali umane



lari primarie sono stati confermati *in vivo* in soggetti ipertesi di neo-diagnosi. I portatori della variante Arg972 di IRS-1 mostravano una diminuzione della funzione endoteliale valutata mediante pletismografia *strain-gauge* rispetto ai soggetti *wild type* (22).

Un ulteriore modello genetico di insulino-resistenza associato ad alterazione della sensibilità insulinica e disfunzione endoteliale è costituito dal polimorfismo Gln84Arg del gene TRB-3, un inibitore di Akt (Figura 8). Questa variante determina un aumento della funzione inibitoria di TRB-3 con riduzione del segnale a valle di Akt (23). Nell'uomo i portatori dell'allele Arg84 hanno una diminuzione della sensibilità insulinica misurata mediante clamp euglicemico iper-insulinemico (24). Gli effetti vascolari del polimorfismo Gln84Arg del gene TRB-3 sono stati studiati in HUVEC ottenute da portatrici della variante. In tali studi è stato dimostrato che la presenza dell'allele Arg84 altera la trasduzione del segnale dell'insulina mediato da Akt, con conseguente riduzione della attivazione di eNOS e della produzione di NO (Figura 8) (25). Questi risultati ricavati con linee cellulari primarie sono stati confermati *in vivo* in soggetti ipertesi di neo-diagnosi. I portatori della variante Arg84 del gene TRB-3 mostravano una riduzione della funzione endoteliale valutata mediante pletismografia

Figura 8 Rappresentazione schematica degli effetti della variante Gln84Arg di TRB-3 sul segnale di trasduzione dell'insulina in cellule endoteliali umane



strain-gauge rispetto ai soggetti portatori del genotipo Gln/Gln. È interessante notare che l'allele Arg84 del gene TRB-3 causa una insulino-resistenza selettiva in quanto inibisce solo la via Akt-dipendente, mentre lascia aperta e, anzi, iperattiva la via che coinvolge l'attivazione delle MAPK. Infatti, nelle HUVEC portatrici della variante Arg84 la risposta di MAPK all'insulina appare intatta, risultando in un aumento dell'espressione di molecole di adesione, quali VCAM (*vascular cell adhesion molecule*)-1 e ICAM (*inter-cellular adhesion molecule*)-1 e in un'incrementata adesione dei monociti. A conferma del ruolo pro-aterogeno del polimorfismo Gln84Arg del gene TRB-3, i portatori dell'allele Arg84 avevano un aumento dello spessore medio-intimale misurato mediante ecocolorDoppler.

Infine, l'importanza dell'insulino-resistenza nella patogenesi della disfunzione endoteliale è confermata da uno studio di intervento non farmacologico in un gruppo di 28 soggetti obesi insulino-resistenti (26). Tali soggetti sono stati sottoposti a un programma dietetico associato a un incremento dell'attività fisica della durata di 14-16 settimane. Al termine del programma i soggetti avevano perduto peso in associazione a una riduzione dell'insulino-resistenza, valutata mediante l'indice HOMA. La funzione endoteliale, misurata come incremento della vasodilatazione indotta da acetilcolina, risultava migliorata e questo miglioramento era direttamente correlato con la riduzione di peso e dell'indice HOMA (26). All'analisi multivariata il maggiore predittore di vasodilatazione endotelio-dipendente era l'indice HOMA, che spiegava il 44,5% della sua variazione, mentre il BMI spiegava il 2,3% della variazione, a ulteriore conferma della stretta relazione tra insulino-resistenza e funzione endoteliale.

Relazione tra disfunzione endoteliale e insulino-resistenza

Alcune evidenze suggeriscono che la disfunzione endoteliale possa indurre una condizione di insulino-resistenza o di DMT2. È noto che l'attività di eNOS è regolata da diversi inibitori endogeni tra cui la *dimethylarginine* (ADMA). ADMA è derivato dal catabolismo delle proteine contenenti residui di arginina che sono metilati dall'enzima *protein arginine methyltransferase type I* (PRMT I). L'ADMA prodotto all'interno delle cellule endoteliali è metabolizzato dall'enzima *dimethylarginine dimethylaminohydrolase* (DDAH)2. In uno studio,

condotto su soggetti ipertesi di neodiagnosi, i livelli di ADMA erano inversamente correlati con la funzione endoteliale valutata mediante pletismografia *strain-gauge* (27). Inoltre, i livelli di ADMA erano significativamente correlati con l'indice HOMA, suggerendo che un'alterazione della funzione endoteliale possa contribuire a indurre insulino-resistenza (28). Questa idea è supportata da evidenze genetiche. È stato identificato un polimorfismo nel promotore del gene DDAH2 (rs9267551) che è capace di modulare l'attività trascrizionale del gene. Infatti, l'allele G è in grado di aumentare la trascrizione del gene, con conseguente aumento dell'espressione di mRNA di DDAH2 in HUVEC ottenute dal cordone ombelicale di donne portatrici della variante. In uno studio condotto su soggetti non diabetici è stato osservato come i portatori della variante G avessero un aumento della sensibilità insulinica, valutata mediante clamp euglicemico-iperinsulinemico.

Nel complesso, queste evidenze suggeriscono che la disfunzione endoteliale possa indurre insulino-resistenza. Una forte evidenza a sostegno di questa ipotesi deriva dall'osservazione che in uno studio prospettico (follow-up medio 4,5 anni), condotto su 400 soggetti ipertesi di neo-diagnosi partecipanti al CATAMERIS, è stato riscontrato che la vasodilatazione indotta dall'acetilcolina era inversamente correlata al rischio di sviluppo di DMT2 (9). In una regressione multipla di Cox un incremento del 100% della vasodilatazione indotta dall'acetilcolina era protettivo per l'incidenza di diabete [HR 0,77 (0,61-0,99), p=0,04] dopo correzione per vari fattori confondenti, quali l'età, il sesso, il BMI, il fumo, la pressione arteriosa, la PCR e i livelli di colesterolo.

Conclusioni

Infiammazione, insulino-resistenza e disfunzione endoteliale sono strettamente interconnesse tra loro. Fattori genetici e ambientali possono contribuire a determinare la comparsa di tutte e tre le alterazioni fisiopatologiche che si manifestano associate in un complicato intreccio. L'importanza di queste alterazioni fisiopatologiche risiede nel fatto che esse precedono e aggravano importanti condizioni patologiche, quali il diabete e le malattie cardiovascolari. L'osservazione che trattamenti non farmacologici possano correggere questi difetti sottolinea l'importanza di un approfondito inquadramento clinico - e possibilmente genetico - dei soggetti a rischio di sviluppo di DMT2.

Bibliografia

1. Sesti G. Pathophysiology of insulin resistance. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 20: 665-679, 2006.
2. Sesti G, Federici M, Lauro D, et al. Molecular mechanism of insulin resistance in type 2 diabetes mellitus: Role of the insulin receptor variant forms. *Diabetes Metab Res Rev* 17: 363-373, 2001.
3. Sesti G, Federici M, Hribal ML, et al. Defects of the insulin receptor substrate (IRS) system in human metabolic disorders. *FASEB J* 15: 2099-2111, 2001.
4. Cardellini M, Andreozzi F, Laratta E, et al. Plasma interleukin-6 levels are increased in subjects with impaired glucose tolerance but not in those with impaired fasting glucose in a cohort of Italian Caucasians. *Diabetes Metab Res Rev* 23: 141-145, 2007.
5. Andreozzi F, Laratta E, Cardellini M, et al. Plasma interleukin-6 levels are independently associated with insulin secretion in a cohort of Italian-caucasian nondiabetic subjects. *Diabetes* 55: 2021-2024, 2006.
6. Cardellini M, Perego L, D'Adamo M, et al. C-174G polymorphism in the promoter of the interleukin-6 gene is associated with insulin resistance. *Diabetes Care* 28: 2007-2012, 2005.
7. Presta I, Andreozzi F, Succurro E, et al. IL-18 gene polymorphism and metabolic syndrome. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 19: e5-e6, 2009.
8. D'Alessandris C, Lauro R, Presta I, Sesti G. C-Reactive protein induces phosphorylation of insulin receptor substrate-1 on Ser307 and Ser612 in L6 myocytes, thereby impairing the insulin signalling pathway that promotes glucose transport. *Diabetologia* 50: 840-849, 2007.
9. Perticone F, Maio R, Sciacqua A, et al. Endothelial dysfunction and C-reactive protein are risk factors for diabetes in essential hypertension. *Diabetes* 57: 167-171, 2008.
10. Andreozzi F, Laratta E, Sciacqua A, et al. Angiotensin II impairs the insulin signalling pathway promoting production of nitric oxide by inducing phosphorylation of IRS-1 on Ser312 and Ser616 in human umbilical vein endothelial cells. *Circ Res* 94: 1211-1218, 2004.
11. Procopio C, Andreozzi F, Laratta E, et al. Leptin-stimulated endothelial nitric-oxide synthase via an AMPK/Akt signalling pathway is attenuated by interaction with C reactive protein. *Endocrinology* 150: 3584-3593, 2009.
12. Rittig K, Peter A, Baltz KM, et al. The CCR2 promoter polymorphism T-960A, but not the serum MCP-1 level, is associated with endothelial function in prediabetic individuals. *Atherosclerosis* 198: 338-346, 2008.
13. Andreozzi F, Laratta E, Procopio C, et al. Interleukin-6 impairs the insulin signaling pathway promoting production of nitric oxide in human umbilical vein endothelial cells. *Mol Cell Biol* 27: 2372-2383, 2007.
14. Imai Y, Fusco A, Suzuki Y, et al. Variant sequences of insulin receptor substrate-1 in patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 79: 1655-1658, 1994.
15. Sesti G. Insulin receptor substrates (IRSs) polymorphisms and type 2 diabetes mellitus. *Pharmacogenomics* 1: 343-357, 2000.
16. Porzio O, Federici M, Hribal ML, et al. The Gly(972)-->Arg amino acid polymorphism in IRS-1 impairs insulin secretion in pancreatic beta cells. *J Clin Invest* 104: 357-364, 1999.
17. Hribal ML, Federici M, Porzio O, et al. The Gly->Arg972 amino acid polymorphism in IRS-1 affects glucose metabolism in skeletal muscle cells. *J Clin Endocrinol Metab* 85: 2004-2013, 2000.
18. Hribal ML, Tornei F, Pujol A, et al. Transgenic mice overexpressing human G972R IRS-1 show impaired insulin action and insulin secretion. *J Cell Mol Med* 12: 2096-2106, 2008.
19. Marini MA, Frontoni S, Mineo D, et al. The Arg972 variant in insulin receptor substrate-1 is associated with an atherogenic profile in offspring of type 2 diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab* 88: 3368-3371, 2003.
20. Morini E, Prudente S, Succurro E, et al. IRS1 G972R polymorphism and type 2 diabetes: A paradigm for the difficult ascertainment of the contribution to disease susceptibility of 'low-frequency-low-risk' variants. *Diabetologia* 52: 1852-1857, 2009.
21. Federici M, Pandolfi A, De Filippis EA, et al. G972R IRS-1 variant impairs insulin regulation of eNOS in cultured human endothelial cells. *Circulation* 109: 399-405, 2004.
22. Perticone F, Sciacqua A, Scozzafava A, et al. Impaired endothelial function in never-treated hypertensive subjects carrying the Arg972 polymorphism in the Insulin Receptor Substrate-1 Gene. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 3606-3609, 2004.
23. Prudente S, Scarpelli D, Chandalia M, et al. The TRIB3 Q84R polymorphism and risk of early-onset type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 94: 190-196, 2009.
24. Prudente S, Hribal ML, Flex E, et al. The functional Q84R polymorphism of mammalian tribbles homolog TRB3 is associated with insulin resistance and related cardiovascular risk in caucasians from Italy. *Diabetes* 54: 2807-2811, 2005.
25. Andreozzi F, Formoso G, Prudente S, et al. TRIB3 R84 Variant is associated with impaired insulin mediated Nitric Oxide production in Human Endothelial Cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28: 1355-1360, 2008.
26. Sciacqua A, Candigliota M, Ceravolo R, et al. Weight loss in combination with physical activity improves endothelial dysfunction in human obesity. *Diabetes Care* 26: 1673-1678, 2003.
27. Perticone F, Sciacqua A, Maio R, et al. Asymmetric dimethylarginine, L-arginine, and endothelial dysfunction in essential hypertension. *J Am Coll Cardiol* 46: 518-523, 2005.
28. Perticone F, Sciacqua A, Maio R, et al. Endothelial dysfunction, ADMA and insulin resistance in essential hypertension. *Int J Cardiol* 142: 236-241, 2010.

