

Titolo del lavoro

DEHYDROEPIANDROSTERONE PREVENTS OXIDATIVE INJURY INDUCED BY TRANSIENT ISCHEMIA/REPERFUSION IN THE BRAIN OF DIABETIC RATS

Autori e Istituto/i dove si è svolto il lavoro

Manuela Aragno, S. Parola, E. Brignardello, A. Mauro, E. Tamagno, R. Manti, O. Danni, G. Boccuzzi

Dipartimento di Medicina ed Oncologia Sperimentale, Sezione di Patologia Generale (M.A., S.P., E.T., O.D.), Dipartimento di Fisiopatologia Clinica (E.B., R.M., G.B.), Università di Torino e Dipartimento di Neuroscienze (A.M.), I.R.C.S.S., Istituto Oncologico Piancavallo (Italy)

Rivista, volume, pag., anno

Diabetes 49: 1924-1931, 2000

A quale particolare problema si è rivolta la ricerca svolta?

Il diabete raddoppia il rischio di incidenti cerebrovascolari, che rappresentano la terza causa di morte nei Paesi industrializzati, e ne peggiora il decorso. Sia l'ischemia cerebrale, sia l'iperglicemia determinano una eccessiva produzione di radicali liberi. Il tessuto nervoso, per il suo alto contenuto di acidi grassi poliinsaturi, è particolarmente sensibile al danno radicalico. I radicali liberi dell'ossigeno attaccano infatti i lipidi di membrana e innescano il meccanismo di propagazione del danno. Questa cascata di reazioni, indotta dall'ischemia e dall'iperglicemia cronica, danneggia le membrane cellulari, inattiva i sistemi di trasporto e di produzione di energia e, in definitiva, porta alla perdita di funzione del neurone e all'edema cerebrale.

Qual era lo stato delle conoscenze precedentemente al vostro lavoro?

Il deidroepiandrosterone (DHEA) è uno steroide "multifunzionale" prodotto principalmente dal corticosurrene, ma sintetizzato "de novo" anche nel cervello dove, durante l'embriogenesi, partecipa all'organizzazione strutturale della rete neuronale. Negli ultimi anni è stato dimostrato che il DHEA possiede un potente effetto antiossidante, capace di contrastare "in vivo" e "in vitro" il danno ossidativo indotto mediante agenti pro-ossidanti diversi, inclusa l'iperglicemia. Lo studio è stato disegnato per valutare, su un modello animale, l'effetto del pretrattamento con DHEA nei confronti del danno cerebrale indotto dalla concomitanza di due condizioni pro-ossidanti, l'iperglicemia cronica e l'ischemia transitoria cerebrale, che risultano spesso associate in clinica.

Sintesi dei risultati ottenuti

Ratti resi diabetici con streptozotocina (STZ) e successivamente trattati con DHEA (4 mg/die) per 7, 14 o 21 giorni, sono stati sottoposti a ischemia cerebrale transitoria (occlusione bilaterale delle carotidi comuni per 30 min, seguita da riperfusione per 60 min). Sui sinaptosomi cerebrali, porzione terminale metabolicamente autonoma degli assoni, sono stati valutati lo stato ossidativo, il livello di antiossidanti non enzimatici e l'integrità delle membrane.

Gli indici di stress ossidativo (specie reattive dell'ossigeno, radicali idrossilici, H_2O_2), gli antiossidanti non

enzimatici (glutazione, α -tocoferolo), e i parametri di integrità anatomica (rilascio di LDH) e funzionale (attività della Na^+/K^+ ATPasi) delle membrane sono risultati gravemente alterati nei sinaptosomi cerebrali ottenuti dai ratti diabetici sottoposti a ischemia cerebrale transitoria. Il pretrattamento con DHEA riporta gli indici di stress ossidativo a livelli simili a quelli degli animali di controllo e migliora significativamente i parametri di integrità di membrana.

In che modo questi risultati hanno permesso di approfondire le conoscenze riguardo al problema iniziale?

È stato recentemente documentato che, nel ratto, gli antiossidanti riducono il danno neuronale indotto mediante ischemia cerebrale transitoria. Questo lavoro dimostra, per la prima volta, che uno steroide endogeno direttamente prodotto nel cervello protegge le sinapsi cerebrali dal grave stress ossidativo prodotto per effetto combinato dall'ischemia cerebrale transitoria e dall'iperglicemia cronica, come avviene nel paziente diabetico in corso di vasculopatia cerebrale acuta. In particolare, il mantenimento dell'attività Na/K ATPasica impedisce la depolarizzazione di membrana, l'apertura dei canali dei recettori NMDA e la conseguente neurotossicità indotta dagli aminoacidi eccitatori.

Quali sono le prospettive di ricerca ulteriore sull'argomento?

Si sta cercando di definire la sequenza di eventi responsabili dell'effetto protettivo del DHEA nei confronti del danno ischemico nel diabete sperimentale misurando l'attivazione del fattore di trascrizione NF κ B, che ricopre un ruolo chiave nella risposta cellulare ai radicali liberi e nell'indurre geni codificanti per citochine proinfiammatorie. Parallelamente è condotta la valutazione quantitativa morfometrica della perdita neuronale nelle regioni cerebrali più sensibili al danno ischemico (ippocampo e corteccia parietale) e la verifica dell'ipotesi che l'effetto protettivo del DHEA dipenda dall'azione sui sistemi di controllo della morte programmata apoptotica.

Vi sono ricadute dei vostri risultati sulla pratica clinica quotidiana?

La protezione nei confronti dello stress ossidativo indotto nei ratti diabetici dall'ischemia cerebrale transitoria suggerisce la possibilità che variazioni dei livelli tissutali di DHEA nel paziente diabetico possano condizionare la gravità del danno ischemico cerebrale. Tuttavia la prospettiva dell'impiego clinico dal DHEA nella prevenzione primaria delle complicanze cerebrovascolari potrà essere considerata solo dopo che gli studi prospettici in corso avranno dimostrato che la comparsa e l'"outcome" degli incidenti cerebrovascolari varia in funzione dei livelli individuali di DHEA. La produzione di DHEA ha infatti un'ampia variabilità inter-individuale, determinata da fattori genetici, ma è molto stabile nel singolo individuo. Essa diminuisce progressivamente con l'età, mentre aumentano, durante l'invecchiamento, gli insulti radicali. Questa situazione potrebbe rivelarsi particolarmente critica nel diabetico nel quale, al fisiologico incremento età-dipendente della produzione di radicali liberi si aggiunge lo squilibrio ossido-riduttivo indotto dall'iperglicemia cronica.

Titolo del lavoro

GUARIGIONE DEL DANNO TISSUTALE ED ESPRESSIONE DI VEGF NEL DIABETE SPERIMENTALE

INHIBITION OF LIPID PEROXIDATION RESTORES IMPAIRED VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR EXPRESSION AND STIMULATES WOUND HEALING AND ANGIOGENESIS IN THE GENETICALLY DIABETIC MOUSE

Autori e Istituto/i dove si è svolto il lavoro

Domenica Altavilla¹, Antonino Saitta³, Domenico Cucinotta³, Mariarosaria Galeano², Barbara Deodato¹, Michele Colonna², Valerio Torre⁴, Giuseppina T. Russo³, Aurora Sardella¹, Giuseppe Urna¹, Giuseppe M. Campo⁵, Vittorio Cavallari⁴, Giovanni Squadrito¹, Francesco Squadrito¹

¹Istituto di Farmacologia, ²Dipartimento di Chirurgia Plastica, ³Dipartimento di Medicina Interna, ⁴Istituto di Patologia Ultrastrutturale e ⁵Istituto di Fisiologia, Università di Messina, Messina

Rivista, volume, pag., anno

Diabetes 50: 667-674, 2001

A quale particolare problema si è rivolta la ricerca svolta?

Valutare gli effetti di un trattamento anti-ossidante sull'espressione di VEGF e sulla guarigione delle ferite nel diabete sperimentale.

Qual era lo stato delle conoscenze precedentemente al vostro lavoro?

La guarigione delle ferite ("wound healing") è un evento complesso, d'interazione tra meccanismi cellulari e molecolari (infiammazione, migrazione cellulare, angiogenesi, sintesi di collagene, riepitelizzazione). Nel diabete mellito questo processo è spesso deficitario, forse anche a causa di una aumentata produzione di radicali liberi, che in condizioni sperimentali si sono dimostrati in grado di ritardare la migrazione cellulare, di ridurre la produzione di collagene e di inibire l'angiogenesi (*N. Silhi, J. Wound Care 1998*). Il Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) è una potente citochina angiogenica, prodotta da cheratinociti e macrofagi e con attività simile al PDGF, che ha un ruolo primario nei processi di *wound healing* (*N. Ferraro et al., Endocrin. Rev. 1997*).

Nel diabete sperimentale è stata documentata un'associazione tra alterata regolazione del VEGF e ridotto *wound healing* (*S. Frank et al., J. Biol. Chem. 1995*).

Sintesi dei risultati ottenuti

Materiale. Sono stati studiati 4 gruppi di topi (21 animali ciascuno): il primo (topi *db⁺/db⁺*) e il secondo (controlli *db⁺/m⁺*) trattati con *raxofelast* (inibitore della perossidazione lipidica) 15 mg/kg i.p. per 12 gg; il terzo (topi *db⁺/db⁺*) e il quarto (controlli *db⁺/m⁺*) trattati con placebo.

Sono state praticate, sotto anestesia, 2 incisioni chirurgiche a tutto spessore (4 cm) sul dorso degli animali e quindi suturate con clips.

Al 3°, al 6° e al 12° giorno, sono stati sacrificati 7 animali per gruppo e la ferita suddivisa in 3 sezioni per la valutazione dei parametri in studio.

Parametri di valutazione e metodi. Punteggio istologico: (riepitelizzazione, formazione di tessuto di granulazione, angiogenesi, infiltrazione infiammatoria).

Forza di rottura: (massimo carico sopportato dai margini della ferita).

Coniugati Dieni (CD): (prodotto di perossidazione lipidica).

Espressione di VEGF: (mRNA totale del tessuto).

Risultati ottenuti. Nei topi geneticamente diabetici *db/db* v'è un difetto del *wound healing*, istologicamente documentato e associato con un aumento della lipidoperossidazione, valutata in base all'aumento del contenuto di coniugati dieni (CD), con una ridotta forza di rottura (*breaking strenght*) e con una ridotta espressione di VEGF.

Infatti, mentre nei topi di controllo vi è una forte induzione dell'espressione di VEGF mRNA tissutale tra il 3° e il 6° giorno dall'incisione, nei topi *db/db* questa espressione è ridotta e tardiva (si rileva intorno al 12° giorno dalla incisione della ferita).

L'uso di un anti-ossidante, il raxofelast, per via sistemica migliora il quadro istologico, riduce la perossidazione lipidica, riporta la forza di rottura entro i valori propri dei topi di controllo e aumenta l'espressione di VEGF, ripristinandone il pattern.

In che modo questi risultati hanno permesso di approfondire le conoscenze riguardo al problema iniziale?

Questi dati suggeriscono che nel diabete sperimentale un'eccessiva produzione di radicali liberi deprime i processi di *wound healing*, attraverso una ridotta produzione di fattori angiogenetici quali il VEGF.

Quali sono le prospettive di ricerca ulteriore sull'argomento?

È stato dimostrato che, oltre il VEGF, altri fattori di crescita quali il platelet-derived growth factor (PDGF) e il fibroblast growth factor (FGF), che partecipano al processo di *wound healing*, sono alterati nel diabete. Resta da valutare se la lipidoperossidazione giochi un ruolo nel determinare anche questa disfunzione e se un eventuale trattamento antiossidante sia in grado di prevenire o attenuare il difetto di guarigione delle ferite nel soggetto diabetico.

Vi sono ricadute dei vostri risultati sulla pratica clinica quotidiana?

Se i nostri risultati fossero confermati in studi sull'uomo, si potrebbe ipotizzare, nel prossimo futuro, l'uso di agenti anti-ossidanti per via sistemica e/o topica per accelerare il processo di *wound healing*, notoriamente compromesso nei pazienti diabetici.

Titolo del lavoro

EFFETTI DELLA SOMMINISTRAZIONE DI IGF-I RICOMBINANTE UMANO SULLA RISPOSTA SECRETORIA DI ORMONE DELLA CRESCITA AL GHRH NELL'OBESITÀ

EFFECTS OF RECOMBINANT HUMAN INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR I ADMINISTRATION ON THE GROWTH HORMONE (GH) RESPONSE TO GH-RELEASING HORMONE IN OBESITY

Autori e Istituto/i dove si è svolto il lavoro

M. Maccario, F. Tassone, L. Gianotti, F. Lanfranco, S. Grottoli, E. Arvat, E. E. Muller*, E. Ghigo

Unità Operativa Autonoma di Endocrinologia e Malattie Metaboliche, Dipartimento di Medicina Interna, Università di Torino; *Dipartimento di Farmacologia, Università di Milano

Rivista, volume, pag., anno

The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 86: 167–171, 2001

A quale particolare problema si è rivolta la ricerca svolta?

Nel lavoro in questione ci si è rivolti al problema dell'iposecrezione somatotropa (sia spontanea sia stimolata) che caratterizza l'obesità e può essere così marcata da sovrapporsi a quella di pazienti con deficit di GH. Nonostante la marcata compromissione della secrezione di GH, i livelli di IGF-I in soggetti obesi sono generalmente normali.

Per spiegare l'iposecrezione dell'obesità sono state ipotizzate alterazioni neuroendocrine (quali un ipertono somatostatinergico o uno stato di ipoattività GHRH, i principali neurormoni ipotalamici deputati al controllo della funzione somatotropa) ma anche alterazioni metaboliche (iperinsulinismo, livelli elevati di acidi grassi liberi, alterazioni dell'attività di leptina) nonché un aumento dell'azione di feedback negativo di IGF-I (ipersensibilità?).

Ipotesi di lavoro era quella di evidenziare un'eventuale ipersensibilità all'effetto inibitorio di rhIGF-I sulla secrezione somatotropa nell'obesità.

Qual era lo stato delle conoscenze precedentemente al vostro lavoro?

In letteratura è ben noto che IGF-I esercita un feedback negativo sulla secrezione di GH in risposta a GHRH, arginina e GHRPs (GH releasing peptides) in soggetti normali e anche in condizioni di resistenza periferica al GH (S. di Laron, Diabete mellito tipo 1). È stato osservato che l'azione inibitoria di IGF-I si esplica direttamente a livello ipofisario (inibizione della sintesi e del rilascio di GH conseguente all'attivazione dei recettori IGF-1), ma anche indirettamente a livello ipotalamico (tramite aumento del rilascio di somatostatina e/o inibizione del rilascio di GHRH).

Sintesi dei risultati ottenuti

I livelli basali di IGF-I nelle pazienti con obesità addominale (OB) sono risultati simili al gruppo di controllo di donne giovani sane (DN) ($=199,7 \pm 33,3$ vs $274,4 \pm 25,3$ $\mu\text{g/L}$). La secrezione somatotropa spontanea

(0-180 minuti) in OB è risultata inferiore a quella in DN ($0,9 \pm 0,4$ vs $2,6 \pm 0,8$ $\mu\text{g/L}$; $p=\text{n.s.}$) se pure in misura non significativa. D'altra parte, la risposta di GH al GHRH in OB è risultata marcatamente inferiore alle DN (AUC da 180 a 270 min, $576,5 \pm 137,5$ vs $1315,9 \pm 189,9$ $\mu\text{g/L*min}$; $p<0,02$). La somministrazione di rhIGF-I ha incrementato i livelli circolanti di IGF-I in entrambi i gruppi in misura analoga ($326,8 \pm 28,3$ e $420,3 \pm 26,5$ $\mu\text{g/L}$ in OB e DN, rispettivamente). La somministrazione di rhIGF-I ha inibito la risposta di GH al GHRH sia in OB ($240,1 \pm 99,6$ $\mu\text{g/L}$; $p<0,05$) sia in DN ($730,2 \pm 288,1$ $\mu\text{g/L}$; $p<0,05$) mentre non ha modificato la secrezione somatotropa spontanea in entrambi i gruppi. Dopo la somministrazione di rhIGF-I la risposta di GH a GHRH in OB si è mantenuta inferiore ($p<0,05$) a quella in DN; il decremento percentuale è, infatti, risultato simile in entrambi i gruppi ($44,21 \pm 14,06$ e $48,21 \pm 13,95$ $\mu\text{g/L}$, in OB e DN, rispettivamente). In entrambi i gruppi a somministrazione di rhIGF-I non ha modificato i livelli di glicemia e di insulina.

In che modo questi risultati hanno permesso di approfondire le conoscenze riguardo al problema iniziale?

Il nostro studio ha dimostrato che la somministrazione sottocutanea di una bassa dose di rhIGF-I inibisce la risposta somatotropa a GHRH in donne affette da obesità addominale in modo analogo a quello riscontrabile in soggetti normali. Questi risultati suggeriscono che la sensibilità somatotropa all'effetto inibitorio di rhIGF-I sia conservata nell'obesità la cui iposecrezione somatotropa non sembra essere spiegabile sulla base di un'ipersensibilità all'azione di feedback negativo di IGF-I.

Quali sono le prospettive di ricerca ulteriore sull'argomento?

Chiarire se realmente IGF-I eserciti un effetto di feedback inibitorio soltanto sulla secrezione di GH-stimolata e non su quella spontanea.

Chiarire i meccanismi patogenetici che permettono una normale generazione di IGF-I nell'obesità nonostante la compromissione della secrezione di GH.

Vi sono ricadute dei vostri risultati sulla pratica clinica quotidiana?

Lo studio eseguito aveva finalità di interpretazione fisiopatologica relativamente ai meccanismi responsabili dell'iposecrezione di GH caratteristico dell'obesità in cui l'attività IGF-I risulta sorprendentemente mantenuta. La spiegazione di questa dissociazione tra secrezione di GH e IGF-I è tuttora oscura ma la sua spiegazione potrebbe permettere la conoscenza di nuovi meccanismi che regolano sintesi e secrezione di IGF-I.

Titolo del lavoro

NEW ULCERATION, NEW MAJOR AMPUTATION, AND SURVIVAL RATES IN DIABETIC SUBJECTS HOSPITALIZED FOR FOOT ULCERATION FROM 1990 TO 1993. A 6.5-YEAR FOLLOW-UP

Autori e Istituto/i dove si è svolto il lavoro

Ezio Faglia¹, Fabrizio Favales², Alberto Morabito³

¹UO Medicina Interna-Centro di Diabetologia Policlinico MultiMedica Sesto S. Giovanni (Mi); ²Centro di Diabetologia Ospedale Niguarda Milano; ³Istituto Di Biometria e Statistica Medica Università di Milano

Rivista, volume, pag., anno

Diabetes Care 24: 78-83, 2001

A quale particolare problema si è rivolta la ricerca svolta?

Valutazione dell'incidenza di nuove ulcerazioni e amputazioni maggiori in soggetti già ricoverati per ulcera del piede. Valutazione dell'aspettativa di vita e delle cause di morte

Qual era lo stato delle conoscenze precedentemente al vostro lavoro?

Dati epidemiologici sconfortanti.

Reulcerazione: 50% dei soggetti nell'arco di 2-5 anni.

Amputazione maggiore: 30-50% dei soggetti nell'arco di 1-3 anni.

Sintesi dei risultati ottenuti

Reulcerazione: 12,75% nell'arco di 6.5 anni

Amputazione maggiore: 3,4% nell'arco di 6,5 anni

In che modo questi risultati hanno permesso di approfondire le conoscenze riguardo al problema iniziale?

Rivalutare l'incidenza degli eventi in questione alla luce degli interventi effettuati:

- usare la degenza per una istruzione intensiva allargata ai famigliari;
- utilizzare in tutti i soggetti ortesi specifiche.

Quali sono le prospettive di ricerca ulteriore sull'argomento?

Estendere i provvedimenti utilizzati in questo studio in prevenzione secondaria alla prevenzione primaria.

Vi sono ricadute dei vostri risultati sulla pratica clinica quotidiana?

Utilizzare diffusamente (Linee Guida) la metodologia utilizzata in questo studio nella prevenzione secondaria del piede diabetico.