

## Rassegna

# Eziopatogenesi delle complicanze microangiopatiche nel diabete mellito

## Pathogenesis of microvascular complications in diabetes

A. Avogaro

Dipartimento di Medicina (DIMED),  
Cattedra di Malattie del Metabolismo,  
Università degli Studi di Padova

**RIASSUNTO**

È stato dimostrato, in studi osservazionali e prospettici, che la microangiopatia diabetica non solo è causa di cecità, insufficienza renale e amputazioni non traumatiche, ma è anche un potente predittore di complicanze macrovascolari. La sua fisiopatologia prevede l'interazione tra numerosi fattori che contribuiscono simultaneamente sia al danno, sia alla ridotta protezione vascolare nei confronti dell'iperglicemia. Secondo la tradizionale ipotesi di Brownlee, un'aumentata produzione di radicali liberi dell'ossigeno secondaria all'iperglicemia è la principale ragione dell'insorgenza della microangiopatia. Oltre a questa ipotesi, sono stati descritti ulteriori meccanismi in grado di contribuire alla patogenesi delle complicanze microvascolari quali: le modificazioni epigenetiche; la ridotta capacità rigenerativa dell'endotelio secondaria a un ridotto rilascio midollare di cellule progenitrici; il ruolo dei neutrofili e la loro morte per NETosi; il ruolo dell'attivazione di proteasi intracellulari come le chimasasi. La comprensione di tali meccanismi potrà portare ad approcci terapeutici innovativi con conseguente riduzione della stessa microangiopatia.

**SUMMARY**

Observational and prospective studies have shown that diabetic microangiopathy is not only a cause of blindness, renal failure and non-traumatic amputations, but also a powerful predictor of macrovascular complications. Its pathophysiology is based on interactions between numerous factors that contribute simultaneously to the damage and to the reduced vascular protection against hyperglycemia. Brownlee's traditional hypothesis has it that increased production of oxygen free radicals secondary to hyperglycemia is the main cause of microangiopathy. In addition to this hypothesis, further mechanisms are described as contributing to the pathogenesis of microvascular complications: these include epigenetic modifications; the lower regenerative capacity of the endothelium secondary to reduced release of progenitor cells by the bone marrow; the role of neutrophils and their death from NETosis; and the activation of intracellular proteases such as chymase. Understanding these mechanisms will open the way to innovative therapeutic approaches, leading to reduction of the microangiopathy itself.

**Introduzione**

Il paziente diabetico presenta un aumentato rischio di patologia cardiovascolare (CV) rispetto al non diabetico, riconducibile alla presenza di fattori di rischio più prevalenti e presenti in forma più grave. Ciò può spiegare, almeno in parte, l'eccesso di mortalità per malattia CV in questa popolazione dove sono operanti anche

altri fattori di rischio non presenti nella popolazione generale: le complicanze microvascolari<sup>1</sup>. Dal punto di vista clinico e fisiopatologico non è ancora del tutto chiaro il perché le complicanze microvascolari moltiplichino il rischio di morbilità e mortalità per malattia macrovascolare. L'ipotesi più probabile è che l'aumentato rischio sia conseguenza del danno d'organo secondario alla stessa microangiopatia, come nel

**Corrispondenza:** Angelo Avogaro, Dipartimento di Medicina, via Giustiniani 2, 35128 Padova – Tel. +39 049 8212178 – Fax +39 049 8217878 – E-mail: angelo.avogaro@unipd.it

**Parole chiave:** microangiopatia, stress ossidativo, epigenetica, cellule progenitrici endoteliali, chimasasi • **Key words:** microangiopathy, oxidative stress, epigenetic, endothelial progenitor cells, chymase

**Pervenuto** il 27-03-2018 • **Accettato** il 21-06-2018

caso della nefropatia o della neuropatia. La medesima relazione è stata osservata però anche tra retinopatia diabetica e mortalità CV; connessione, questa, più difficile da spiegare dal punto di vista fisiopatologico: ciò suggerisce che la microangiopatia non sia solo causa ma anche marcatore di un processo continuo di danno vascolare. La presenza di retinopatia diabetica predice sia la mortalità per coronaropatia, sia il rischio di insufficienza cardiaca, suggerendo come vi sia una stretta correlazione tra microcircolazione retinica e coronarica<sup>2</sup>. Il danno vascolare non necessariamente prevede temporalmente prima la macro- e successivamente la microangiopatia: vi sono dimostrazioni come la microangiopatia può precedere l'insorgenza della malattia macrovascolare.

Studi osservazionali italiani riportano una prevalenza di micro/macroalbuminuria di circa il 27-34%. Nello studio RIACE, la prevalenza di normo-, micro-, e macro-albuminuria era rispettivamente del 73,1, 22,2, e 4,7%. Tra i diabetici tipo 2 in Italia, il 37% è affetto da almeno una complicanza microvascolare, dei quali il 29 da una sola complicanza, il 7 da due complicanze e meno dell'1% da tre<sup>3</sup>. Le complicanze microvascolari più frequenti sono quelle renali fra gli uomini (25 rispetto al 19% nelle donne) e quelle oculari nelle donne (20 negli uomini e 23% nelle donne). La prevalenza di danno macrovascolare è direttamente correlato allo stadio della nefropatia diabetica.

Si ritiene a tutt'oggi che il fattore di rischio principale della microangiopatia diabetica sia l'iperglicemia ma, anche alla luce di recenti osservazioni, anche altri fattori, quali ad esempio l'ipertensione arteriosa o uno stato pro-infiammatorio, possono giocare un ruolo importante nella sua comparsa e progressione.

Vi è inoltre ampia variabilità nella propensione a sviluppare complicanze microvascolari: alcuni pazienti con mediocre compenso glicemico non sviluppano nel tempo alcuna complicanza, mentre altri con compenso glicemico ottimale presentano complicanze severe e precoci. Ciò ha fatto supporre l'esistenza di una componente genetica nella loro eziopatogenesi: è stato calcolato ad esempio che l'ereditabilità della retinopatia diabetica sia di circa il 50%. A tal riguardo sono stati valutati alcuni geni candidati implicati nella genesi della microangiopatia: tra questi il *vascular endothelial growth factor A (VEGFA)*, l'*aldo-keto reductase family 1, member B1 (AKR1B1)*, e l'eritropoietina (EPO) per la retinopatia diabetica, l'enzima di conversione dell'angiotensina 1 (ACE), la protein chinasi C $\beta$  (PRKCB) ed eritropoietina (EPO) per la nefropatia. In generale, questi studi non hanno prodotto risultati statisticamente significativi: per un approfondimento su questo ar-

gomento si rimanda comunque a rassegne specifiche sull'argomento<sup>4</sup>.

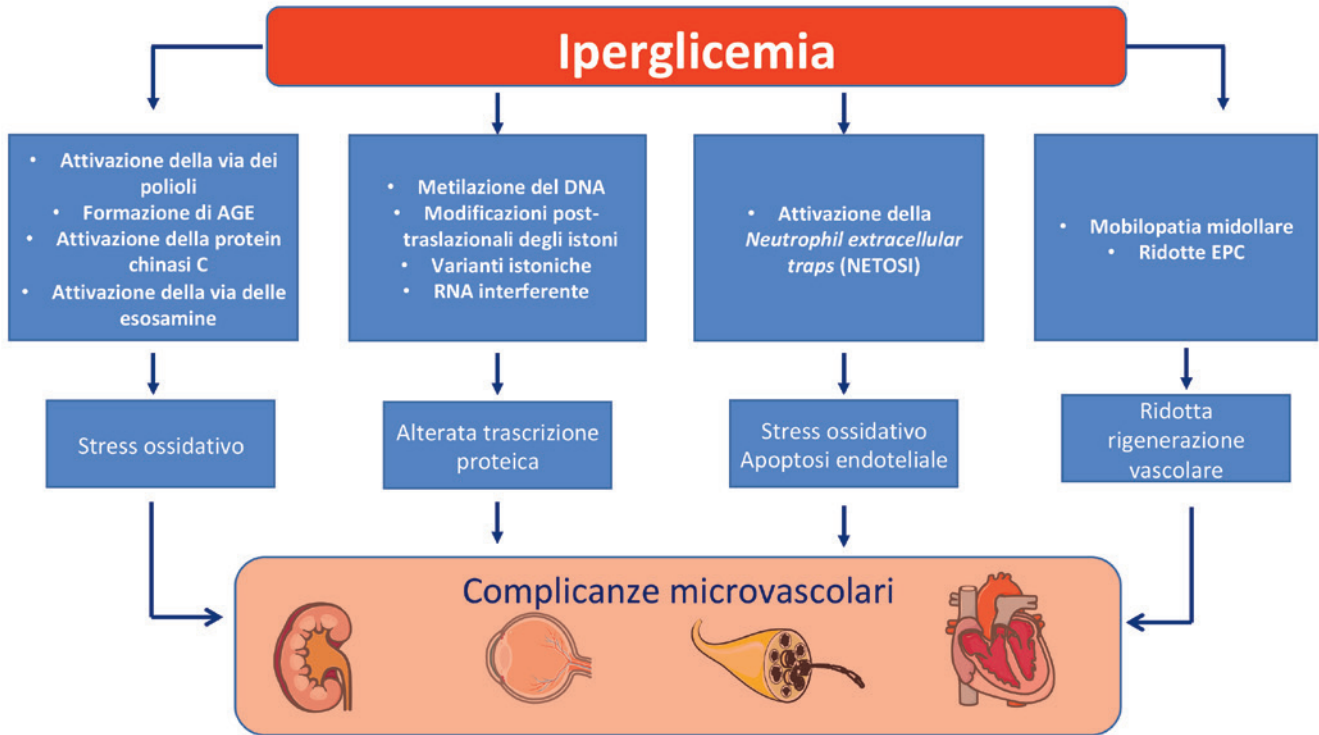
## Ipotesi di Brownlee

La fisiopatologia del danno vascolare nel paziente con diabete è complessa e prevede l'interazione tra numerosi fattori che contribuiscono simultaneamente sia al danno, sia alla protezione vascolare (Fig. 1). L'iperglicemia riduce la capacità dell'endotelio di produrre nitrossido (NO), compromettendo in tal modo l'efficienza intrinseca del vaso di dilatarsi: la ridotta sintesi di NO è secondaria a una eccessiva produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) da parte sia dei mitocondri, sia di strutture citoplasmatiche e di membrana. Secondo la tradizionale ipotesi di Brownlee, i ROS non sono solo gli effettori finali, ma anche quelli iniziali di 4 vie intracellulari che vengono attivate in presenza di iperglicemia: 1) attivazione della via dei polioli; 2) la formazione di prodotti avanzati di glicazione (AGEs); 3) la sintesi *de novo* di diacil-glicerolo (DAG) e la conseguente attivazione della protein chinasi C; 4) l'attivazione della via delle esosamine<sup>5</sup>.

Per quanto riguarda la via dei polioli, l'enzima aldoso-reduttasi è attivato dai ROS e catalizza la conversione di glucosio a sorbitolo, con simultanea riduzione di NADPH a NADP<sup>+</sup> e successiva riduzione del glutatione ridotto, uno dei principali meccanismi intracellulari di difesa nei confronti dello stress ossidativo.

La produzione di AGE deriva dalla glicazione non-enzimatica di proteine, lipidi, e amino gruppi presenti negli acidi nucleici e dalla loro interazione con gli aldosi, monosaccaridi contenente nella molecola un gruppo aldeidico. Gli AGE possono originarsi dall'auto-ossidazione del glucosio a gliosale, dalla decomposizione dei prodotti di Amadori a 3-deossiglucosone e dalla frammentazione della gliceraldeide-3-fosfato a metilgliosale. Gli AGE compromettono le funzioni cellulari attraverso 3 meccanismi: 1) interazioni tra proteine della membrana basale della matrice extracellulare con conseguente aumento della rigidità vascolare; 2) alterazioni delle funzioni delle proteine intracellulari; 3) legame tra gli AGE solubili circolanti e i recettori presenti nella superficie cellulare quali i RAGE e i recettori scavenger: l'interazione tra AGE e i loro recettori induce la formazione di ROS e l'attivazione di fattori di trascrizione intracellulare quali il fattore nucleare  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), con successiva iperespressione di numerosi geni coinvolti nell'infiammazione vascolare e nella disfunzione endoteliale<sup>6</sup>.

Nelle cellule endoteliali l'iperglicemia aumenta la produzione di DAG a partire dalla sintesi *de novo* dell'intermedio glicolitico gliceraldeide-3-fosfato. Il DAG è un poten-



AGE: prodotti avanzati di glicazione; EPC: cellule progenitrici endoteliali.

**Figura 1.** Schema dei principali meccanismi responsabili per l’eziopatogenesi delle complicanze microvascolari nel diabetico.

te attivatore delle isoforme della PKC  $\beta$  e  $\delta$ . L’attivazione della PKC induce l’espressione di proteine pro-trombotiche e pro-infiammatorie quali il *transforming growth factor* (TGF)- $\beta$ , il *plasminogen activator inhibitor-1* (PAI-1) e il VEGF. Inoltre la PKC- $\beta$  fosforila la proteina adattatrice p66Shc in serina 36, consentendo la sua traslocazione dalla membrana mitocondriale e la conseguente produzione di ROS <sup>7</sup>. Questo evento induce l’aumento della permeabilità mitocondriale con conseguente apoptosi cellulare. Nei mitocondri l’eccessiva produzione di ROS causa il rilascio di Fe<sup>2+</sup> dalla ferritina: ferro libero si unisce ai ROS causando la produzione di radicali idrossilici, con conseguente rottura della doppia elica del DNA e attivazione dell’enzima *poly(ADP-ribose) polymerase 1* (PARP-1). L’attivazione di PARP-1, a sua volta, inibisce l’enzima glicolitico GAPDH riducendo i livelli intracellulari di NAD<sup>+</sup> degradandolo a ADP-ribosio e nicotinamide. L’inibizione di GAPDH favorisce l’accumulo di intermedi glicolitici che vengono quindi dirottati nelle altre vie di trasduzione implicate nelle patogenesi delle complicanze microvascolari.

L’attivazione della PKC $\beta$  promuove l’infiammazione vascolare, aumentando l’espressione macrofagica del cluster di differenziazione 11c (CD11c; integrina), di chemochine (C-C motif ligand 2), e interleuchina-1 $\beta$  via attivazione della *extracellular signal-regulated kinase* (ERK) 1 e 2 e di *Jun-N-terminus kinase-mitogen-activated chinasi* (JUNK).

L’attivazione della via delle esosamine aumenta l’espressione sia di PAI-1 sia di TGF- $\beta$ , con propensione alla diatesi coagulativa e profibrotica. In cellule endoteliali umane, l’attivazione della fosforilazione in serina 1177 della sintasi endoteliale del nitrossido (eNOS), con successivo rilascio di NO, è inibita direttamente da O-GlcNAcylation e, indirettamente, dall’inibizione del fosfatidilinositolo 3-chinasi (PI3-K) e dell’Akt. L’eccesso di glucosamine quindi, non solo interferisce direttamente con l’enzima deputato alla sintesi di NO, ma anche con la capacità dell’insulina di aumentarne la sua sintesi.

Oltre all’iperglicemia anche l’insulino-resistenza contribuisce alla disfunzione endoteliale. Fisiologicamente l’insulina stimola la produzione di NO a livello endotelia-

le: in presenza di insulino-resistenza la fisiologica attivazione di NO è inibita, mentre vengono esaltate vie pro-aterogene come il signalling della *mitogen-activated protein kinase* (MAPK), con proliferazione delle cellule muscolari lisce e aumento della produzione di endotelina e di proteine di adesione cellulare quali la *vascular cell adhesion molecule* (VCAM)-1 e la *monocyte chemo-attractant protein* (MCP)-1<sup>8</sup>.

L'impatto negativo dell'iperglicemia non è limitato al solo endotelio, ma è presente anche a livello delle piastrine e delle cellule muscolari lisce (VSMC). L'iperglicemia aumenta la migrazione delle VSMC all'interno della lesione aterosclerotica e attiva le piastrine, che dimostrano una maggiore aggregabilità e una maggior produzione di citochine pro-aggreganti con simultanea iper-espressione della glico-proteina IIb/IIIa. Il paziente con diabete presenta anche un'aumentata ipercoagulabilità determinata da una spiccata produzione di fattore VII, fibrinogeno, PAI-1 e simultanea riduzione di proteine anti-coagulanti, come la proteina C e la trombomodulina.

In conclusione, l'ipotesi patogenetica di Brownlee enfatizza il ruolo dello stress ossidativo nel contesto della cellula endoteliale come elemento chiave nella fisiopatologia delle complicanze microvascolari. L'endotelio è però una struttura complessa che non solo subisce l'influenza negativa dell'iperglicemia, ma che è anche in continua relazione funzionale con altri fenotipi cellulari che, a loro volta, possono svolgere un ruolo chiave nell'eziologia delle complicanze microvascolari.

## Epigenetica e complicanze microvascolari

L'epigenetica studia le modificazioni dell'espressione genica che avvengono in assenza di alterazioni genomiche<sup>9</sup>. Nella cellula eucariote il DNA è avvolto nella cromatina composta, a sua volta, in subunità chiamate nucleosomi. Ogni nucleosoma consiste di un ottamero di istoni contenenti, ognuno due copie di proteine istoniche (H2A, H2B, H3 e H4), avvolte da 147 basi di DNA cromosomico. Modificazioni post-traslazionali dei nucleosomi istonici e la metilazione del DNA rappresentano le principali modificazioni epigenetiche che possono essere così classificate: 1) metilazione del DNA (interferisce con il legame dei fattori di trascrizione ai promotori inibendo così l'espressione genica); 2) modificazioni post-traslazionali degli istoni (metilazione, ubiquitinizzazione, fosforilazione, sumoilazione, acetilazione dei residui nell'estremità N-terminale); 3) varianti istoniche; 4) RNA non codificante (*small interfering RNA* e *long non-coding RNA*).

Le modificazioni epigenetiche hanno effetti importantissimi sulla regolazione genica, sono implicate nei vari

studi dello sviluppo e giocano un ruolo importante nell'inattivazione del cromosoma X; inoltre sono implicate nella patogenesi di numerose patologie umane tra cui il diabete e le sue complicanze.

Studi di metiloma in pazienti senza e con nefropatia diabetica hanno evidenziato una differente metilazione del DNA genomico tra cui Protein unc-13 homolog B, una proteina che media l'apoptosi nei glomeruli in risposta all'iperglicemia. La metilazione del DNA è implicata anche nell'attività pro-fibrotica del TGF- $\beta$ . Nelle cellule endoteliali, l'iperglicemia induce modifiche nella metilazione del DNA a livello di numerosi geni coinvolti nella disfunzione endoteliale: tali geni sono in relazione soprattutto alle modifiche pro-fibrotiche. Altrettanto importanti sono le modifiche post-traslazionali degli istoni che includono l'acetilazione della lisina, la metilazione della lisina, la fosforilazione di serina e treonina e la metilazione dell'arginina. A livello istonico la de-acetilazione si associa a repressione genica: in questo contesto è molto importante il ruolo delle sirtuine, proteine che de-acetilano gli istoni e che quindi possono agire come corepressori del messaggio genico. Le alterazioni di questo fine equilibrio tra repressione e de-repressione del messaggio genico, determinate dalle alterazioni epigenetiche in risposta a elevati livelli di glucosio, possono associarsi al diabete e alle sue complicanze. Studi sperimentali condotti in glomeruli di topi db/db hanno evidenziato un incremento della RNA polimerasi II e ridotti livelli di repressore del promotore dell'inibitore dell'attivatore del plasminogeno 1 (PAI-1). Un aumento dei livelli di RNA polimerasi II determinate da modificazioni epigenetiche si associa a espressione di geni correlate a nefropatia diabetica.

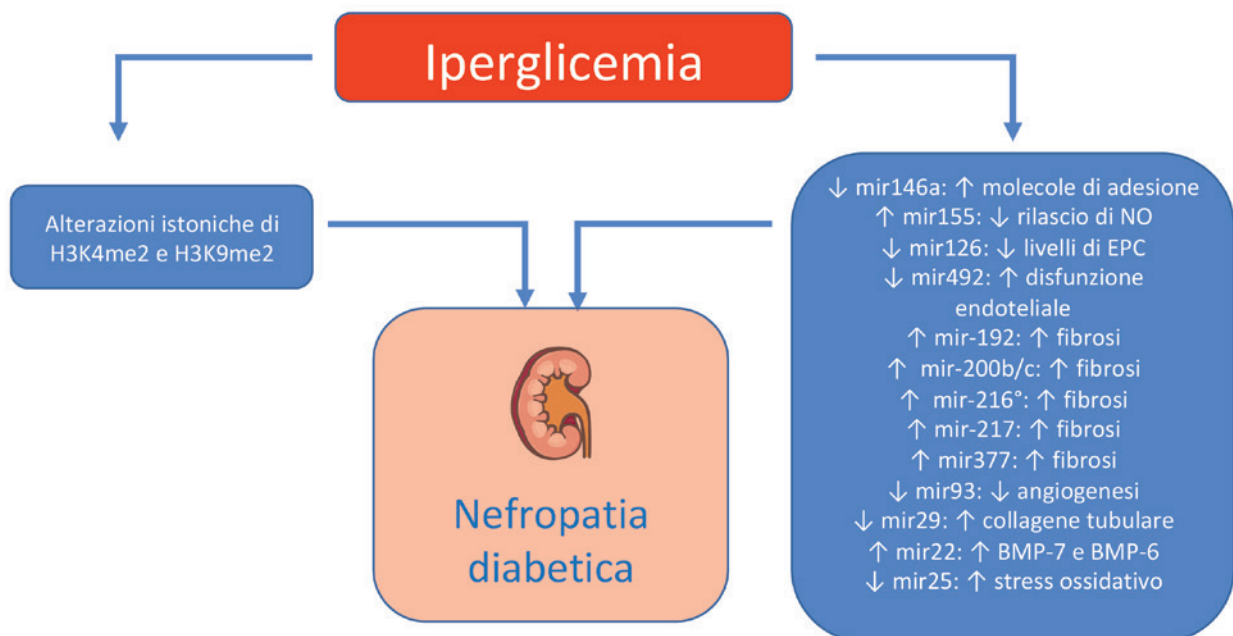
Le modificazioni epigenetiche giocano inoltre un ruolo importante nella cosiddetta memoria metabolica, come ad esempio l'attivazione di fattori nucleari legati allo stato pro-infiammatorio quali NF- $\kappa$ B in risposta a elevati livelli di glucosio<sup>10</sup>. In cellule vascolari esposte a iperglicemia sono state osservate alterazioni istoniche di H3K4me2 e H3K9me2; in cellule muscolari lisce sono state invece identificate significative perdite di domini repressivi a livello di promotori genici. Sono necessari ulteriori studi per chiarire i complessi rapporti tra epigenetica, repressione e de-repressione genica e complicanze croniche della malattia diabetica<sup>11</sup>.

Tali rapporti non coinvolgono solamente modificazioni post-istoniche, ma prevedono anche il ruolo rilevante dei microRNA interferenti, brevissime sequenze (20-22 nucleotidi) di RNA non codificanti che regolano l'espressione genica mediante meccanismi post-traslazionali<sup>12</sup>. I miRNAs possono silenziare l'espressione genica dei geni target mediante disaccoppiamento delle basi, in-

ducendo così repressione traslazionale e/o degradazione del RNA messaggero. A oggi sono stati identificati più di 1000 miRNAs che hanno la capacità di regolare quasi il 60% dei geni codificati, proteine e influenzare pertanto numerose funzioni cellulari e condizionare lo sviluppo delle complicanze croniche del diabete. Alcuni recenti studi hanno dimostrato il ruolo dei miRNA nella regolazione della funzione endoteliale <sup>13</sup>. Soprattutto per la nefropatia diabetica sono stati identificati numerosi miRNA che giocano un ruolo preminente nello stress ossidativo e nella fibrosi (Fig. 2). L'espressione di miR-146a è ridotta in presenza di elevati livelli di glucosio: questo miRNA gioca un ruolo importante nell'inibizione dell'espressione della molecola di adesione intercellulare ICAM-1 e inibisce il segnale della interleuchina proinfiammatoria IL-6. In modelli di topo diabetico miR-155 è aumentato e, parallelamente, si osserva un riduzione del rilascio endoteliale di NO determinato dall'inibizione di questo RNA interferente sulla sintasi endoteliale dell'ossido nitrico. In paziente diabetici tipo 2 coronarici sono stati osservati ridotti livelli di miR-126 che si associano a un'aumentata prevalenza di complicanze sia micro- sia macrovascolari. miR-126 promuove il rilascio di cellule progenitrici endoteliali, la cui migrazione influenza il signalling PI3K/Akt/eNOS. L'iper-espressio-

ne di miR-492 non solo corregge la resistenza all'azione dell'insulina, ma anche la disfunzione endoteliale indotta da alto glucosio. Un altro miRNA, miR-1, è ridotto nei ratti diabetici e parallelamente è aumentata l'espressione di endotelina-1 e la disfunzione endoteliale: la trasfezione di cellule endoteliali con miR-1 corregge le alterazioni indotte da iperglicemia.

A livello renale è stata dimostrata un'aumentata espressione di 5 miRNAs (miR-192, miR-194, miR-204, miR-215 e miR-216a) e la loro correlazione con alterazioni glomerulari tipiche della nefropatia diabetica <sup>14 15</sup>. L'aumentata espressione di miR-192, miR-200b/c, miR-216a e miR-217 è stata osservata in relazione all'aumentata espressione della proteina pro-fibrotica TGF- $\beta$ 1 e, in particolare, è stato identificato un ruolo funzionale di miR-192 nella patogenesi della fibrosi mesangiale. Nella corticale renale è stato osservato un aumento dell'espressione di TGF- $\beta$ 1, p53 e miR-192, tutti associati e espansione glomerulare e fibrosi: a riprova del ruolo chiave di miRNA-192, il suo silenziamento si associa a protezione dalla nefropatia diabetica. Altri miRNAs sono in grado di regolare diversi geni in presenza di nefropatia diabetica. miR-21 è iper-espresso nella cortecia renale dei topi diabetici tipo 1: l'inibizione di questo miRNA in topi miR-21-/- si associava a riduzione della



**Figura 2.** Principali meccanismi epigenetici responsabili della nefropatia diabetica.



fibrosi interstiziale in risposta al danno renale. Un altro miRNA, miR-377, è up-regolato in presenza di elevato glucosio e si associa ad aumento di TGF- $\beta$ 1 nelle cellule mesangiali ad aumentata espressione di fibronectina, a stress ossidativo, e a repressione di manganese ossido-reduttasi. Al contrario miR-93 è ipo-espresso nei glomeruli dei topi diabetici db/db rispetto ai controlli: dal momento che VEGF-A è stato identificato come target di miR-93, queste osservazioni suggeriscono un ruolo anti-angiogenetico di miR-93. Anche a livello tubulare sono state osservate alterazioni di numerosi miRNA: in cellule trattate con TGF- $\beta$ 1 vi è una down-regolazione di miR-29 che si correla ad aumentati livelli di collagene di tipo I, di tipo III e IV, target diretti di miRNA-29. Un ruolo pro-fibrotico è stato dimostrato anche per miR-22 un importante regolatore delle proteine morfogenetiche dell'osso BMP-7 e BMP-6 anch'esse associate a signaling intracellulari pro-fibrotici.

Alcuni miRNA sono invece associati a aumentato stress ossidativo in corso di nefropatia diabetica<sup>15</sup>. Nox4, che svolge un ruolo chiave nella patogenesi della nefropatia diabetica, è stato identificato come target di miR-25, target la cui ridotta espressione si associa parallelamente ad aumentata attività di Nox4 e di stress ossidativo. Nox4 è target anche di miR-146a, che quando è represso, induce il conseguente aumento di stress ossidativo. In conclusione, in corso di nefropatia diabetica, numerosi miRNA sono implicati nella repressione di proteine coinvolte nella fibrosi, nello stato pro-infiammatorio e nello stress ossidativo. In futuro terapie mirate alla loro repressione/derepressione potranno rappresentare un importante approccio terapeutico nella prevenzione e nell'arresto della progressione della nefropatia diabetica. Le variazioni della loro espressione nei biofluidi possono rappresentare anche dei biomarcatori precoci di nefropatia diabetica, grazie anche alla loro stabilità: profili di miRNAs urinari sono stati infatti correlati a nefropatia e a fibrosi. In corso di retinopatia diabetica proliferante è presente un'angiogenesi patologica: numerosi sono i miRNA implicati in questa patologia. Nella retina di ratti diabetici è stata osservata una riduzione di miR-200b il cui target è il gene di VEGF: la sua iper-espressione si associa a una correzione dell'angiogenesi e dell'aumentata permeabilità vascolare aberrante presenti in corso di diabete.

In condizioni di ipossia, come si ha in corso di retinopatia proliferante, i livelli di miR-126 sono ridotti: il ristabilimento alla normalità dei suoi livelli arresta la neovascolarizzazione, bloccando il ciclo cellulare di replicazione delle cellule endoteliali. L'inibizione di un altro miRNA, miR-21, potenzia significativamente la citotossicità da elevati livelli di glucosio in modo significativo, indu-

cendo un'elevata apoptosi cellulare: la sua aumentata espressione si associa a una significativa riduzione dell'apoptosi. In presenza di retinopatia diabetica è presente un'alterazione funzionale delle cellule progenitrici endoteliali: la loro trasfezione con miR-130a è in grado di aumentare il livello proteico di ERK/VEGF e Akt tramite la repressione di Runx3, suggerendo che il miR-130a è in grado di la normale funzione EPC attraverso la via di ERK/VEGF e Akt. Uno degli elementi patogenetici fondamentali della retinopatia diabetica è lo stato pro-infiammatorio: in cellule endoteliali retiniche vi è un aumento consensuale di miR-146 e del fattore nucleare NF- $\kappa$ B con un link tra questi due fattori costituito da HuR (*Human antigen R*), una proteina legante RNA messaggero e membro delle proteine ELAV (*embryonic lethal, abnormal vision, Drosophila*). Attraverso il legame con HuR, miR-146, è in grado di reprimere il segnale di NF- $\kappa$ B, riducendo lo stato pro-infiammatorio.

In conclusione l'insieme di questi dati indicano come le modificazioni epigenetiche giochino un ruolo importante nella patogenesi della microangiopatia sia renale sia retinica e come possano rappresentare un importante target terapeutico nella loro prevenzione.

## Netosi endotelio e complicanze microvascolari

I cosiddetti NET (*Neutrophil extracellular traps*), descritti per la prima volta nel 2004, sono rilasciati dai leucociti neutrofili mediante un processo attivo chiamato NETosi<sup>16</sup>. Questo fenomeno è stato inizialmente identificato come un processo per eliminare i micro-organismi: i NET, o reti, costituite da residui di cromatina e proteine antimicrobiche, giocano un ruolo nella patogenesi dell'autoimmunità e degli stati pro-infiammatori. La formazione dei NET avviene nel microcircolo, in particolare nel rene e nel sistema nervoso centrale, e contribuisce all'occlusione trombotica e all'ischemia tissutale. Le fasi iniziali della NETosi prevedono il legame tra neutrofili e cellule endoteliali attivate attraverso l'interazione tra P e L-selectine. L'ancoraggio dei neutrofili all'endotelio è seguito dal loro rotolamento lungo la superficie endoteliale e, infine, dalla loro adesione mediante legame tra  $\beta$ 2 integrine (LFA-1 e Mac-1) leucocitarie e ICAM-1 e ICAM-2 leucocitarie. I neutrofili migrano attraverso o tra le cellule endoteliali grazie all'interazione di diverse molecole di adesione intercellulari. I neutrofili circolanti tendono a essere cellule quiescenti: una volta attivati vanno rapidamente incontro a degranulazione, attivazione della nicotinammide adenina dinucleotide fosfato (NADPH) ossidasi con generazione di ROS, fagocitosi

e NETosi. Questo processo avviene in modo coordinato a vari livelli: vi è dapprima una citrulinizzazione degli istoni, una decondensazione cromatinica, una migrazione delle elastasi all'interno del nucleo, un sovvertimento strutturale della membrana nucleare, e rilascio extracellulare di DNA e istoni nello spazio extracellulare. Queste macromolecole creano i NET (reti) con attivazione di macrofagi e successiva produzione di citochine proinfiammatorie come IL-1 $\beta$ .

I neutrofili che formano NET producono danno tissutale e, in particolare, inducono morte delle cellule endoteliali secondaria a citotossicità da mieloperossidasi rilasciata dagli stessi NET. Oltre alle mieloperossidasi vi è un'augmentata produzione di metallo-proteasi di matrice (MMP) 9 e 25, con ulteriore disfunzione vascolare e stress ossidativo. In questo contesto le cellule endoteliali attivate non solo sono un induttore di NETosi, ma anche vittime di questo processo anche attraverso la mediazione di altri elementi come, ad esempio, le piastrine<sup>17</sup>.

Sia in modelli animali di diabete sia nel paziente diabetico è stato osservato un aumento della NETosi: tale processo sarebbe accentuato in presenza di iperosmolarità, suggerendo un suo importante ruolo nella disfunzione endoteliale, soprattutto nel microcircolo, ogni qualvolta vi è una perdita del compenso glicemico e conseguente aumento della osmolarità plasmatica. Nel paziente con diabete tipo 2 vi è un aumento significativo delle proteine associate alla NETosi come l'elastasi, i mono-oligonucleosomi, e i gli anticorpi anti-DNA: vi è inoltre una correlazione positiva tra livelli di HbA1c e tali proteine<sup>18</sup>. Il processo di NETosi nel diabetico riveste grande importanza nella ritardata guarigione delle ulcere: il nostro gruppo ha infatti osservato che le proteine legate a questo processo sono elevate in presenza di ulcera diabetica, ipotizzando così un ruolo negativo indotto dal diabete tra iper-afflusso di neutrofili, NETosi, alterazioni del microcircolo e alterata guarigione dell'ulcera<sup>19</sup>. Non è ancora stato chiarito il ruolo della NETosi nella patogenesi delle complicanze microvascolari del diabete; la letteratura riporta un ruolo importante di questo processo nell'insorgere e nella progressione della malattia renale nel lupus eritematoso sistemico, nella vasculite associate ad anticorpi antineutrofili, nell'artrite reumatoide, nella sindrome da anticorpi anti-fosfolipidi e nella glomerulonefrite proliferativa. Alcuni dati preliminari suggeriscono un coinvolgimento della NETosi nella patogenesi del processo infiammatorio a livello retinico. Sono chiaramente necessari ulteriori e più approfonditi studi per comprendere il ruolo e l'entità di tale processo nella patogenesi della microangiopatia diabetica.

## Cellule progenitrici endoteliali e malattia microvascolare

Le cellule progenitrici endoteliali (*endothelial progenitor cells*, EPC) sono cellule circolanti di derivazione midollare che esprimono gli antigeni di superficie CD34 o *kinase-insert domain receptor* (KDR, anche noto come Flk-1 nel topo) e che sono in grado di proliferare e differenziarsi in cellule endoteliali mature *in vitro* e *in vivo* e di partecipare ai processi di neoangiogenesi *in vivo*<sup>20</sup>. Si ritiene che le EPC circolanti esercitino due funzioni principali: la partecipazione alla formazione della parete vascolare e alla riparazione dell'endotelio vascolare danneggiato. Le EPC stimolano l'angiogenesi in presenza di ischemia tissutale: questa induce la produzione e il rilascio di fattori di crescita e chemochine (ad es. *vascular endothelial growth factor* (VEGF), *stromal cell-derived factor* (SDF)-1 $\alpha$ ) che, a loro volta, stimolano la mobilitazione midollare di EPC e il loro rilascio nella circolazione periferica. Nei tessuti ischemici le EPC, grazie all'interazione chemochina/recettore (soprattutto il sistema SDF1 $\alpha$ /CXCR4) promuovono la riparazione endoteliale e/o l'angiogenesi compensatoria. Una patologica riduzione o disfunzione delle EPC impedisce questi meccanismi di protezione dal danno e favorisce la comparsa e la progressione delle malattie cardiovascolari.

L'iperglicemia riduce sia la mobilitazione, sia la sopravvivenza delle EPC in circolo e sono state osservate correlazioni inverse tra il livello delle EPC circolanti e altri biomarcatori di rischio CV quali la proteina C reattiva e le LDL ossidate. Un basso livello di EPC circolanti è un potente predittore di evento sia a breve sia a lungo termine<sup>21</sup>.

Vi è una stretta correlazione tra livelli circolanti di EPC e complicanze microvascolari a sottolineare come queste cellule di derivazione endoteliale o indirettamente tramite citochine pro-angiogenetiche o direttamente abbiano un ruolo importante nell'omeostasi microcircolatoria<sup>22</sup>. Una riduzione delle EPC CD34+ si correla, in pazienti con diabete tipo 2, con la progressione della malattia renale e con un aggravamento della proteinuria e di altre microangiopatia anche dopo correzione per età, livello di compenso glicemico, e durata del diabete. Sperimentalmente è stato osservato che la presenza di neuropatia diabetica porta a una perdita della circadianità del rilascio delle EPC, a una loro ridotta capacità rigenerativa, e a retinopatia diabetica<sup>23</sup>. D'altra parte in presenza di retinopatia proliferante, a differenza di quanto si osserva nel paziente con arteriopatia obliterante agli arti inferiori, vi è un'augmentata differenziazione delle EPC a cellule endoteliali il che potrebbe spiegare la propensio-

ne delle EPC, in presenza di iperglicemia, a formare vasi aberranti quali si osservano in questa patologia.

Il rapporto tra complicanze microvascolari e EPC non è solamente in relazione ai livelli di queste ultime, ma vi è un ruolo importante svolto dal deficit midollare osservate nei pazienti diabetici, specie se complicati. Questo deficit è determinato da parecchi fattori e viene oggi identificato come "mobilopatia diabetica"<sup>24</sup>. Nel diabete i progenitori ematopoietici sono ritenuti a livello midollare e, a parità di stimolo ischemico, vengono rilasciati dal midollo molto meno efficacemente, rispetto a quanto osservato nei non diabetici. I motivi per questa ritenzione midollare sono molteplici e non ancora del tutto chiariti. Tra le varie ipotesi sono state descritte alterazioni della nestina (proteina dei filamenti espressa nel citoscheletro delle cellule nervose e implicata nella crescita radiale dell'assone), un'augmentata attività della dipeptidil peptidasi 4 (DPP-4) con clivaggio eccessivo del SDF-1a, ridotta secrezione di fattori angiocrini, un'eccessiva produzione di citochine pro-infiammatorie come gp130 ligando, un ruolo negativo dei monociti residenti differenzialmente polarizzati verso uno stato pro-infiammatorio (M1) con eccessiva produzione di oncostatina M<sup>25</sup>. Quest'ultima citochina, tramite una sua interazione con il ligando citochinico CXCL12, impedirebbe un efficace rilascio di EPC in risposta a stimoli mobilizzatori.

In conclusione, i livelli circolanti di EPC sembrano giocare un ruolo importante nell'eziopatogenesi delle complicanze microvascolari non solo contribuendo direttamente all'omeostasi endoteliale e vascolare, ma anche, indirettamente, tramite la produzione di citochine angiogenetiche. La presenza di una microangiopatia a livello midollare contribuisce all'ulteriore riduzione delle EPC: il deficit rigenerativo rappresenta pertanto il nesso di congiunzione tra patologia micro- e macrovascolare nel paziente diabetico.

## Il ruolo delle chimasi

La chimasi è una proteasi espressa in numerosi fenotipi cellulari ma soprattutto nelle mast cellule (MC): è una proteina di ≈30 kDa che è la principale responsabile della sintesi di angiotensina II (ATII) a partire dall'AT I nel cuore umano e presenta un'efficienza catalitica di ben 20 volte superiore rispetto all'enzima di conversione dell'angiotensina (ACE)<sup>26</sup>. Oltre alla sintesi di AT II, la chimasi è implicata in numerosi processi cellulari tra cui l'attivazione del TGF-beta, delle metallo proteasi, l'attivazione dell'infiammazione, il reclutamento dei neutrofilo, la conversione della pre-proendotelina a endotelina. Alcuni studi hanno dimostrato che la chimasi contribu-

isce significativamente non tanto alla formazione plasmatica di AT II, quanto alla sua sintesi a livello tissutale. A livello renale almeno il 40% della sintesi di AT II dalla AT I è ACE-indipendente e viene mediata dalla chimasi; la sintesi di AT II a livello renale è strettamente legata alla nefropatia diabetica, dal momento che è stato dimostrato che gli AGE, tramite attivazione della chinasi mitogeno-attivata, sono in grado di stimolare la sintesi di AT II mediata dalla chimasi<sup>27</sup>.

È stato inoltre osservato che nei topi mancanti del recettore della leptina (db/db), vi è una conversione preferenziale della sintesi di AT II dalla via ACE dipendente alla via chimasi dipendente<sup>28</sup>.

La controprova dell'attivazione della chimasi in corso di diabete e il suo potenziale ruolo negativo sulla nefropatia diabetica tramite l'eccessiva produzione di AT II è il fatto che la sua inibizione riduce la sintesi di TGF-beta, di fibronectina, di collagene di tipo IV e di VEGF, tutti elementi questi, che caratterizzano le basi molecolari della nefropatia diabetica. Oltre che nel rene, un ruolo negativo della chimasi è stato identificato anche a livello della circolazione coronarica: essendo la produzione di AT II mediata dalla chimasi non responsiva alla terapia con ACE inibitori, la diretta inibizione della chimasi potrebbe ridurre ulteriormente l'importante rischio residuo presente nel paziente diabetico sia per quel che riguarda la nefropatia diabetica, sia per quel che riguarda la coronaropatia<sup>29</sup>. In conclusione la chimasi sembrano contribuire alla patogenesi della nefropatia diabetica tramite l'attivazione della sintesi intracellulare di AT II: sarà pertanto comprendere se l'inibizione di questa proteasi si potrà accompagnare a una ridotta insorgenza o progressione della nefropatia diabetica.

## Conclusioni

Il controllo glicemico è di fondamentale importanza nella gestione del diabete mellito per poter conseguire la prevenzione della macro- ma soprattutto della microangiopatia. Quest'ultima infatti è, a sua volta, un importante fattore di rischio per la malattia macrovascolare. La teoria di Brownlee sulla patogenesi delle complicanze microvascolari ha sicuramente contribuito alla comprensione dei meccanismi intracellulari che portano a queste terribili e invalidanti conseguenze della malattia diabetica che sono cause di cecità, dialisi e amputazioni non traumatiche agli arti inferiori. In questi ultimi anni vi è stato un ulteriore e significativo ampliamento delle conoscenze della loro fisiopatologia che non è limitata all'aumento dello stress ossidativo come effetto finale per la loro insorgenza, ma ha chiarito il ruolo di altri meccanismi non solo limitati all'endotelio, ma che coinvolgo-



no anche i leucociti, la capacità rigenerativa midollare, e l'attività di proteasi intracellulari. Se il fine ultimo del diabetologo è il conseguimento della normoglicemia e la correzione degli altri fattori di rischio, la comprensione di tutti i meccanismi responsabili delle complicanze microvascolari potrà sicuramente contribuire alla loro ul-

teriore riduzione e quindi alla riduzione della morbilità e mortalità nel paziente diabetico.

## Conflitto di Interessi

Nessuno.

## Bibliografia

- 1 Brownrigg JR, Hughes CO, Burleigh D, et al. *Microvascular disease and risk of cardiovascular events among individuals with type 2 diabetes: a population-level cohort study*. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2016;4:588-97.
- 2 Xie J, Ikram MK, Cotch MF, et al. *Association of diabetic macular edema and proliferative diabetic retinopathy with cardiovascular disease: a systematic review and meta-analysis*. *JAMA Ophthalmol* 2017;135:586-93.
- 3 Pugliese G, Solini A, Bonora E, et al. *Chronic kidney disease in type 2 diabetes: lessons from the Renal Insufficiency And Cardiovascular Events (RIACE) Italian Multicentre Study*. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2014;24:815-22.
- 4 Kwak SH, Park KS. *Genetic studies on diabetic microvascular complications: focusing on genome-wide association studies*. *Endocrinol Metab (Seoul)* 2015;30:147-58.
- 5 Shah MS, Brownlee M. *Molecular and cellular mechanisms of cardiovascular disorders in diabetes*. *Circ Res* 2016;118:1808-29.
- 6 Khan ZA, Chakrabarti S. *Cellular signaling and potential new treatment targets in diabetic retinopathy*. *Exp Diabetes Res* 2007;2007:31867.
- 7 De Marchi E, Baldassari F, Bononi A, et al. *Oxidative stress in cardiovascular diseases and obesity: role of p66Shc and protein kinase C*. *Oxid Med Cell Longev* 2013;2013:564961.
- 8 Potenza MA, Addabbo F, Montagnani M. *Vascular actions of insulin with implications for endothelial dysfunction*. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009;297:E568-77.
- 9 Jablonka E. *Epigenetic variations in heredity and evolution*. *Clin Pharmacol Ther* 2012;92:683-8.
- 10 Cencioni C, Spallotta F, Greco S, et al. *Epigenetic mechanisms of hyperglycemic memory*. *Int J Biochem Cell Biol* 2014;51:155-8.
- 11 Keating ST, Plutzky J, El-Osta A. *Epigenetic changes in diabetes and cardiovascular risk*. *Circ Res* 2016;118:1706-22.
- 12 Kolfshoten IG, Regazzi R. *Technology insight: small, noncoding RNA molecules as tools to study and treat endocrine diseases*. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2007;3:827-34.
- 13 Kaufmann J, Ahrens K, Santel A. *RNA interference for therapy in the vascular endothelium*. *Microvasc Res* 2010;80:286-93.
- 14 Zhang Y, Sun X, Icli B, et al. *Emerging roles for MicroRNAs in diabetic microvascular disease: novel targets for therapy*. *Endocr Rev* 2017;2017:1-22.
- 15 Simpson K, Wonnacott A, Fraser DJ, et al. *MicroRNAs in diabetic nephropathy: from biomarkers to therapy*. *Curr Diab Rep* 2016;16:35.
- 16 Sollberger G, Tilley DO, Zychlinsky A. *Neutrophil extracellular traps: the biology of chromatin externalization*. *Dev Cell* 2018;44:542-53.
- 17 Fadini GP, Menegazzo L, Scattolini V, et al. *A perspective on NETosis in diabetes and cardiometabolic disorders*. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2016;26:1-8.
- 18 Menegazzo L, Ciciliot S, Poncina N, et al. *NETosis is induced by high glucose and associated with type 2 diabetes*. *Acta Diabetol* 2015;52:497-503.
- 19 Fadini GP, Menegazzo L, Rigato M, et al. *NETosis delays diabetic wound healing in mice and humans*. *Diabetes* 2016;65:1061-71.
- 20 Fadini GP, Losordo D, Dimmeler S. *Critical reevaluation of endothelial progenitor cell phenotypes for therapeutic and diagnostic use*. *Circ Res* 2012;110:624-37.
- 21 Fadini GP, Boscaro E, de Kreutzenberg S, et al. *Time course and mechanisms of circulating progenitor cell reduction in the natural history of type 2 diabetes*. *Diabetes Care* 2010;33:1097-102.
- 22 Rigato M, Avogaro A, Fadini GP. *Levels of circulating progenitor cells, cardiovascular outcomes and death: a meta-analysis of prospective observational studies*. *Circ Res* 2016;118:1930-9.
- 23 Busik JV, Tikhonenko M, Bhatwadekar A, et al. *Diabetic retinopathy is associated with bone marrow neuropathy and a depressed peripheral clock*. *J Exp Med* 2009;206:2897-906.
- 24 Fadini GP, Di Persio JF. *Diabetes mellitus as a poor mobilizer condition*. *Blood Rev* 2018;32:184-91.
- 25 Fadini GP, Ciciliot S, Albiero M. *Concise review: perspectives and clinical implications of bone marrow and circulating stem cell defects in diabetes*. *Stem Cells* 2017;35:106-16.
- 26 Dell'Italia LJ, Collawn JF, Ferrario CM. *Multifunctional role of chymase in acute and chronic tissue injury and remodeling*. *Circ Res* 2018;122:319-36.
- 27 Hayashi T, Takai S, Yamashita C. *Impact of the renin-angiotensin-aldosterone-system on cardiovascular and renal complications in diabetes mellitus*. *Curr Vasc Pharmacol* 2010;8:189-97.
- 28 Taideman J, Perez-Novo CA, Rottiers I, et al. *Human mast cells express leptin and leptin receptors*. *Histochem Cell Biol* 2009;131:703-11.
- 29 Borland JA, Kelsall C, Yacoub MH, et al. *Expression, localisation and function of ACE and chymase in normal and atherosclerotic human coronary arteries*. *Vascul Pharmacol* 2005;42:99-108.