

Rassegna

Ruolo della ridotta biodisponibilità di ossido nitrico nelle complicanze vascolari del diabete mellito

RIASSUNTO

Nella presente rassegna saranno analizzati la fisiologia, la sintesi e i meccanismi d'azione dell'ossido nitrico (NO). Successivamente, verranno esaminate le cause e gli effetti di una ridotta biodisponibilità di NO nel diabete mellito, causata da un aumento della produzione di radicali liberi, secondaria all'iperglicemia. I radicali liberi ossidano i cofattori della sintesi dell'ossido nitrico, in modo da provocare una riduzione della sintesi di NO. Inoltre la diminuzione del glutatione ridotto conduce a una minore sintesi di nitrosoglutatione. Entrambe queste molecole sono composti intermedi importanti poiché conducono all'attivazione della guanilato-ciclastasi. Pertanto una loro ridotta sintesi conduce a una diminuita produzione di cGMP che è la molecola che fa da tramite per la maggior parte degli effetti del NO. Verranno, infine, considerate le eventuali strategie terapeutiche atte a migliorare la biodisponibilità di NO, agendo sulle cause che ne diminuiscono la sintesi. I trattamenti proposti sono basati sulle possibilità di contrastare lo stress ossidativo e in questo contesto i meccanismi fisiopatologici supportano fortemente l'impiego di tioli.

SUMMARY

Effects of low bioavailability of nitric oxide in vascular complications of diabetes mellitus

The physiology, synthesis and mechanisms of action of nitric oxide (NO), and the causes and effects of its low bioavailability in diabetes mellitus, are reviewed. This lack is due to the increased production of reactive oxygen species (ROS), secondary to hyperglycemia. ROS oxidize NO synthase cofactors, thus reducing NO production. The diminished supply of reduced glutathione results in a drop in nitrosoglutatione synthesis. Both these compounds are important intermediates of the NO pathway, that activate soluble guanylate cyclase to produce cGMP which is the main molecule that implements most of NO's effects. Therefore their oxidation leads to reduced cGMP production. There are several possible therapeutic strategies to improve NO bioavailability by acting on the causes of its low synthesis. The treatments proposed are based on counteracting oxidation and, from this viewpoint, the physiopathology strongly supports treatment with thiols.

A. Masha, V. Martina

Dipartimento di Medicina Interna, Divisione di Endocrinologia, Diabetologia e Metabolismo, Università di Torino, Torino

Corrispondenza: prof. Valentino Martina, Dipartimento di Medicina Interna, corso Dogliotti 14, 10126 Torino
e-mail: valentino.martina@unito.it

G It Diabetol Metab 2012;32:182-190

Pervenuto in Redazione il 04-05-2012

Accettato per la pubblicazione il 22-08-2012

Parole chiave: ossido nitrico, diabete mellito, cGMP, stress ossidativo, complicanze vascolari del diabete mellito, antiossidanti, tioli

Key words: nitric oxide, diabetes mellitus, cGMP, oxidative stress, vascular complications of diabetes mellitus, antioxidants, thiols

Introduzione

L'endotelio è stato a lungo considerato erroneamente solo una barriera tra il flusso sanguigno e la parete vascolare; in realtà svolge un ruolo cruciale nella regolazione dell'omeostasi vascolare. Le cellule dell'endotelio producono un fattore inizialmente chiamato *endothelium derived relaxing factor* (fattore rilassante derivato dall'endotelio, EDRF) in quanto riconosciuto in grado di produrre vasodilatazione¹. Successivamente, questo fattore fu identificato nell'ossido nitrico (NO)² e a esso, oltre alla vasodilatazione, si attribuiscono una serie di azioni tra cui l'inibizione dell'aggregazione piastrinica, la migrazione leucocitaria e la loro adesione all'endotelio, il rallentamento della proliferazione e migrazione delle cellule muscolari lisce³. La perdita dell'azione dell'NO da parte dell'endotelio promuove un fenotipo vascolare aterogeno come dimostrato da studi sperimentali su animali⁴.

Sintesi di ossido nitrico

L'NO è sintetizzato, a partire dall'aminoacido L-arginina, dall'ossido nitrico sintasi (NOS) in presenza di ossigeno molecolare. Sono descritte tre isoforme della NOS⁵, codificate da geni distinti. La NOS-1 è prevalentemente presente nei tessuti nervosi ed è meglio conosciuta come NOS neuronale (nNOS). La NOS-2, originariamente trovata nei macrofagi, viene espressa anche in una moltitudine di altre cellule, inclusi fibroblasti, epatociti e cellule muscolari lisce della parete vascolare. La NOS-3 (eNOS) è presente nelle cellule endoteliali, piastrine e cellule muscolari lisce ed è stata identificata come l'enzima attivo a livello endoteliale. La NOS-3 è la sorgente di una sintesi basale e continua di NO, necessaria per mantenere il tono vascolare di riposo. NOS-1 e NOS-3 sono espresse costitutivamente e la loro attività è calcio-dipendente, mentre la NOS-2, meglio nota come iNOS (NOS inducibile), viene espressa solo in alcune circostanze (per es. attivazione dei macrofagi).

Questa rassegna tratterà della eNOS, la cui attività è regolata da precursori, cofattori, agonisti chimici e forze fisiche.

Precursori

La disponibilità di L-arginina potrebbe essere un importante fattore che influisce sulla funzione della eNOS in quanto primo precursore della sintesi di NO⁶, ma è altamente improbabile in quanto la concentrazione intracellulare e plasmatica della molecola è dalle 20 alle 200 volte superiore a quella necessaria per un'attività enzimatica ottimale. Tuttavia, una minore disponibilità di L-arginina può diventare un passo limitante in presenza di falsi precursori derivati dall'arginina, che competono con la stessa per il legame con il sito attivo dell'enzima. È stato dimostrato che la N-mono-metil-L-arginina (L-NMMA) inibisce la sintesi di NO⁷ e l'effetto inibitore è prontamente invertito dalla L-arginina. La L-NMMA e altri inibitori derivati dal substrato sono stati utilizzati per la valutazione del ruolo dell'NO in diversi distretti vascolari, *in vitro* e

in vivo, sia in modelli animali sia nell'uomo. Incubata con gli anelli di aorta di coniglio, la L-NMMA provoca una significativa contrazione endotelio-dipendente e la sua infusione endovenosa negli animali induce un aumento dose-dipendente della pressione arteriosa, prontamente reversibile con la somministrazione endovenosa di L-arginina⁸. Nell'uomo la somministrazione di L-NMMA nell'arteria brachiale causa una vasocostrizione dose-dipendente della muscolatura dell'avambraccio⁹.

La dimetil-arginina asimmetrica (ADMA) è un altro falso precursore della NOS. La concentrazione plasmatica di questa molecola è risultata aumentata nei soggetti affetti da ipercolesterolemia, ipertensione e aterosclerosi¹⁰. La ADMA agisce come un inibitore competitivo dell'enzima, riducendo quindi la sintesi di NO attraverso la separazione dei due domini (vedi paragrafo seguente), evento che conduce alla produzione di specie reattive dell'ossigeno (*reactive oxygen species*, ROS). Pertanto l'ADMA viene considerata come uno dei fattori di aumentato rischio cardiovascolare. Nei pazienti affetti da diabete mellito (DM) i risultati riguardo alle sue concentrazioni plasmatiche sono contraddittori.

Cofattori

La NOS ha una struttura dimerica; ogni monomero contiene un dominio riduttasi e uno ossigenasi. Il dominio riduttasi racchiude il sito di legame per i cofattori flavina adenina dinucleotide (FAD), flavina mononucleotide (FMN) e nicotinamide adenina dinucleotide fosfato (NADPH). Il dominio ossigenasi contiene un eme e i siti di legame per la L-arginina e la tetraidrobiopterina (BH4). La BH4 ha importanti effetti sulla struttura e funzione della NOS: include la stabilizzazione della struttura dimerica e la facilitazione del legame con la L-arginina¹¹. Studi *in vitro* hanno dimostrato che la ridotta biodisponibilità di BH4 si traduce nel disaccoppiamento (*uncoupling*) della NOS, portando alla produzione di anione superossido e H₂O₂. Quest'ultima possibilità spiega come, in alcune circostanze, quali per esempio la carenza di BH4, la NOS possa concorrere al peggioramento dello stress ossidativo.

La calmodulina, infine, la cui azione dipende dalle normali fluttuazioni del calcio intracellulare, lega reversibilmente la NOS tramite l'interazione con il suo specifico sito di legame¹², situato tra i due domini, regolando il trasferimento di elettroni dal dominio riduttasi a quello ossigenasi.

Agonisti chimici

In vitro e nell'animale molte sostanze chimiche, come l'acetilcolina, la bradichinina e la sostanza P, sono in grado di indurre una vasodilatazione. Questo effetto è almeno parzialmente attenuato dalla L-NMMA, evidenziando che il rilassamento della muscolatura liscia vascolare endotelio-dipendente provocato da questi agonisti è, almeno in parte, mediato dall'NO. La L-NMMA riduce il rilasciamento stimolato dagli agonisti nei vasi arteriosi e venosi anche nell'uomo⁷; il grado di inibizione della dilatazione agonista-dipendente è diverso nei vari distretti vascolari.

Forze fisiche

Lo *shear-stress* esercitato dal flusso ematico è un importante stimolo fisiologico nella regolazione del rilascio di NO. I meccanismi implicati includono un'attivazione estremamente rapida mediata dai canali ionici e una lenta comprendente la fosforilazione della eNOS. Inoltre, una ulteriore e più lenta forma di attivazione è dovuta all'aumento dell'espressione dello mRNA dell'eNOS, con conseguente aumento dell'enzima stesso³. L'applicazione dello *shear-stress* alle cellule endoteliali dell'aorta di bovino provoca un aumento importante e immediato del calcio libero intracellulare, seguito da una sua rapida riduzione¹³. L'aumento intracellulare del calcio avviene solo in risposta al flusso pulsatile e non a quello continuo. I meccanismi che permettono la rapida produzione di NO in risposta allo *shear-stress* includono l'attivazione di canali per il potassio e il cloro. Il bilancio tra la corrente anionica e cationica determina il potenziale netto di membrana e i seguenti cambiamenti nella concentrazione di calcio che, da parte sua, produce l'attivazione della eNOS e la produzione di NO. L'attivazione lenta della eNOS da parte dello *shear-stress* avviene tramite la fosforilazione di Akt e l'effetto è indipendente dalla concentrazione intracellulare di calcio¹⁴; questo effetto sembra essere mediato dalla fosfatidilinositolo 3-chinasi (PI3 chinasi). Lo *shear stress* stimola anche la trascrizione genica della eNOS per il mantenimento a lungo termine della produzione di NO¹⁵ in modo dose-dipendente.

Effetti biologici dell'ossido nitrico

Gli effetti vascolari mediati dall'NO includono sia una vasodilatazione diretta (flusso-dipendente e recettore-mediata) sia una vasodilatazione indiretta per l'inibizione dei fattori vasocostrittori. L'NO ha anche un effetto antitrombotico e antinfiammatorio dovuto all'inibizione di aggregazione piastrinica e adesione leucocitaria³. Infine, l'NO neutralizza l'anione superossido e ha un effetto antiproliferativo per l'inibizione dell'iperplasia muscolare liscia (Tab. 1).

Una volta sintetizzato, l'NO diffonde nella membrana cellulare endoteliale ed entra nella cellula muscolare liscia dove, in condizioni fisiologiche, attiva la guanilato-ciclastasi solubile

Tabella 1 Azioni vasoprotettive dell'ossido nitrico.

Vasodilatazione
Inibizione dell'attivazione e aggregazione piastrinica
Inibizione dell'espressione delle molecole di adesione
Inibizione dell'interazione piastrine-leucociti
Inibizione della proliferazione delle cellule muscolari lisce
Inibizione dell'espressione del fattore tissutale
Riduzione dell'ossidazione del colesterolo LDL
Aumento della sensibilità all'insulina

(sGC) che sintetizza il guanosin-3',5'-monofosfato ciclico (cGMP)¹⁶ responsabile della maggior parte degli effetti dell'NO (Fig. 1).

Nel corso degli ultimi anni, tuttavia, è diventato sempre più chiaro che l'NO esercita molte delle sue azioni cellulari anche in modo cGMP-indipendente. Sono state descritte *in vivo* reazioni dell'NO con l'ossigeno, il ferro, il gruppo eme, le proteine contenenti gruppi tiolici, il DNA e alcune amine suscettibili alla s-nitrosilazione, portando in molti casi a perdita della loro funzione^{17,18}.

Alterazioni della biodisponibilità di ossido nitrico

La riduzione della biodisponibilità di NO produce vasocostrizione (dovuta alla mancanza del rilassamento muscolare liscio), trombosi (per l'aggregazione piastrinica), infiammazione (per l'*up-regulation* delle molecole di adesione leucociti-endotelio) e ipertrofia vascolare (dovuta alla proliferazione muscolare vasale). Questo è il primo passo del processo aterosclerotico e prende il nome di "disfunzione endoteliale"¹⁹.

La disfunzione endoteliale è presente in molte malattie come l'ipercolesterolemia, l'ipertensione²⁰, il diabete mellito²¹ e altre ancora e può essere dovuta sia a diminuita sintesi di NO sia a diminuita biodisponibilità dell'NO stesso. La sintesi di NO potrebbe essere ridotta dalla presenza di polimorfismi della eNOS, dalla presenza di falsi precursori o dalla diminui-

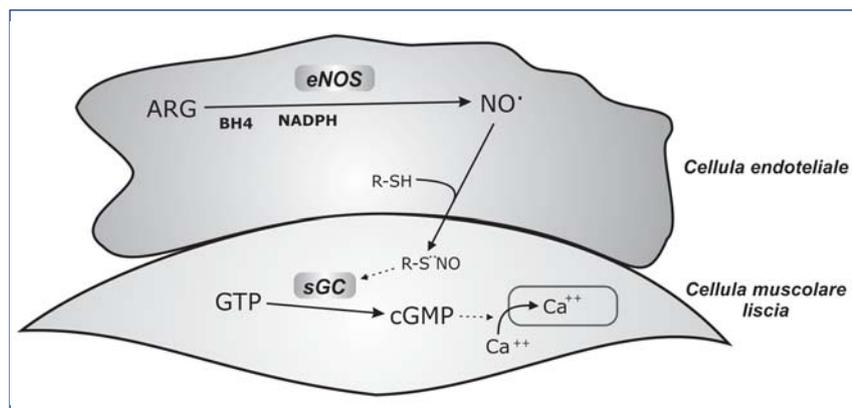


Figura 1 La via NO-cGMP nell'endotelio in condizioni di normale stato ossidoriduttivo della cellula. L'NO è sintetizzato dalla NOS in presenza dei suoi cofattori; reagendo con i tioli, viene trasportato e attiva la sGC, producendo cGMP. ARG: arginina; BH4: tetraidrobiopterina; Ca⁺⁺: calcio ionizzato; cGMP: guanosin monofosfato ciclico; eNOS: ossido nitrico sintasi; GTP: guanosin trifosfato; NADPH: nicotinamide adenina dinucleotide fosfato; NO: ossido nitrico; R-SH: tiolo ridotto; R-S*NO: nitrosotiole; sGC: guanilato ciclastasi solubile.

ta concentrazione di cofattori dell'enzima (per ridotta sintesi od ossidazione di BH4 e NADPH). La biodisponibilità di NO è essenzialmente dovuta alle ROS che ossidano sia l'NO prodotto sia il gruppo eme della sGC e i tioli con il risultato di una minore sintesi di cGMP.

La disfunzione endoteliale è associata anche all'insulino-resistenza²². Questo fenomeno è dovuto alla mancata attivazione della eNOS a causa dell'inibizione della via della PI3 chinasi/Akt, normalmente attivata dall'insulina²³. D'altra parte, quando vi è una minore biodisponibilità di NO, comunque indotta (ovvero anche non per via dell'inibizione della via della PI3 chinasi/Akt, per esempio per ossidazione dei tioli), si determina una ridotta vasodilatazione con minore perfusione tissutale. Questo comporta una riduzione del reclutamento di cellule in grado di metabolizzare il glucosio (unità metaboliche) con conseguente minore estrazione di glucosio (insulino-resistenza).

Iperglicemia e ossidazione

Disturbi funzionali del flusso sanguigno e della funzione vascolare sono stati identificati sin dall'inizio dello sviluppo del diabete mellito. Queste alterazioni sono dovute principalmente alla diminuita produzione di NO con conseguente disfunzione endoteliale e sbilanciamento tra vasodilatatori, vasocostrittori e fattori di permeabilità prodotti dall'endotelio. L'iperglicemia, come vedremo più avanti nel dettaglio, è in grado sia di ridurre la produzione di ossido nitrico sia di inibirne la sua biodisponibilità a livello endoteliale²⁴.

Classicamente, i meccanismi coinvolti nello sviluppo delle complicanze nel diabete mellito sono: il potenziamento della via dei polioli, l'aumento nella formazione di prodotti di glicazione avanzata delle proteine (*advanced glycation end-product*, AGE), l'attivazione della proteina chinasi C (PKC) e l'incremento della funzione della via dell'esosamina. Questi meccanismi sono sempre stati descritti come indipendenti, nonostante alcuni dei metaboliti di una via possano attivare un'altra (per es. la produzione di metilglicosale, precursore degli AGE, e diacilglicerolo, attivatore della PKC, nella via dei polioli per l'aumento del rapporto citosolico NADH:NAD⁺). È interessante notare che tutti i precursori di queste reazioni derivano direttamente dal normale metabolismo del glucosio²⁵.

Il metabolismo cellulare del glucosio è un processo composto da due fasi. Nel primo, la glicolisi, l'ossidazione nel citoplasma del glucosio intracellulare, genera NADH e piruvato. Il piruvato entra nella seconda fase, il ciclo degli acidi tricarbossilici, nel mitocondrio, producendo infine anidride carbonica, acqua, NADH e FADH₂. Questi ultimi due forniscono energia per la produzione di ATP nella fosforilazione ossidativa nella catena di trasporto degli elettroni. In questa catena il flusso di elettroni avviene grazie a quattro complessi enzimatici associati alla membrana interna mitocondriale, al citocromo C e al trasportatore mobile ubiquinone. Il NADH dona gli elettroni al complesso I che li trasferisce all'ubichinone. Gli elettroni, dall'ubichinone ridotto, vengo-

no successivamente trasferiti al complesso III grazie al ciclo Q e, infine, tramite il citocromo C e la citocromo C ossidasi (complesso IV), all'ossigeno molecolare. Il trasferimento degli elettroni nei complessi I, III e IV genera un gradiente protonico che rende possibile l'attivazione dell'ATP sintasi (complesso V).

Tutte le forme di diabete mellito sono caratterizzate da iperglicemia. In tutti i tessuti liberamente permeabili all'entrata del glucosio (quali endotelio e cellule nervose) il suo metabolismo è accelerato, con conseguente aumentato gradiente protonico nella membrana mitocondriale interna. Vi è un valore soglia della differenza di potenziale elettrochimico, generato dal gradiente protonico, al di sopra del quale la produzione di superossido è marcatamente aumentata. Questo avviene in quanto, in tali condizioni, l'emivita dei trasportatori intermedi degli elettroni, come il semichinone, è prolungata. Il semichinone è un radicale che si forma tra l'aggiunta del primo protone e il secondo all'ubichinone nell'interfaccia con il complesso I e il complesso III²⁵. Essendo il semichinone un radicale libero, la sua aumentata emivita induce una generazione di anione superossido. La sovrapproduzione di anione superossido, prodotta dall'iperglicemia, riduce del 66% l'attività della gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (GAPDH)²⁶, con conseguente accumulo dei metaboliti glicolitici, incluso il glucosio, a monte dell'enzima.

In conclusione, il processo di ossidazione indotto dall'iperglicemia è alla base di ognuno dei quattro principali meccanismi implicati nella patogenesi delle complicanze diabetiche.

Ossido nitrico e stato ossidativo

Quando in presenza di iperglicemia vengono generate grandi quantità di ROS, le cellule non sono in grado di controbilanciare l'ossidazione risultante con i normali meccanismi (in particolare catalasi e superossido dismutasi). Si determina quindi l'ossidazione di una serie di molecole ridotte tra cui nucleotidi e tioli. In questa situazione, le ROS producono una riduzione della biodisponibilità di NO tramite almeno quattro meccanismi (Fig. 2):

- 1) reazione diretta con l'NO sintetizzato, formando perossinitrito;
- 2) ossidazione del cofattore BH₄, con successivo disaccoppiamento della eNOS;
- 3) diminuita presenza di tioli intracellulari, con conseguente ridotta produzione di S-nitrosotioli, *reservoir* a lunga vita e trasportatori dell'NO, e successiva diminuzione della sintesi di cGMP;
- 4) alterazione dell'espressione e attività della sGC dovuta all'ossidazione e susseguente perdita dell'eme.

La ridotta produzione e biodisponibilità di NO rappresenta verosimilmente il primo passo del danno endoteliale.

Infine, con particolare riferimento al punto 1 di cui sopra, si può affermare che, quando l'NO è sintetizzato dopo che lo stress ossidativo ha bruciato le difese antiossidanti della cellula, i suoi effetti sono dannosi.

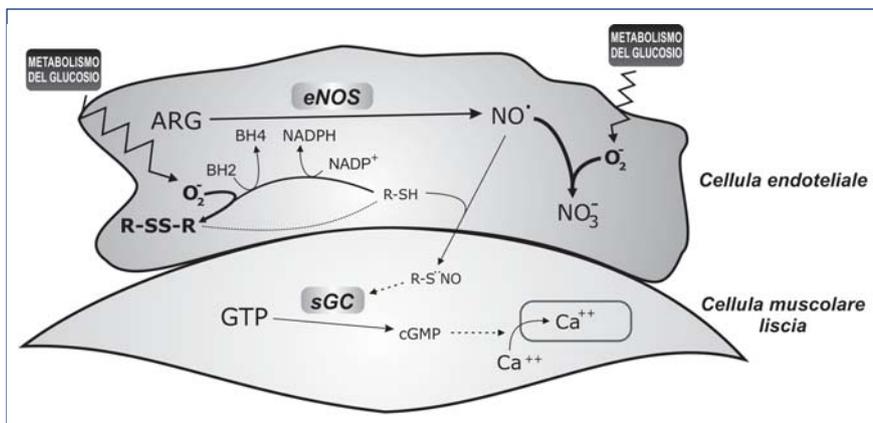


Figura 2 Produzione di NO e via della sGC nello stress ossidativo. In questa situazione, i cofattori della NOS e i tioli sono ossidati. La produzione di NO è ridotta e la mino-

re quantità prodotta reagisce in prima istanza con le ROS producendo perossinitrito. La via tioli-sGC è rallentata e la quantità prodotta di cGMP è diminuita. ARG: arginina; BH2: diidrobiopterina; BH4: tetraidrobiopterina; Ca⁺⁺: calcio ionizzato; cGMP: guanosin monofosfato ciclico; eNOS: ossido nitrico sintasi; GTP: guanosin trifosfato; NADP⁺: nicotinamide adenina dinucleotide fosfato ossidato; NADPH: nicotinamide adenina dinucleotide fosfato; NO[•]: ossido nitrico; NO₃⁻: perossinitrito; O₂⁻: sostanze ossidanti; R-SH: tiolo ridotto; R-S[•]NO: nitrosotolo; R-SS-R: tiolo ossidato; sGC: guanilato ciclasi solubile.

Disfunzione endoteliale nel diabete mellito

Come precedentemente descritto, l'esposizione all'iperglicemia può alterare la normale risposta delle cellule endoteliali tramite l'incremento dell'ossidazione, deteriorando quindi l'omeostasi tissutale e alterando il tono vascolare. Negli stadi precoci, la disfunzione endoteliale può essere reversibile, ma nel corso della malattia può produrre modifiche permanenti della struttura vascolare, contribuendo alla formazione della placca e alle manifestazioni trombotiche e ischemiche che si manifestano infine come complicanze cliniche.

Dati sperimentali in vitro e nell'animale

Negli studi sull'animale, con l'eccezione degli studi di Tesfamariam²⁷, in presenza di alte concentrazioni di glucosio, la somministrazione di agonisti muscarinici produceva una ridotta risposta vascolare endotelio-indotta²⁸. Inoltre il grado di disfunzione endoteliale correlava con la durata del diabete e il controllo metabolico.

Pieper ha documentato che, in base alla durata della malattia in animali con diabete indotto da streptozotocina o alloxano²⁹, si susseguono risposte vascolari aumentate, inalterate e ridotte. Due anni prima, Cosentino e collaboratori avevano trovato un aumento nell'espressione della NOS e nella produzione di NO in colture di cellule endoteliali esposte ad alte concentrazioni di glucosio. Veniva inoltre osservato un aumento di 7 volte nella produzione di anione superossido³⁰. Questi risultati sono in accordo con l'ipotesi che l'aumento della produzione di NO riflette un meccanismo compensatorio, almeno inizialmente, come risposta all'aumentata inattivazione dell'NO da parte dei radicali liberi prodotti dall'iperglicemia e di conseguenza l'incapacità di produrre adeguate quantità di cGMP.

Infine, in quasi tutti gli studi sugli animali diabetici è stata osservata un'alterata vasodilatazione endotelio-dipendente, con normale vasodilatazione alla somministrazione di nitro-

derivati. Questa apparente contraddizione si spiega ricordando la fisiologia della produzione del vero fattore di rilascio muscolare che è rappresentato dal cGMP (vedi sopra). In sintesi il danno ossidativo avviene nell'endotelio che non è più in grado di produrre quantità sufficienti di NO che, passando nella cellula muscolare, dovrebbe attivare la cascata che conduce alla sintesi di cGMP. Se invece l'NO viene fornito alle cellule muscolari lisce mediante la somministrazione di nitrati (che rilasciano NO), esse sono in grado di sintetizzare cGMP (e quindi si produce vasodilatazione). Anche la via di attivazione della sGC potrebbe essere inattivata dall'ossidazione, ma dal momento che le cellule muscolari lisce non sono permeabili liberamente al glucosio non risentono, o quanto meno risentono in modo molto attenuato, del danno ossidativo.

Dati nell'uomo

Il diabete mellito, e in particolare il diabete mellito di tipo 2, è caratterizzato da aumentata mortalità cardiovascolare, responsabile dell'80% dei decessi. In questi pazienti, gli studi clinici sono inevitabilmente portati all'errore dall'alta prevalenza di altri fattori di rischio cardiovascolari che modificano la funzione endoteliale e, di conseguenza, gli studi su pazienti con diabete mellito di tipo 1 sono più adatti per capire il danno causato dall'iperglicemia.

La prima evidenza di disfunzione endoteliale nell'uomo fu descritta nei corpi cavernosi penieni di pazienti con diabete mellito di tipo 1 e 2³¹. Nel diabete di tipo 1, la maggioranza degli studi ha dimostrato una vasodilatazione endotelio-dipendente alterata, nonostante sia stato descritto un aumentato flusso sanguigno nelle prime fasi del diabete in diversi organi³², in accordo con i risultati di Pieper nei ratti³³. Nei pazienti con diabete mellito di tipo 1 con normali coronarografie è stata descritta una ridotta vasodilatazione indotta dall'acetilcolina nelle coronarie e nei vasi dell'avambraccio. Diversi studi nei diabetici hanno documentato una vasodilatazione endotelio-indipendente conservata (come la risposta ai nitroderivati) sebbene siano state dimostrate risposte tar-

dive nelle arterie femorali e dell'avambraccio di pazienti con diabete mellito di tipo 1, soprattutto se presente microalbuminuria³⁴.

In conclusione, la maggioranza degli studi nel diabete mellito di tipo 1 ha dimostrato una vasodilatazione endotelio-dipendente alterata. Al contrario, non ci sono dati sufficienti per dimostrare un'alterata risposta del muscolo liscio vascolare all'NO. È rilevante il fatto che c'è un'alterata risposta ai donatori di NO quando c'è già stato un danno organico (come la microalbuminuria). Questo può essere spiegato considerando che un'esposizione prolungata allo stress ossidativo può ossidare anche la cellula muscolare liscia, in particolare portando a ossidazione dei tioli, molecole essenziali per l'attivazione della sGC.

Un altro meccanismo mediante il quale viene alterata la via NO/cGMP nel diabete mellito potrebbe essere rappresentato dalla diminuita rigenerazione di glutazione ridotto (e in generale di gruppi tiolici) dovuto all'eccesso di lipidi insaturi³⁵.

Terapia

Per evitare il declino della funzione endoteliale vengono raccomandati accorgimenti non farmacologici come una dieta appropriata, esercizio fisico regolare e sospensione del fumo, insieme a interventi farmacologici per ottenere e mantenere un buon controllo glicemico e lipidico assieme all'uso di antiaggreganti e ACE-inibitori. A ben guardare quasi tutte le altre strategie citate insistono sul contenimento del danno ossidativo. Viene pertanto spontaneo pensare anche a strategie farmacologiche con antiossidanti.

Terapia con antiossidanti

Vitamine

Nel 1993, venne descritto il "paradosso francese" del colesterolo³⁶, che documentava una prevalenza di eventi cardiovascolari quattro volte superiore nella popolazione finlandese rispetto a quella francese, a parità di concentrazioni plasmatiche di colesterolo. Questo dato suggeriva la presenza di almeno un altro fattore causale nella malattia cardiovascolare, oltre al colesterolo. La differenza più importante nelle due popolazioni era rappresentata dal tipo di dieta, essendo quella mediterranea ricca di sostanze antiossidanti. Di conseguenza, il fattore responsabile di questo fenomeno fu identificato nel danno ossidativo.

In precedenza abbiamo descritto i meccanismi di produzione di ROS da parte dell'iperglicemia e, in accordo con ciò, le diverse evidenze che suggeriscono una ridotta difesa antiossidante nel diabete mellito³⁷ valutata sia come diminuzione dello stato antiossidante totale del plasma sia come diminuzione dei livelli di alcuni antiossidanti quali l'acido ascorbico e la vitamina E^{38,39}.

Sulla base di queste evidenze, una terapia con supplementazione di antiossidanti è plausibile che possa conferire un effetto benefico sulle complicazioni cardiovascolari del dia-

bete mellito. Tuttavia, sfortunatamente, gli studi HOPE e GISSI, eseguiti in prevenzione secondaria, dimostrarono che la supplementazione di vitamina E nella dieta non riduce l'incidenza degli eventi cardiovascolari^{40,41}.

Tioli

Nel 1980, Ignarro mise in risalto l'importanza dei tioli nell'attivazione della sGC⁴² e successivamente Pieper dimostrò che la somministrazione del tiolo N-acetilcisteina (NAC) nei ratti diabetici era in grado di abolire la disfunzione endoteliale⁴³. Anche la supplementazione di BH4 provocava un miglioramento della disfunzione endoteliale nell'animale⁴⁴. Inoltre, noi abbiamo dimostrato che la somministrazione parenterale del glutatione per 10 giorni nei pazienti con diabete mellito di tipo 1 causava un aumento della sintesi di cGMP⁴⁵. Più recentemente, in soggetti affetti da DMT2 abbiamo documentato la riduzione dello stress ossidativo e della disfunzione endoteliale, dopo la somministrazione di NAC sia in acuto⁴⁶ sia in cronico⁴⁷; in quest'ultimo studio è stato osservato anche il miglioramento della pressione arteriosa sia sistolica sia diastolica.

In considerazione del ruolo fondamentale che giocano i tioli nella via NO/cGMP, è opportuno che essi mantengano la loro integrità (conservazione del gruppo -SH); essa può essere difesa dalla somministrazione di antiossidanti. Questo potrebbe spiegare i risultati favorevoli ottenuti con la somministrazione di antiossidanti "non specifici per l'NO" in prevenzione primaria. Al contrario, quando i tioli sono ossidati, il loro specifico ruolo di attivatori NO-dipendenti della cGMP viene perso ed è impossibile per gli antiossidanti "non specifici per l'NO" sostituire questa funzione. In questa situazione, solo la supplementazione con tioli è in grado di abolire, o almeno attenuare, la disfunzione endoteliale.

Di conseguenza il "paradosso francese" del colesterolo potrebbe essere spiegato come segue. Lo studio epidemiologico delle popolazioni francese e finlandese potrebbe essere interpretato come uno studio di prevenzione primaria. Nella popolazione francese viene conservata una migliore concentrazione di tioli a causa della presenza nella cellula di maggiore quantità di sostanze antiossidanti dovuta alla dieta francese. Nella popolazione finlandese i tioli nel corso della vita diminuiscono più rapidamente, causa la dieta carente in antiossidanti.

Va d'altra parte aggiunto che, dal momento che negli studi di prevenzione secondaria (come gli studi HOPE e GISSI) si deve supporre che la produzione di cGMP sia già ridotta, essendo stata causa in gran parte dell'evento cardiovascolare, la supplementazione con vitamine "antiossidanti non specifiche per l'NO" non ripristina la ridotta concentrazione di tioli ("antiossidanti specifici per NO"). Di conseguenza, il trattamento in questione non si traduce in un aumento della produzione di cGMP (con conseguente mancata riduzione della mortalità). Quindi, solo la somministrazione di tioli potrebbe migliorare la funzionalità della via NO/cGMP (Fig. 3).

Altri meccanismi potenzialmente benefici del miglioramento della funzione vascolare da parte dei tioli comprendono la stimolazione diretta dell'attività della NOS, l'inibizione dell'i-

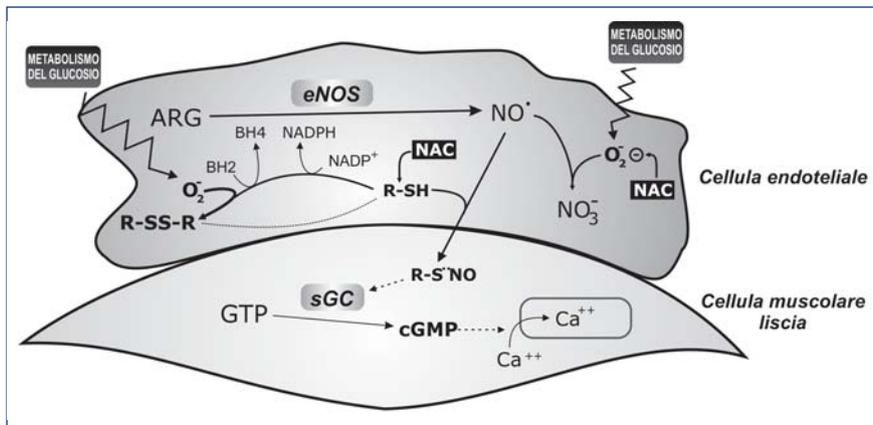


Figura 3 Ripristino della via NO-tioli-cGMP dopo la somministrazione di tioli. I tioli aumentano sia la produzione di NO, ripristinando la forma ridotta dei cofattori della

NOS, sia del cGMP, agendo come intermediari attivi dell'attivazione NO-dipendente della sGC. ARG: arginina; BH2: diidrobiopterina; BH4: tetraidrobiopterina; Ca⁺⁺: calcio ionizzato; cGMP: guanosin monofosfato ciclico; eNOS: ossido nitrico sintasi; GTP: guanosin trifosfato; NAC: N-acetilcisteina; NADP⁺: nicotinamide adenina dinucleotide fosfato ossidato; NADPH: nicotinamide adenina dinucleotide fosfato; NO: ossido nitrico; NO₃⁻: perossinitrito; O₂⁻: sostanze ossidanti; R-SH: tiolo ridotto; R-S[•]NO: nitrosotiole; R-SS-R: tiolo ossidato; sGC: guanilato ciclasi solubile.

nattivazione dell'enzima e la protezione dei cofattori essenziali della NOS, in particolare della BH4, dall'ossidazione⁴⁸ (Fig. 3).

In conclusione, questi dati evidenziano il ruolo cardine dei tioli nella prevenzione e nel ripristino della funzione endoteliale. Ulteriori studi più approfonditi sono necessari per confermare questi risultati positivi e meglio comprendere il meccanismo d'azione dei tioli.

Altre strategie

Attualmente si stanno studiando nuovi agenti terapeutici specifici per l'endotelio. Questi comprendono un potenziatore della eNOS, AVE9488, che dovrebbe up-regolare l'espressione dell'enzima, o stimolatori e attivatori della sGC⁴⁹. Gli stimolatori della sGC necessitano del gruppo prostetico eme dell'enzima intatto e funzionale e agiscono in maniera sinergica con l'NO, mentre gli attivatori della sGC, come il BAY 58-2667, dimostrano effetti additivi quando associati ai donatori di NO³⁷.

Un'altra strategia è data dall'inibizione della fonte dei ROS, in particolare l'inibizione della NADPH ossidasi. In effetti, nei pazienti diabetici, l'anione superossido prodotto dalle NADPH ossidasi e il disaccoppiamento della eNOS, contribuiscono significativamente alla disfunzione endoteliale⁵⁰.

Conclusioni

Lo stress ossidativo derivato dall'iperglicemia è alla base delle complicanze vascolari del diabete mellito e il danno è verosimilmente mediato dall'inattivazione dell'NO. In base a queste considerazioni, sono state tentate diverse strategie terapeutiche utilizzando antiossidanti, quali le vitamine C ed E, senza risultati. L'utilizzo di NAC in alcuni nostri studi ha fornito risultati positivi apprezzabili sulla funzione endoteliale. Noi proponiamo, pertanto, una distinzione tra antiossidanti "non specifici per l'NO" (vitamine e quant'altro) e "specifici

per NO" (tioli come la NAC), questi ultimi in grado di ripristinare la biodisponibilità di NO.

Conflitto di interessi

Nessuno.

Bibliografia

1. Furchgott RF, Zawadzki JV. *The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine*. Nature 1980;288:373-6.
2. Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S. *Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelial-derived relaxing factor*. Nature 1987;327:524-6.
3. Ignarro LJ. *Endothelium-derived nitric oxide: actions and properties*. FASEB J 1989;3:31-6.
4. Cayatte AJ, Palacino JJ, Horten K, Cohen RA. *Chronic inhibition of nitric oxide production accelerates neointima formation and impairs endothelial function in hypercholesterolemic rabbits*. Arterioscler Thromb 1994;14:753-9.
5. Marletta MA. *Nitric oxide synthase structure and mechanism*. J Biol Chem 1993;268:12231-4.
6. Moncada S, Higgs A. *The L-arginine-nitric oxide pathway*. N Engl J Med 1993;329:2002-12.
7. Ashina M, Bendtsen L, Jensen R, Olesen J. *Nitric oxide-induced headache in patients with chronic tension-type headache*. J Brain 2000;123:1830-7.
8. Rees DD, Palmer RM, Moncada S. *Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure*. Proc Natl Acad Sci USA 1989;86:3375-8.
9. Vallance P, Chan N. *Endothelial function and nitric oxide: clinical relevance*. Heart 2001;85:342-50.
10. Böger RH, Bode-Böger SM, Thiele W, Junker W, Alexander K, Frölich JC. *Biochemical evidence for impaired nitric oxide synthesis in patients with peripheral arterial occlusive disease*. Circulation 1997;95:2068-74.

11. Cosentino F, Luscher TF. *Tetrahydrobiopterin and endothelial nitric oxide synthase activity*. Cardiovasc Res 1999;43:274-8.
12. Drab M, Verkade P, Elger M, Kasper M, Lohn M, Lauterbach B et al. *Loss of caveolae vascular dysfunction and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice*. Science 2001; 293:2449-52.
13. Ando J, Komatsuda T, Kamiya A. *Cytoplasmic calcium response to fluid shear stress in cultured vascular endothelial cells*. In Vitro Cell Dev Biol 1988;24:871-7.
14. Fleming I, Bauersachs J, Fisslthaler B, Busse R. *Ca²⁺-independent activation of the endothelial nitric oxide synthase in response to tyrosine phosphatase inhibitors and fluid shear stress*. Circ Res 1998;82:686-95.
15. Resnick N, Yahav H, Schubert S, Wolfovitz E, Shay A. *Signalling pathways in vascular endothelium activated by shear stress: relevance to atherosclerosis*. Curr Opin Lipidol 2000;11:167-77.
16. Arnold WP, Mittal CK, Katsuki S, Murad F. *Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations*. Proc Natl Acad Sci USA 1977;74:3203-7.
17. Martinez-Ruiz A, Villanueva L, Gonzalez de Orduna C, Lopez-Ferrer D, Higuera MA, Tarin C et al. *S-nitrosylation of Hsp90 promotes the inhibition of its ATPase and endothelial nitric oxide synthase regulatory activities*. Proc Natl Acad Sci USA 2005;102:8525-30.
18. Bolotina VM, Najibi S, Palacino JJ, Pagano PJ, Cohen RA. *Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle*. Nature 1994;368:850-3.
19. Versari D, Daghini E, Viridis A, Ghiadoni L, Taddei S. *Endothelial dysfunction as a target for prevention of cardiovascular disease*. Diabetes Care 2009;32:S314-21.
20. Taddei S, Viridis A, Ghiadoni L, Sudano i, Salvetti A. *Endothelial dysfunction in hypertension*. J Cardiovasc Pharmacol 2001; 38:S11-4.
21. Avogaro A, de Kreutzenberg SV, Fadini G. *Endothelial dysfunction: causes and consequences in patients with diabetes mellitus*. Diabetes Res Clin Pract 2008;82:S94-101.
22. Creager MA, Luscher TF, Cosentino F, Beckman JA. *Diabetes and vascular disease: pathophysiology clinical consequences and medical therapy: Part I*. Circulation 2003;108:1527-32.
23. Wheatcroft SB, Williams IL, Shah AM, Kearney MT. *Pathophysiological implications of insulin resistance on vascular endothelial function*. Diabet Med 2003;20:255-68.
24. Williams SB, Goldfine AB, Timimi FK, Ting HH, Roddy MA, Simonson DC et al. *Acute hyperglycemia attenuates endothelium-dependent vasodilation in humans in vivo*. Circulation 1998;97:1695-701.
25. Brownlee M. *Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications*. Nature 2001;414:813-20.
26. Du XL, Edelstein D, Rossetti L, Fantus IG, Goldberg H, Ziyadeh F et al. *Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp1 glycosylation*. Proc Natl Acad Sci USA 2000;97:12222-6.
27. Tesfamariam B, Brown ML, Cohen RA. *Elevated glucose impairs endothelium-dependent relaxation by activating protein kinase C*. J Clin Invest 1991;87:1643-8.
28. De Vriese AS, Verbeuren TJ, Van de Voorde J, Lameire NH, Vanhoute PM. *Endothelial dysfunction in diabetes*. Br J Pharmacol 2000;130:963-74.
29. Pieper GM. *Enhanced unaltered and impaired nitric oxide-mediated endothelium-dependent relaxation in experimental diabetes mellitus: importance of disease duration*. Diabetologia 1999;42:204-13.
30. Cosentino F, Hishikawa K, Katusic ZS, Luscher TF. *High glucose increases nitric oxide synthase expression and superoxide anion generation in human aortic endothelial cells*. Circulation 1997;96:25-8.
31. Saenz de Tejada I, Goldstein I, Azadzi K, Krane RJ, Cohen RA. *Impaired neurogenic and endothelium-mediated relaxation of penile smooth muscle from diabetic men with impotence*. N Engl J Med 1989;320:1025-30.
32. Vervoort G, Wetzels JF, Lutterman JA, van Doorn LG, Berden JH, Smits P. *Elevated skeletal muscle blood flow in noncomplicated type 1 diabetes mellitus: role of nitric oxide and sympathetic tone*. Hypertension 1999;34:1080-5.
33. Pieper GM, Gross GJ. *Oxygen free radicals abolish endothelium-dependent relaxation in diabetic rat aorta*. Am J Physiol 1988; 255:H825-33.
34. Zenere BM, Arcaro G, Saggiani F, Rossi L, Muggeo M, Lechi A. *Noninvasive detection of functional alterations of the arterial wall in IDDM patients with and without microalbuminuria*. Diabetes Care 1995;18:975-82.
35. Tomaskova Z, Cacanyiova S, Benco A, Kristek F, Dugovicova L, Hrbac J et al. *Lipids modulate H(2)S/HS(-) induced NO release from S-nitrosoglutathione*. Biophys Res Commun 2009; 390:1241-4.
36. Artaud-Wild SM, Connor SL, Sexton G, Connor WE. *Differences in coronary mortality can be explained by differences in cholesterol and saturated fat intakes in 40 countries but not in France and Finland. A paradox*. Circulation 1993;88:2771-9.
37. Ceriello A, Quagliaro L, Catone B, Pascon R, Piazzola M, Bais B et al. *Role of hyperglycemia in nitrotyrosine postprandial generation*. Diabetes Care 2002;25:1439-43.
38. Ceriello A, Bortolotti N, Crescentini A, Motz E, Lizzio S, Russo A et al. *Antioxidant defences are reduced during the oral glucose tolerance test in normal and non-insulin-dependent diabetic subjects*. Eur J Clin Invest 1998;28:329-33.
39. Ceriello A, Bortolotti N, Falletti E, Taboga C, Tonutti L, Crescentini A et al. *Total radical-trapping antioxidant parameter in NIDDM patients*. Diabetes Care 1997;20:194-7.
40. Lonn E, Yusuf S, Hoogwerf B, Pogue J, Yi Q, Zinman B et al. *Effects of vitamin E on cardiovascular and microvascular outcomes in high-risk patients with diabetes: results of the HOPE study and MICRO-HOPE substudy*. Diabetes Care 2002; 25:1919-27.
41. Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto miocardico. *Dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin E after myocardial infarction: results of the GISSI-Prevenzione trial*. Lancet 1999;354:447-55.
42. Ignarro LJ, Edwards JC, Gruetter DY, Barry BK, Gruetter CA. *Possible involvement of S-nitrosothiols in the activation of guanylate cyclase by nitroso compounds*. FEBS Lett 1980; 110:275-8.
43. Pieper GM, Siebeneich W. *Oral administration of the antioxidant N-acetylcysteine abrogates diabetes-induced endothelial dysfunction*. J Cardiovasc Pharmacol 1998;32:101-5.
44. Pieper GM. *Acute amelioration of diabetic endothelial dysfunction with a derivative of the nitric oxide synthase cofactor tetrahydrobiopterin*. J Cardiovasc Pharmacol 1997;29:8-15.
45. Martina V, Bruno GA, Zumpano E, Origlia C, Quaranta L, Pescarmona GP. *Administration of glutathione in patients with type 2 diabetes mellitus increases the platelet constitutive nitric oxide synthase activity and reduces PAI-1*. J Endocrinol Invest 2001;24:37-41.

46. Masha A, Brocato L, Dinatale S, Mascia C, Biasi F, Martina V. *N-acetylcysteine is able to reduce the oxidation status and the endothelial activation after a high-glucose content meal in patients with type 2 diabetes mellitus.* J Endocrinol Invest 2009;32:352-6.
47. Martina V, Masha A, Gigliardi VR, Brocato L, Manzato E, Berchio A et al. *Long-term N-acetylcysteine and L-arginine administration reduces endothelial activation and systolic blood pressure in hypertensive patients with type 2 diabetes.* Diabetes Care 2008;31:940-4.
48. Hofmann H, Schmidt HH. *Thiol dependence of nitric oxide synthase.* Biochemistry 1995;34:13443-52.
49. Stasch JP, Becker EM, Alonso-Alija C, Apeler H, Dembowsky K, Feurer A et al. *NO-independent regulatory site on soluble guanylate cyclase.* Nature 2001;410:212-5.
50. Guzik TJ, Mussa S, Gastaldi D, Sadowski J, Ratnatunga C, Pillai R et al. *Mechanisms of increased vascular superoxide production in human diabetes mellitus: role of NAD(P)H oxidase and endothelial nitric oxide synthase.* Circulation 2002;105:1656-62.