



**UNIVERSITA' DI PISA**  
**FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA**

**DOTTORATO DI RICERCA IN**  
**CHIRURGIA, BIOTECNOLOGIE E IMMUNOLOGIA**  
**DEI TRAPIANTI**

*Presidente: Prof. Franco Mosca*

***EFFETTI DEL TRAPIANTO D'ORGANO SUI***  
***MARCATORI DI SENESCENZA CELLULARE***

Candidato:  
Dott. ssa Francesca Pancani

Tutore: Prof. Stefano Del Prato

Anno Accademico 2011/2012

## INDICE ANALITICO

|                            |     |
|----------------------------|-----|
| 1. RIASSUNTO.....          | 2   |
| 2. INTRODUZIONE.....       | 3   |
| 3. SCOPO DELLO STUDIO..... | 25  |
| 4. MATERIALI E METODI..... | 25  |
| 5. ANALISI STATISTICA..... | 88  |
| 6. RISULTATI.....          | 90  |
| 7. DISCUSSIONE.....        | 121 |
| 8. CONCLUSIONI.....        | 126 |
| 9. BIBLIOGRAFIA.....       | 127 |

## 1. RIASSUNTO

I telomeri sono strutture nucleoproteiche specializzate localizzate alle estremità dei cromosomi lineari eucariotici, costituite da sequenze nucleotidiche altamente ripetute. La loro principale funzione risiede nel mantenimento dell'integrità genomica, nella protezione del DNA contro il rischio dei fenomeni di degradazione o ricombinazione nel corso della replicazione cellulare. La Telomerasi è un complesso enzimatico che ha come principale compito il mantenimento della lunghezza telomerica, e pertanto dell'integrità dei cromosomi. Il nostro scopo è stato quello di valutare l'effetto del trapianto d'organo (PTA e SPK) sui più importanti marcatori di cellular senescence e stress ossidativo nei soggetti riceventi trapianto di pancreas.

Abbiamo valutato 39 pazienti (LISTA TX) che hanno effettuato la valutazione per l'inserimento in lista attiva per il trapianto combinato di rene-pancreas (SPK) o pancreas isolato (PTA). Sono inoltre stati valutati soggetti già sottoposti a trapianto (TX), soggetti affetti da diabete mellito tipo 1 non complicato (T1DM), soggetti affetti da diabete mellito tipo 2 (T2DM) ed infine soggetti sani (ND). I pazienti sono stati sottoposti a valutazione del profilo glicometabolico ed alla raccolta di un campione ematico. Sono stati valutati: lunghezza telomerica, attività telomerasica e concentrazione plasmatica di nitrotirosina. Sono emerse una correlazione negativa significativa fra la lunghezza dei telomeri e l'età ed in BMI del soggetto. Valutando la correlazione tra lunghezza dei telomeri e parametri di controllo metabolico, abbiamo documentato un'associazione negativa significativa con il livello di colesterolo totale ed il colesterolo LDL. Inoltre, è emersa una correlazione positiva significativa fra la lunghezza dei telomeri ed il colesterolo HDL. Rispetto ai controlli sani, la lunghezza dei telomeri è risultata significativamente aumentata nei soggetti in valutazione per trapianto. Per quanto concerne l'attività telomerasica, essa è risultata significativamente aumentata. I parametri di studio telomerico tendevano alla normalizzazione nel gruppo trapiantato. In merito alla concentrazione di nitrotirosina come marker di stress ossidativo, i suoi livelli sono risultati significativamente maggiori in tutti i gruppi studiati rispetto ai non diabetici. In conclusione le alterazioni del metabolismo telomerico presenti nel diabete sembrano tendere verso la normalizzazione dopo il trapianto di pancreas.

## 2. INTRODUZIONE

### 2.1 I Telomeri

I telomeri sono strutture nucleoproteiche specializzate, identificate e caratterizzate nei primi Anni Ottanta da Elizabeth Blackburn, Jack Szostak e Carol Greider (1; 2; 3). I telomeri (dal Greco “*télos*” fine, termine, e “*méros*”, parte) si localizzano a mò di “cappuccio” alle estremità dei cromosomi lineari eucariotici. Sono costituiti da esameri di sequenze nucleotidiche altamente ripetute che variano da specie a specie (in quella umana la sequenza è TTAGGG), e che si estendono per 10-15 kb nella parte terminale del cromosoma, a protezione delle terminazioni 3' e 5' dei filamenti di DNA, i quali sarebbero altrimenti suscettibili alla degradazione nucleasica ed a fenomeni di fusione e ricombinazione genica (4; 5).

Oltre a questa funzione protettiva, le estremità telomeriche regolano il riconoscimento e la separazione dei cromosomi durante la mitosi, facilitano la replicazione del DNA nei vari stadi del ciclo mitotico e meiotico, posizionando ed ancorando i cromosomi al macchinario nucleare (6), ed influenzano la trascrizione di geni posti in contiguità delle estremità cromosomiche (7).

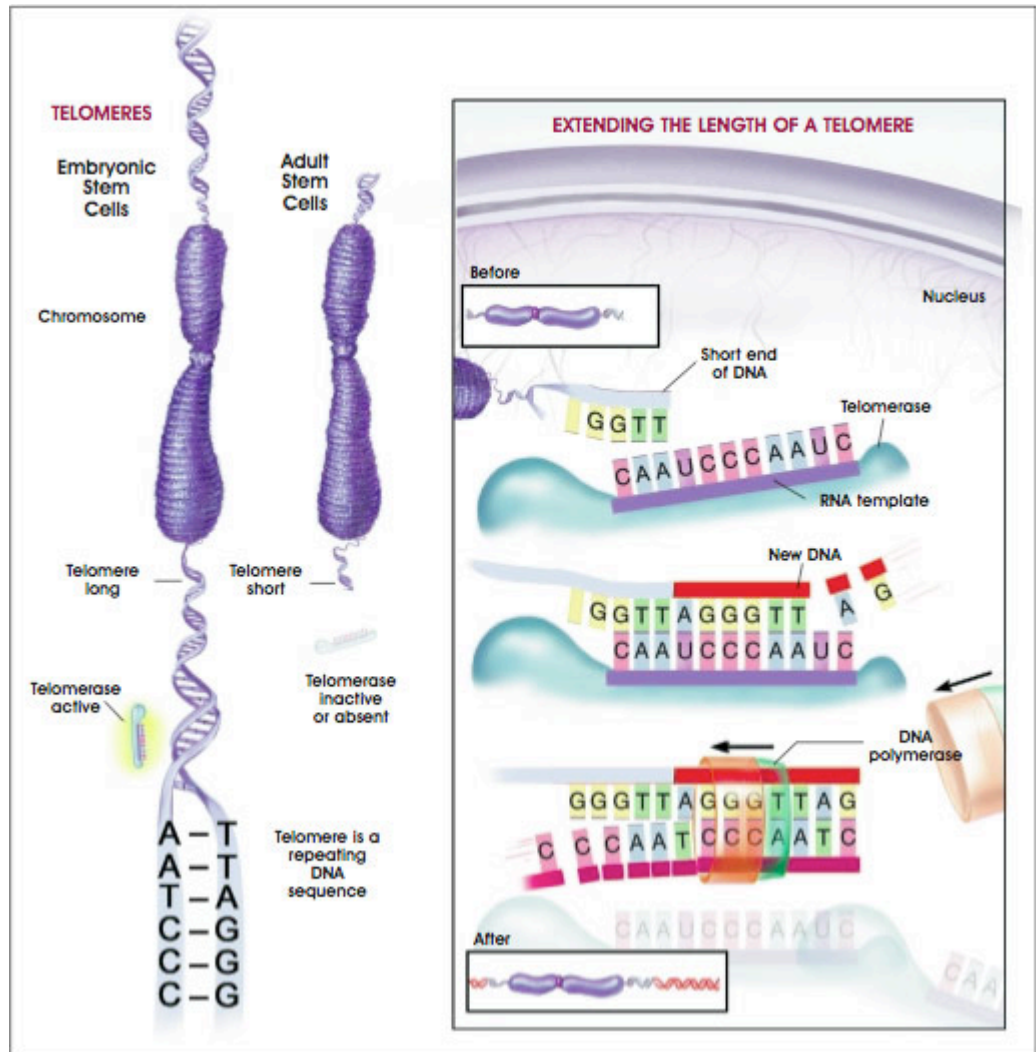
Fisiologicamente, ad ogni duplicazione cellulare una piccola porzione telomerica (30-200 bp) viene persa; ciò comporta, nel tempo e



con il susseguirsi delle repliche cellulari, il raggiungimento di una lunghezza telomerica “critica” che determina l’attivazione di uno stato di cosiddetta “replicative senescence”, ossia un blocco irreversibile del ciclo cellulare in G0-G1, nel quale la cellula interrompe la sua proliferazione ed è predisposta ad andare verso l’apoptosi.

Il concetto di un limite alla possibilità replicativa della cellula era stato già introdotto da Hayflick (8), il quale aveva rilevato che la cellula poteva andare incontro ad un numero limitato di repliche, per poi perdere la propria capacità replicativa; questo fenomeno, indicato come il “limite di Hayflick”, è stato meglio compreso proprio grazie alle conoscenze acquisite sulla biologia dei telomeri .

**Figura 1.** I telomeri.

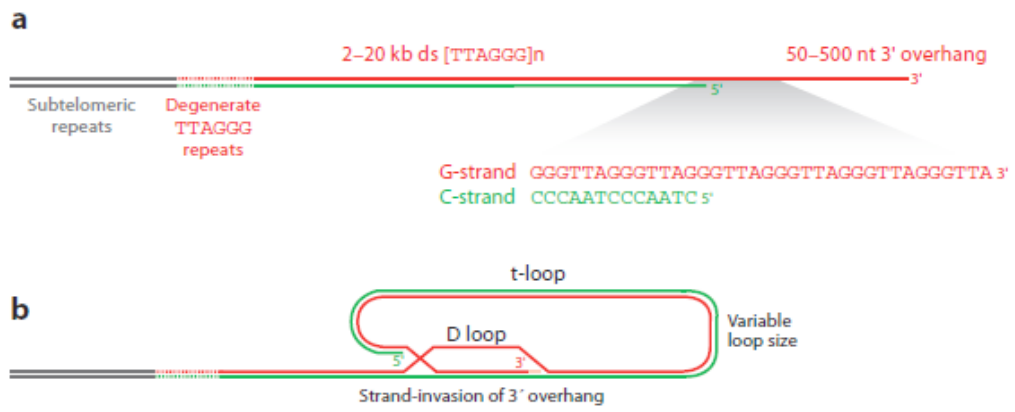


Le sequenze telomeriche sono caratterizzate dal mantenimento di una particolare conformazione; difatti tali sequenze, ripiegandosi caratteristicamente, terminano in una struttura 3' sul filamento leading lunga circa 150 nucleotidi, a singola catena, a mò di protrusione, denominata *G-strand overhang* (in quanto ricca in G). Questa prominente termina con un'estremità 3'-OH libera, si ripiega ad ansa per insinuarsi poi nella doppia elica di DNA telomerico, la quale a sua volta si apre formando una struttura a tripla elica, la cosiddetta *D-loop* (displacement loop).

La grande ansa che deriva dal ripiegamento dell'estremità protrudente si apre per intersecarsi con la regione a doppia elica, andando a formare una prende invece il nome di *t-loop* (telomere-loop).

Questa speciale conformazione da un lato protegge la struttura dall'attacco delle esonucleasi e dai fenomeni di fusione termino-terminale, evitando che l'estremità 3' del cromosoma venga erroneamente riconosciuta dai sistemi di riparazione del DNA come rottura del doppio filamento, dall'altro rappresenta un fattore limitante per l'allungamento dei telomeri, poiché rende inaccessibile all'enzima telomerasi l'estremità da allungare.

**Figura 2.** Conformazione dei telomeri.

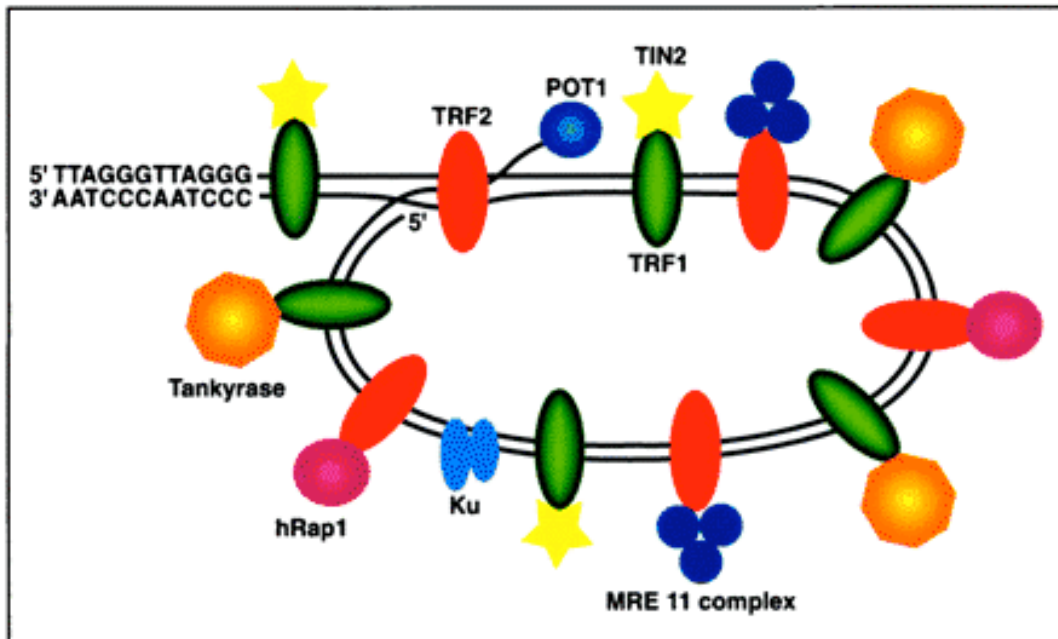


La struttura nucleotidica viene legata da un complesso costituito da sei proteine (TRF1, TRF2, Rap1, TIN2, TPP1, and POT1), che nell'insieme prende il nome di *Shelterin complex* (9), e che ha il compito di proteggere le estremità cromosomiche dal potenziale danneggiamento del DNA; questo complesso proteico inoltre regola il mantenimento dei telomeri da parte dell'enzima Telomerasi.

Le proteine dello Shelterin Complex si associano specificamente con le ripetizioni telomeriche TTAGGG, mediano sia la formazione che la stabilità del t-loop (regolando in questo modo l'attività telomerasica), nonché quella delle estremità cromosomiche (interagendo sia con la struttura a singolo che a doppio filamento), contribuendo così alla funzione protettiva dei telomeri.

Nei mammiferi la conformazione ad anello del t-loop sembra essere favorita essenzialmente da due delle proteine del complesso Shelterin, la TRF-1 (telomeric repeat binding factor 1) e la TRF2 (TTAGGG repeat binding factors), le quali legano i segmenti di DNA a doppio filamento (10). Mentre la prima, TRF-1, regola la lunghezza del telomero, inibendone l'allungamento una volta raggiunta la misura critica, la seconda, TRF2, ostacola la fusione delle estremità cromosomiche assicurando la stabilità dei telomeri; inoltre TRF2 favorisce l'inserimento del G-strand overhang all'interno del dsDNA del telomero, assicurando all'estremità protrudente integrità e stabilità.

**Figura 3.** Proteine dello Shelterin Complex.



La principale ed ormai accettata funzione dei telomeri risiede nel mantenimento dell'integrità genomica, nella protezione del DNA contro il rischio dei fenomeni di degradazione o ricombinazione nel corso della replicazione cellulare (11; 12; 13); a dimostrazione di questo importante ruolo, è stato constatato come l'accorciamento delle estremità telomeriche si associ all'aumento del rischio di instabilità del genoma, con fenomeni di "end-to-end fusion" ed apoptosi cellulare (14).

La lunghezza iniziale dei telomeri è determinata da una serie di fattori di natura sia genetica che ambientale (15; 16; 17).

In ambito fisiologico, il progressivo accorciamento dei telomeri è stato proposto come uno dei principali meccanismi implicati del normale processo di invecchiamento cellulare (18).

Negli ultimi anni, inoltre, numerosi studi hanno suggerito un ruolo per i telomeri in un ampio spettro di patologie umane, dall'anemia aplastica, all'insufficienza midollare, alle patologie neoplastiche, alla fibrosi polmonare, sino alle patologie di tipo cardiovascolare (19).

## **2.2 La Telomerasi**

La descrizione della Telomerasi da parte di Carol Greiden ha segnato un importante passo verso la comprensione della biologia dei telomeri (20).

La Telomerasi (telomere terminal transferase) (21) è un complesso enzimatico che ha come principale compito il mantenimento della lunghezza telomerica, e pertanto dell'integrità dei cromosomi.

Tutte le DNA polimerasi convenzionali possono procedere solamente in direzione 5'→3', e la diversa conformazione dei due filamenti di DNA determina un differente processo di sintesi per ciascun'elica; duplicando le catene genomiche a partire dall'estremità 3' le DNA polimerasi richiedono un primer a RNA o a DNA; quando la forcina di replicazione procedendo si avvicina all'estremità del cromosoma lineare, la sintesi del filamento guida (leading strand) prosegue fino al termine della catena stampo del DNA e la doppia elica figlia viene rilasciata dopo essere stata duplicata interamente ed in maniera continua. La catena stampo per il filamento lento (lagging strand), invece, viene copiata in maniera discontinua e a partire da piccoli primer di RNA. Quando l'ultimo innesco ad RNA viene rimosso, non c'è nessun innesco a monte cui la DNA polimerasi possa legarsi per riempire il vuoto determinato dalla rimozione del primer. Per questa ragione, il filamento di DNA sintetizzato come filamento tardivo verrebbe accorciato ad ogni divisione cellulare,



dando luogo al cosiddetto “end replication problem” (descritto da Watson nel 1972) (22; 23) o “theory of marginotomy” (24), dovuto appunto all’incapacità delle DNA polimerasi di replicare completamente le estremità 3’ dei cromosomi lineari.

. Questo progressivo accorciamento viene evitato ad opera della Telomerasi.

Si tratta di una trascrittasi inversa (o DNA polimerasi RNA-dipendente) telomero-specifica che utilizza come stampo frammenti di RNA per la sintesi del DNA telomerico, che aggiungendo ripetizioni telomeriche alle estremità dei cromosomi lineari ne contrasta il meccanismo di accorciamento terminale. Essa è espressa nelle cellule della linea germinale, mentre generalmente non è attiva nelle cellule somatiche.

Le componenti della forma attiva dell’enzima Telomerasi sono la *human Telomerase Reverse Transcriptase* (hTERT), che è la subunità proteica catalitica dell’enzima ad attività trascrittasi inversa, e la *human Telomerase RNA Component* (hTERC), che invece è una subunità ad RNA che funge da RNA template.

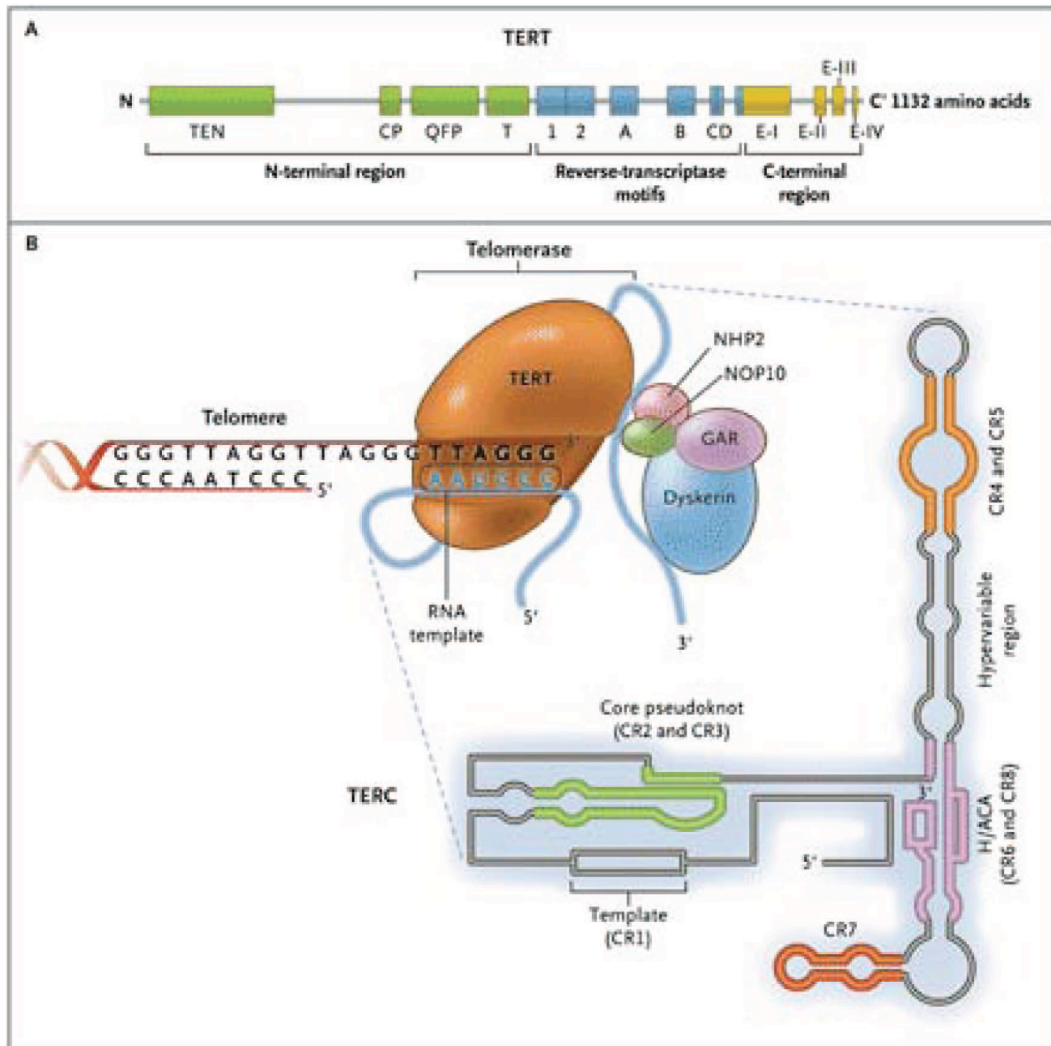
Il complesso enzimatico è inoltre legato da una proteina principale, *Discherina*, e da alcune proteine minori specie-specifiche, che hanno il compito di aumentare la stabilità dello stesso (25).

La telomerasi riconosce l’estremità 3’ del filamento leading e sintetizza una copia della ripetizione telomerica (5’-TTAGGG-3’). Dopo

molti cicli di estensione, la replicazione del filamento lagging all'estremità del cromosoma può essere completata usando queste estensioni come stampo per la sintesi del filamento complementare da parte di una DNA polimerasi. Questo meccanismo assicura che l'estremità 3' del DNA telomerico sia sempre più lunga dell'estremità 5' con cui è appaiata (3' overhang).

In sintesi, usando la TERC come template la trascrittasi inversa TERT sintetizza DNA telomerico, mantenendo la lunghezza dei telomeri ed impedendone l'accorciamento.

**Figura 4.** Telomeri e telomerasi.



Come già detto, l'attività telomerasica è molto bassa o addirittura assente nelle cellule somatiche adulte, con conseguente erosione dei telomeri di circa 50-150 bp ad ogni divisione cellulare. Per questo motivo, dopo un numero finito di divisioni cellulari, la maggior parte delle cellule umane entra nello stato di senescenza cellulare.

L'assenza dell'attività telomerasica nella cellula somatica adulta è legata essenzialmente alla regolazione dell'espressione del gene TERT, che non è generalmente misurabile nelle cellule somatiche dopo la nascita. Al contrario, il gene codificante per TERC è espresso in maniera sovrapponibile nei tessuti germinali ed in quelli somatici.

La regolazione dell'attività telomerasica avviene a molteplici livelli, attraverso interazioni trascrizionali, post-traduzionali, meccanismi di fosforilazione e di controllo ormonale. Il principale modello proposto descrive la presenza dell'enzima in due diverse conformazioni, forma attiva e forma inattiva, regolate da reazioni di fosforilazione e de fosforilazione; nello specifico, la protein kinasi B (PKB o Akt) fosforilerebbe un peptide componente dell'hTERT stimolandone l'attività catalitica (26; 27).

L'assenza dell'attività telomerasica correla con l'accorciamento telomerico con l'età sia in vivo che in vitro (28), mentre quest'attività enzimatica è mantenuta nelle cellule dei tessuti in rapida proliferazione,

anche se bassi livelli di attività enzimatica non sono sufficienti per prevenire l'accorciamento dei telomeri (29; 30; 31).

### **2.3 *Telomeri e Rischio di Diabete***

Un crescente numero di osservazioni ha suggerito negli ultimi anni l'associazione tra l'accorciamento dei telomeri e lo spettro delle diverse alterazioni del metabolismo glucidico. Infatti, la lunghezza telomerica è risultata significativamente ridotta nei soggetti affetti da ridotta tolleranza ai carboidrati rispetto a controlli sani (32). In questo studio, è stato inoltre osservato come la lunghezza telomerica sia positivamente correlata al colesterolo HDL e negativamente all'emoglobina glicata, all'HOMA IR. Altri studi hanno potuto evidenziare il nesso tra stato dei telomeri e condizioni di insulinoresistenza (33), osservando una significativa correlazione di tipo inverso tra indice di massa corporea (indicativo di uno stato di eccesso ponderale), HOMA IR (Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance) e lunghezza telomerica.

La stessa correlazione inversa tra lunghezza dei telomeri e HOMA IR è stata riscontrata in una coorte proveniente dal Framingham Heart Study (34). Anche in una popolazione di pazienti affetti da malattia coronarica aterosclerotica è stato dimostrato che, nei soggetti rispondenti ai criteri per la definizione di Sindrome Metabolica, la lunghezza dei telomeri, nonché l'attività telomerasica, erano ridotte (35).

Anche nel Diabete mellito tipo 2 è stato riportato il dato di una lunghezza telomerica significativamente ridotta rispetto ai soggetti non diabetici (36; 37), con la dimostrazione di un'associazione tra accorciamento telomerico e durata di malattia (38).

Anche il grado di compenso metabolico è stato proposto come fattore in grado di influenzare il metabolismo dei telomeri; infatti, l'ottenimento di un buon controllo glicemico sembra correlare con la riduzione dell'attrito delle estremità telomeriche nelle cellule mononucleate estratte da sangue di soggetti con Diabete mellito sia di tipo 2 che di tipo 1 (39).

Molti autori dunque hanno condiviso l'ipotesi che un accorciamento "patologico" o comunque accentuato dei telomeri, e quindi un'alterazione nella loro biologia, caratterizzi le varie espressioni della malattia diabetica, che, sebbene attraverso molte vie patogenetiche diverse tra loro, condividono la stessa *β cell failure* finale. Tuttavia, resta da chiarire se l'attrito telomerico possa rivestire un ruolo causale o sia semplicemente una conseguenza dello stato di iperglicemia cronica caratterizzante il diabete.

## **2.4 Telomeri e Beta Cellula**

Il Diabete Mellito tipo 2 è caratterizzato da un deficit secretorio di insulina dovuto al progressivo declino della funzione  $\beta$  cellulare e da uno stato variabile di insulino resistenza (40). E' stato dimostrato come nel diabete si assista da un lato alla riduzione della massa delle isole pancreatiche, ma soprattutto alla comparsa di fenomeni di disfunzione, senescenza ed infine apoptosi cellulare (41;42).

Oltre a questi meccanismi, che appaiono in parte mediati dallo stress ossidativo, (43), è stato dimostrato in vitro come anche l'accorciamento dei telomeri sia implicato nelle alterazioni dell'equilibrio  $\beta$  cellulare; infatti, isole pancreatiche umane stimolate alla replicazione in vitro, hanno mostrato un'accelerazione nell'attrito dei telomeri fino al raggiungimento di uno stato di senescenza (44).

In modelli animali di ritardo di crescita intrauterino (IUGR), durante la fase post natale di crescita accelerata sono stati osservati consensualmente sia l'accorciamento dei telomeri sia l'aumentata espressione di marcatori di senescenza  $\beta$ -cellulare (45).

L'attività telomerasica e l'espressione genica di TERT sono state esaminate in modelli murini di iperplasia  $\beta$  cellulare ed insulinoresistenza (i topi LIRKO, che sono knockout per il recettore insulinico epatico) o in modelli murini di ipoplasia  $\beta$  cellulare (i topi  $\beta$ IRKO, knockout per il

recettore insulinico a livello  $\beta$  cellulare, ed i topi knockout per la Ciclina D2). I risultati di queste analisi hanno indicato che la capacità proliferativa delle cellule insulari è associata con l'aumentata espressione di TERT e con l'attività telomerasica, a suggerire una possibile correlazione tra la stessa attività telomerasica (e quindi lunghezza dei telomeri) e la capacità replicativa delle  $\beta$ -cellule. In quest'ambito resta da chiarire se la lunghezza telomerica sia un semplice indicatore del potenziale replicativo della  $\beta$ -cellula oppure se possa indicare soggetti a rischio di  *$\beta$ -cell failure* e quindi di diabete.



## **2.5 Telomeri e Complicanze croniche del Diabete**

Alcuni studi hanno investigato recentemente l'eventuale correlazione tra accorciamento dei telomeri e complicanze croniche della malattia diabetica.

Sul versante delle complicanze microvascolari, la presenza di microalbuminuria (e quindi di un'iniziale compromissione vascolare renale a patogenesi diabetica), nell'ambito di una popolazione con diabete mellito tipo 2, è stata associata a telomeri più corti rispetto a quelli di soggetti diabetici ma non microalbuminurici (46).

Sempre relativamente alla complicanza nefropatica, su biopsie renali provenienti da soggetti con Diabete Mellito tipo 2 nefropatici è stato documentato un pattern di accelerata senescenza, con riduzione del 20% della lunghezza telomerica rispetto ai controlli (47), a supporto dell'ipotesi degli autori sul possibile ruolo dell'accelerata senescenza cellulare nella patogenesi della nefropatia diabetica.

Un altro studio, svolto stavolta su una popolazione composta da soggetti affetti da Diabete Mellito tipo 1 nell'ambito del Finnish Diabetic Nephropathy Study (48) ha dimostrato addirittura il valore predittivo di progressione del danno renale dell'accorciamento dei telomeri, come fattore indipendentemente associato.

Anche riguardo la complicanza oculare maggiormente caratteristica del diabete mellito, ossia la retinopatia diabetica, è stato proposto che il

danno ossidativo del DNA ed il quadro di senescenza telomero-mediata nelle cellule endoteliali ed in quelle epiteliali retiniche possano promuovere l'insorgenza della retinopatia diabetica (49).

In merito alle complicanze macroangiopatiche, che si manifestano come quadri di accelerata aterosclerosi a livello dei principali distretti arteriosi (coronarico, carotideo e periferico) (50), una riduzione significativa della lunghezza dei telomeri è stata descritta in pazienti diabetici con placche aterosclerotiche rispetto ai soggetti indenni da lesioni (32).

Un'analogha associazione è stata altresì descritta nei soggetti diabetici con precedente infarto miocardico acuto (51).

Uno studio prospettico svolto su 157 soggetti con Diabete Mellito tipo 1 microalbuminurici e 116 normoalbuminurici, con un follow up medio di 11,1 anni, ha documentato un'associazione significativa tra accorciamento dei telomeri e mortalità da tutte le cause; tale valore predittivo veniva mantenuto anche dopo l'aggiustamento per tutti i fattori di rischio tradizionali. In questa casistica non erano rilevate differenze tra soggetti normo e microalbuminurici, sebbene i soggetti microalbuminurici avessero, come già noto, un'aumentata mortalità (52).

## **2.6 Stress Ossidativo e Diabete**

Lo stress ossidativo viene definito come la conseguenza diretta dell'azione dannosa esercitata da quantità abnormemente elevate di radicali liberi (agenti ossidanti) su cellule, tessuti e macromolecole biologiche (53).

Esiste infatti un equilibrio molto raffinato tra la produzione e lo smaltimento dei radicali liberi da parte dei sistemi antiossidanti che, qualora alterato, concorre al processo di invecchiamento ed è coinvolto nella patogenesi di molte patologie, come l'ipertensione arteriosa, il morbo di Parkinson, la malattia di Alzheimer, le broncopneumopatie croniche ostruttive, l'artrite reumatoide, alcuni tipi di tumori ed il diabete.

Nella fisiopatologia del diabete, si ritiene che lo stress ossidativo svolga un ruolo fondamentale sia nel determinare il deficit funzionale che la progressiva perdita delle  $\beta$ -cellule (54; 55).

Inoltre è ormai dimostrato che l'iperproduzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) indotta dall'iperglicemia e dall'iperlipemia croniche sia il principale meccanismo attraverso il quale vengono innescate e successivamente progrediscono le complicanze croniche micro e macrovascolari del diabete (56; 57).

## ***2.7 Telomeri ed implicazioni terapeutiche nel Diabete mellito***

La dimostrazione di un ridotto attrito dei telomeri nei soggetti in buon controllo glicemico (39), sia nel diabete mellito tipo 2 che nel tipo 1, suggerisce la possibilità di poter rallentare l'invecchiamento cellulare attraverso il miglioramento dello stato metabolico.

Tale obiettivo può essere perseguito nel diabete attraverso la terapia medica oppure, in casi selezionati ove sussista l'indicazione, attraverso il trapianto di pancreas.

Il trapianto di pancreas, sia esso in forma di trapianto di pancreas isolato (PTA) o di pancreas combinato al rene (SPK) rappresenta ad oggi l'unica opzione terapeutica in grado di ristabilire completamente lo stato di euglicemia e di insulino-indipendenza nei soggetti affetti da diabete mellito tipo 1 (58)

Attualmente, il trapianto di pancreas isolato (PTA) e quello combinato di rene e pancreas (SPK), trovano indicazione rispettivamente nel diabete mellito tipo 1 con complicanze instabili o rapidamente progressive e nel diabete mellito tipo 1 complicato da insufficienza renale terminale.

Grazie ai continui progressi ottenuti in ambito chirurgico e medico, soprattutto al miglioramento degli schemi di terapia immunosoppressiva, i tassi di sopravvivenza a breve e medio termine sia del soggetto ricevente che del graft sono significativamente aumentati, così da far concentrare

l'attenzione degli studi sugli effetti a lungo termine del trapianto sull'organismo del soggetto ricevente e su come preservare al meglio la funzione dell'organo sostituito.

In merito all'evoluzione delle complicanze croniche del diabete (59), esistono evidenze che il trapianto di pancreas funzionante possa stabilizzare o addirittura favorire la regressione sia della nefropatia diabetica, che della retinopatia e della neuropatia diabetica. E' inoltre descritto il recupero della risposta ormonale controregolatoria all'ipoglicemia. I dati relativi all'impatto del trapianto di pancreas sulla patologia macrovascolare, sebbene meno numerosi, sono complessivamente favorevoli.

Non esistono ad oggi dati relativi al possibile impatto della sostituzione della funzione d'organo su parametri biologici di invecchiamento cellulare e stress ossidativo del soggetto ricevente.

### **3. SCOPO DELLO STUDIO**

Il nostro scopo è stato quello di valutare l'effetto del trapianto d'organo (in particolare PTA e SPK) sui più importanti marcatori di cellular senescence (lunghezza del telomero ed attività telomerasica) e stress ossidativo (nitrotirosina) nei soggetti riceventi trapianto di organo solido, rispetto a soggetti non trapiantati (affetti da diabete o soggetti di controllo non diabetici).

### **4. MATERIALI E METODI**

#### ***4.1 Pazienti***

Per questo studio sono stati valutati 39 pazienti (LISTA TX) che effettuavano la valutazione per l'inserimento in lista attiva per il trapianto combinato di rene-pancreas (SPK) o pancreas isolato (PTA), afferenti all'U.O.C Malattie Metaboliche e Diabetologia di Pisa e all' U.O. di Chirurgia Generale e Trapianti nell'Uremico e nel Diabetico dell'Azienda Ospedaliero Universitaria Pisana. Oltre a questi soggetti sono stati reclutati 15 soggetti già sottoposti a trapianto (TX), 35 soggetti affetti da

diabete mellito tipo 1 non complicato (T1DM), 18 soggetti affetti da diabete mellito tipo 2 (T2DM) ed infine 19 controlli sani non diabetici (ND).

Per ogni paziente è stata effettuata la raccolta dei dati anamnestici ed antropometrici.

Sono stati quindi valutati tutti i parametri di controllo glicometabolico e di funzionalità d'organo pancreatico e renale, mediante dosaggio di: glicemia, emoglobina glicata, peptide C, creatinemia, azotemia, colesterolo totale, trigliceridi, colesterolo HDL, colesterolo LDL, autoanticorpi anti-GAD<sub>65</sub> e anti-IA<sub>2</sub>, microalbuminuria.

I soggetti in valutazione per trapianto SPK o PTA (M/F = 25/14) avevano un'età media di 44±9 anni, e presentavano una durata di malattia media di 26±9 anni. Dai rilievi antropometrici si segnala un BMI medio di 23,89±3,2 kg/mq.

Per quanto concerne le complicanze microvascolari, il 95% dei soggetti presentava un quadro di retinopatia diabetica, mentre l'80% presentava nefropatia diabetica ed il 90% neuropatia diabetica. Nel 28% dei casi era presente anche una franca compromissione macroangiopatica (malattia aterosclerotica coronarica o vasculopatia carotidea o arteriopatia obliterante degli arti inferiori).

La valutazione di questa popolazione al baseline ha mostrato: glicemia a digiuno 190±109 mg/dl, emoglobina glicata 8.2±1,6 %, azotemia 127±57 mg/dl, creatinina 5,3±3,6 mg/dl, colesterolo totale

181±47 mg/dl, colesterolo HDL 52±16 mg/dl, colesterolo LDL 99±40 mg/dl, trigliceridi 163±102 mg/dl.

#### **4.2 Raccolta e Conservazione Campioni Biologici**

Per ciascun soggetto è stato raccolto un campione di sangue in una vacutainer trattata con EDTA o con attivatori della coagulazione (dosaggio anticorpi). Per la separazione di plasma e siero dalla componente cellulare i campioni sono stati centrifugati a 2650 xg per 5 minuti a 4°C.

La componente plasmatica e quella sierica sono state utilizzate immediatamente oppure preservate a - 80°; da tali componenti si è proceduto alla determinazione della concentrazione del glucosio, dell'emoglobina glicata, degli autoanticorpi anti-GAD<sub>65</sub> ed anti-IA<sub>2</sub>, del colesterolo totale, dei trigliceridi, del colesterolo HDL ed LDL, della creatinina, dell'urea e della nitrotirosina.

Dalla componente cellulare nucleata del sangue si è proceduto all'estrazione del DNA genomico e alla separazione dei linfomonociti (laddove non è stato possibile tali campioni sono stati anch'essi preservati a -80°C).

Da ogni paziente è stato infine ottenuto un campione di urine fresche del mattino, per la determinazione della microalbuminuria (indice precoce di nefropatia diabetica nonché riconosciuto marker di danno endoteliale).



### **4.3 Isolamento dei linfomonociti da sangue periferico**

I linfomonociti sono stati isolati da sangue periferico in EDTA. La procedura più comunemente usata è la separazione mediante centrifugazione in gradiente di densità. Per il nostro studio è stata utilizzata una soluzione, contenente un polimero idrofilico, con densità di 1077 g/ml (Biocoll Separating Solution, Biochrom AG, Berlin, Germany).

Il sangue è stato diluito 1:1 con soluzione fisiologica, per evitare la formazione di aggregati cellulari, stratificato molto lentamente su gradiente Biocoll e sottoposto ad una forza centrifuga di 560 xg per 30 minuti a temperatura ambiente.

Questo passaggio permette la stratificazione delle cellule del sangue in base alla densità: gli eritrociti raggiungono il fondo della provetta, i polimorfonucleati si raccolgono in una sottile patina bianca al di sopra dei globuli rossi, mentre le cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC: periferal blood mononucleated cell) formano un anello biancastro all'interfaccia tra il plasma e il polimero.

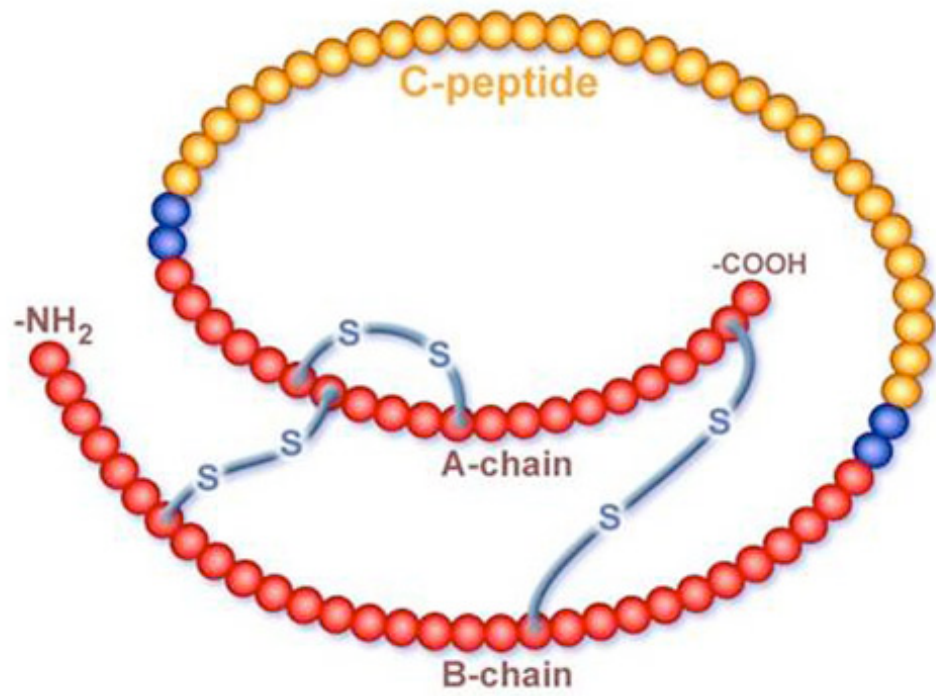
A questo punto i PBMC sono stati prelevati con una pipetta pasteur e sono stati eseguiti due lavaggi con soluzione fisiologica. Alla conclusione dell'ultimo lavaggio il pellet è stato risospeso nel terreno di coltura Miami Medium 1A (Mediatech Inc, CELLGRO, Miami, USA) ed è stata effettuata la conta cellulare, utilizzando una camera di Burker (60).

#### **4.4 Dosaggio del C-peptide con metodo I.R.M.A.**

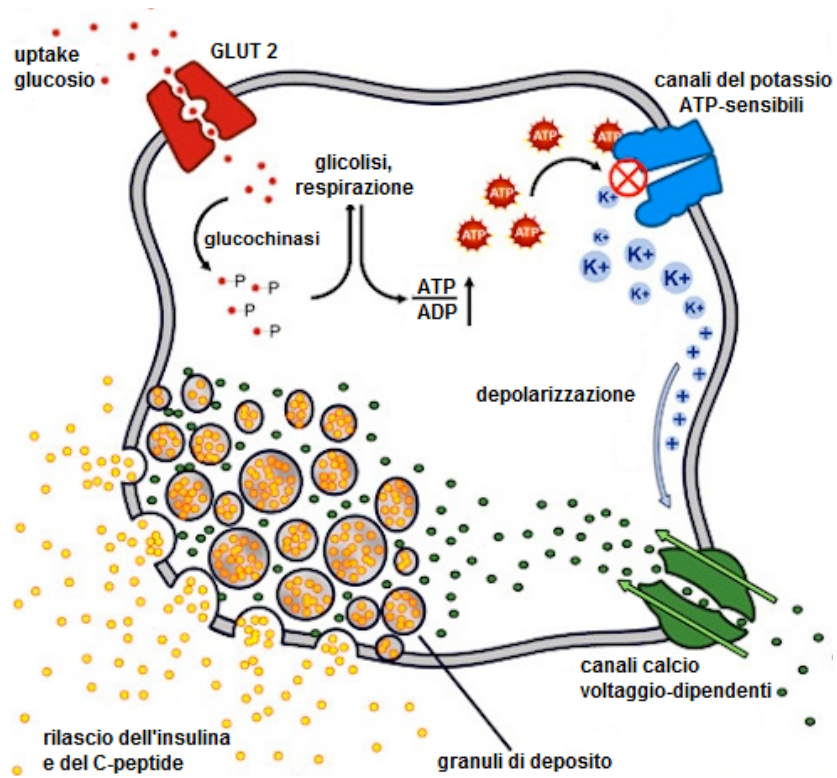
##### ***(ImmunoRadioMetric Assay)***

Il C-peptide è un corto frammento proteico di 31 amminoacidi, apparentemente privo di funzioni fisiologiche, che viene prodotto nella fase di maturazione dell'insulina. Nel reticolo endoplasmico, infatti, la proinsulina viene processata da endopeptidasi che, clivando il C-peptide, generano la forma matura dell'insulina. Sia l'insulina che il C-peptide vengono immagazzinati, in concentrazioni equimolari, in granuli secretori che si accumulano nel citoplasma della  $\beta$ -cellula pancreatica (**Figura 5 e 6**). La stimolazione della  $\beta$ -cellula determina poi l'esocitosi dei granuli e il rilascio nella circolazione portale di quantità equivalenti di insulina e C-peptide (61).

**Figura 5.** Struttura del precursore dell'insulina (preproinsulina) con evidente il C-peptide.



**Figura 6.** Meccanismo di rilascio dell'insulina e del C-peptide nella beta-cellula pancreatica



La determinazione della concentrazione di C-peptide può completare l'inquadramento nella diagnosi di diabete, indicando la presenza o meno di una riserva insulinica endogena. Inoltre, nei pazienti con diabete in terapia insulinica, il dosaggio del C-peptide è l'unico indice della capacità secretoria residua del pancreas endocrino (62).

**Principio del test.** Il saggio prevede l'impiego di provette in polipropilene con il fondo rivestito di anticorpi monoclonali anti-C-peptide. Dopo l'aggiunta del campione da dosare, il sistema viene completato da un anticorpo monoclonale tracciante marcato con  $I^{125}$ . Successivamente seguono una serie di lavaggi e la rimanente radioattività legata alla provetta (radioattività residua) riflette la concentrazione di analita presente nel campione. Il sistema può essere utilizzato per la determinazione diretta del C-peptide nel siero o nel plasma e prevede l'uso di anticorpi monoclonali murini, diretti contro due differenti epitopi del C-peptide e, quindi, non in competizione fra loro.

**Metodica.** Il kit da noi utilizzato, il C-peptide IRMA Kit (Beckman Coulter, CA, USA), è dotato di provette sensibilizzate con l'anticorpo monoclonale anti-C-peptide, di immunoglobuline anti-C-peptide marcate con  $I^{125}$ , di calibratori con concentrazioni comprese tra 0 e 6400 pmol/L, di sieri di controllo e soluzioni di lavaggio. I reattivi sono stati equilibrati a temperatura ambiente e contemporaneamente il contenuto dei flaconi dei calibratori e dei controlli è stato ricostituito aggiungendo il volume di acqua

distillata riportato sull'etichetta. Per quanto riguarda la preparazione della soluzione di lavaggio è stato sufficiente versare il contenuto del flacone in 950 mL di acqua distillata. È importante diluire con il calibratore zero i campioni con concentrazioni di C-peptide superiori a quelle corrispondenti al calibratore con concentrazione più elevata.

All'interno dei tubi sensibilizzati con l'anticorpo anti-C-peptide sono stati aggiunti 50 µl dei calibratori, 50 µl dei sieri di controllo o 50 µl dei campioni. Successivamente, per ogni provetta, incluse quelle non sensibilizzate e necessarie per la determinazione dell'attività totale, sono stati aggiunti 150 µl di anticorpo tracciante e ciascuna è stata incubata, per 2 ore a temperatura ambiente, in agitazione (280 rpm). Al termine dell'incubazione, è stato aspirato con cura il contenuto di ciascuna provetta (eccetto i totali) ed è stato eliminato il tracciante in eccesso tramite due lavaggi consecutivi con 2 mL di tampone detergente. A questo punto la radioattività legata e la radioattività totale è stata letta al gamma-counter per un tempo di 60 secondi.

Il gamma-counter traccia automaticamente il grafico della curva standard, ottenuta disponendo i  $\text{cpm}_{\text{cal}} - \text{cpm}_{\text{cal0}}$  (colpi per minuto) sull'ordinata e la concentrazione dei calibratori (pmol/L) sull'ascissa, sia in un grafico lineare che in uno semi-logaritmico. La concentrazione del C-peptide è poi ricavata per interpolazione dalla curva standard.

#### **4.5 Dosaggio Autoanticorpi Anti-GAD<sub>65</sub> e Anti-IA<sub>2</sub>**

Il diabete mellito di tipo 1 (T1DM), conosciuto anche come diabete mellito insulino-dipendente, è causato dalla distruzione cronica ed autoimmune della componente  $\beta$ -cellulare insulino-secernente del pancreas, probabilmente scatenata dall'esposizione del soggetto, geneticamente suscettibile, ad agenti ambientali scatenanti. La distruzione autoimmune delle  $\beta$ -cellule risulta completamente asintomatica finché non viene perso circa l'80-90% della massa endocrina. Durante la fase preclinica, questo processo autoimmune è distinto dalla presenza di anticorpi circolanti diretti contro gli antigeni delle  $\beta$ -cellule. Questi autoanticorpi sono presenti già prima della diagnosi di T1DM e prima ancora della comparsa dei sintomi clinici (63).

Mentre i primi studi hanno utilizzato il test dell'immunofluorescenza per gli anticorpi anti-isola (ICA), oggi tale metodo (di difficile standardizzazione) è stato sostituito dalla combinazione di diversi saggi radioimmunologici atti ad individuare anticorpi diretti contro specifici antigeni delle  $\beta$ -cellule, come l'insulina (IAA), l'acido glutammico decarbossilasi (GAD) e la tirosina fosfatasi ICA 512 (IA<sub>2</sub>).

La tirosina fosfatasi ICA 512 (IA<sub>2</sub>) è localizzata nei granuli densi delle beta cellule pancreatiche e condivide una identità di sequenza con l'antigene 512 delle isole pancreatiche. Questi autoanticorpi sono presenti nella maggior parte dei soggetti diabetici tipo 1 di nuova diagnosi e nella

fase pre-clinica della malattia. La presenza di questi autoanticorpi sembra essere correlata con la rapida progressione del T1DM.

La decarbossilasi dell'acido glutammico (GAD), enzima che catalizza la conversione del glutammato ad acido- $\gamma$ -amminobutirrico (GABA), presenta due isoforme di diverso peso molecolare: GAD<sub>65</sub> (65000 Da) e GAD<sub>67</sub> (67000 Da). Gli autoanticorpi GAD<sub>65</sub> nei pazienti diabetici sono diretti prevalentemente verso epitopi conformazionali e sono presenti in circa il 70-80% nei pazienti di nuova diagnosi ed è possibile dosarli ancor prima della comparsa della sintomatologia classica.

La combinazione del test per gli autoanticorpi GAD<sub>65</sub> e IA<sub>2</sub> risulta importante ai fini della stima del rischio nei bambini e negli adolescenti ed è capace di individuare più del 90% dei soggetti predisposti. (64).

Gli autoanticorpi GAD<sub>65</sub> sono rilevati anche in un sottogruppo di pazienti identificati in prima istanza come affetti da diabete mellito tipo 2. Questi pazienti dal punto di vista clinico presentano spesso una marcata iperglicemia e richiedono più o meno rapidamente (nel giro di mesi o anni) l'introduzione di terapia insulinica per il fallimento del trattamento con ipoglicemizzanti orali. Questi casi sono oggi definiti con l'acronimo LADA (Latent Autoimmune Diabetes of the Adult). La presenza degli autoanticorpi GAD<sub>65</sub> nel siero di questi pazienti rappresenta un marker sensibile e specifico per la futura condizione di insulino-dipendenza (65).

**Dosaggio degli autoanticorpi Anti-IA<sub>2</sub>: principio del test.** Il saggio prevede l'impiego di un frammento intracellulare ricombinante della



proteina IA<sub>2</sub> umana marcato con I<sup>125</sup>. Questo tracciante è in eccesso ed è specificatamente riconosciuto dagli autoanticorpi IA<sub>2</sub> presenti nel campione. Dopo l'aggiunta della Proteina A (*Staphyl. aureus*), che riconosce e lega la porzione Fc degli autoanticorpi, si formano dei complessi che precipitano sul fondo delle provette, facilitando la separazione della frazione legata mediante centrifugazione.

Dopo aver rimosso il surnatante (contenente la frazione di radioligando libera) mediante aspirazione o decantazione, si procede misurando la radioattività residua che riflette la concentrazione di autoanticorpi IA<sub>2</sub> presenti nel campione.

**Metodica.** Il kit da noi utilizzato, il CentaAK® anti-IA<sub>2</sub> (Medipan, Berlin, Germany), permette di dosare direttamente la concentrazione di anti-IA<sub>2</sub> su siero ed è basato sul principio del *radioligand assay*. Questo kit è dotato di uno standard anti-IA<sub>2</sub> (0.1 - 0.75 - 2.0 - 10 - 50 - 365 U/ml), di sieri di controllo, di un tracciante marcato con I<sup>125</sup> (frammento ricombinante della proteina IA<sub>2</sub>), di una sospensione di Proteina A e di una soluzione tampone. I reattivi sono stati equilibrati a temperatura ambiente e contemporaneamente la sospensione di Proteina A e il tracciante sono stati ricostituiti con volumi opportuni di tampone, usato anche nelle fasi successive di lavaggio. Successivamente, sono stati trasferiti in una provetta 20 µl di ciascuno standard, dei sieri di controllo o dei campioni e sono stati aggiunti in ciascuna, e in quelle necessarie per la determinazione della radioattività totale, 50 µl di tracciante. Ogni campione

è stato poi incubato overnight a 4-8°C. Al termine dell'incubazione, sono stati aggiunti 50 µl della sospensione della Proteina A e ciascuna provetta è stata incubata a temperatura ambiente per 60 minuti. A questo punto è stato aggiunto 1 ml di tampone e i campioni sono stati centrifugati per 20 minuti a 1500 xg. Infine è stato rimosso completamente il surnatante, tramite aspirazione o decantazione, e la radioattività di ciascuna provetta, inclusi i totali, è stata letta per almeno 60 secondi.

La curva standard, con un range di 0.1-50 U/ml, è stabilita tracciando la media dei valori del segnale radioattivo (cpm) dei calibratori, sulle ordinate, e la concentrazione degli autoanticorpi anti-IA<sub>2</sub> corrispondente, sull'ascissa. I valori relativi alla concentrazione degli anti-IA<sub>2</sub> nei campioni incogniti e nei sieri di controllo sono stati letti direttamente in U/ml contro i rispettivi valori cpm.

**Dosaggio degli autoanticorpi Anti-GAD<sub>65</sub> : principio del test.** Il saggio prevede l'impiego di una forma ricombinante dell'isoforma GAD<sub>65</sub> marcata con I<sup>125</sup>. Questo tracciante è in eccesso ed è specificatamente riconosciuto dagli autoanticorpi GAD<sub>65</sub> presenti nel campione. Dopo l'aggiunta della Proteina A (*Staphyl. aureus*), che riconosce e lega la porzione Fc degli autoanticorpi, si formano dei complessi che precipitano sul fondo delle provette, facilitando la separazione della frazione legata mediante centrifugazione. Dopo aver rimosso il surnatante (contenente la frazione di radioligando libera) mediante aspirazione o decantazione, si

procede misurando la radioattività residua che riflette la concentrazione di autoanticorpi GAD<sub>65</sub> presenti nel campione.

**Metodica.** Il kit da noi utilizzato, il CentaAK® anti-GAD<sub>65</sub> (Medipan, Berlin, Germany), permette di dosare direttamente la concentrazione di autoanticorpi anti-GAD<sub>65</sub> su siero ed è basato sul principio del *radioligand assay*. Questo kit è dotato di uno standard anti-GAD<sub>65</sub> (0.1- 1.0 - 3.0 - 10 - 30 - 120 U/ml), di sieri di controllo, di un tracciante marcato con I<sup>125</sup> (isoforma ricombinante dell'enzima GAD<sub>65</sub>), di una sospensione di Proteina A e di una soluzione tampone.

I reattivi sono stati equilibrati a temperatura ambiente e contemporaneamente la sospensione di Proteina A e il tracciante sono stati ricostituiti con volumi opportuni di tampone, usato anche nelle fasi successive di lavaggio.

A questo punto sono stati trasferiti in una provetta 20 µl di ciascuno standard, dei sieri di controllo o dei campioni e sono stati aggiunti in ciascuna, incluse quelle necessarie per la determinazione della radioattività totale, 50 µl di tracciante. Ogni campione è stato poi incubato per 120 minuti a temperatura ambiente. Al termine dell'incubazione, sono stati aggiunti 50 µl della sospensione della Proteina A e ciascuna provetta è stata incubata a temperatura ambiente per 60 minuti. Successivamente è stato aggiunto 1 ml di tampone e i campioni sono stati centrifugati per 20 minuti a 1500 xg. Infine è stato rimosso completamente il surnatante,

tramite aspirazione o decantazione, e la radioattività di ciascuna provetta, inclusi i totali, è stata letta per almeno 60 secondi.

La curva standard, con un range di 0.1-120 U/ml, è stabilita tracciando la media dei valori del segnale radioattivo (cpm) dei calibratori, sulle ordinate, e la concentrazione degli autoanticorpi anti-GAD<sub>65</sub> corrispondente, sull'ascissa. I valori relativi alla concentrazione degli anti-GAD<sub>65</sub> nei campioni incogniti e nei sieri di controllo sono stati letti direttamente in U/ml contro i rispettivi valori cpm.

#### **4.6 Determinazione della glicemia**

Il glucosio è un monosaccaride aldeidico e viene impiegato dall'organismo come substrato energetico nella glicolisi. L'organismo umano possiede un sistema omeostatico intrinseco che consente di mantenere relativamente costante la glicemia durante l'arco della giornata: nei soggetti sani a digiuno, il valore della glicemia deve essere compreso fra 60 e 110 mg/dl (66;67). Il tasso glicemico è regolato da complessi meccanismi sia metabolici che neuromonali, i quali impediscono forti oscillazioni, ed è mediato principalmente dall'azione di due ormoni: l'insulina e il glucagone. Alterazioni di questo sistema di regolazione contribuiscono a provocare condizioni di ipoglicemia (bassi livelli di glucosio nel sangue) o di iperglicemia (alti livelli di glucosio nel sangue).

Per il prelievo e la preparazione dei campioni è consigliato utilizzare solo provette o contenitori di raccolta adatti e l'analisi può essere eseguita

su siero o su plasma trattato con litio eparina, K<sub>2</sub>-EDTA o fluoruro. Per il nostro studio, il sangue venoso è stato prelevato da soggetti a digiuno da almeno 12 ore utilizzando un sistema di provette sottovuoto. Il campione è stato centrifugato a 3470 xg per 10 minuti a 4°C, posizionato sul piatto portaprovette del cobas 6000 c501 (ROCHE, Mannheim, Germany) e processato.

**Principio del test.** L'esochinasi (HK), utilizzando ATP, catalizza la reazione di fosforilazione del glucosio a glucosio-6-fosfato. La glucosio-6-fosfato deidrogenasi (G-6-PDH), in presenza di NADH, provoca l'ossidazione del glucosio-6-fosfato a gluconato-6-fosfato e la velocità di formazione del NADPH, durante la reazione, è direttamente proporzionale alla concentrazione di glucosio e viene misurata fotometricamente (68;69).



I sistemi Roche/Hitachi cobas c effettuano il calcolo automatico della concentrazione dell'analita di ciascun campione utilizzando il seguente fattore di conversione:

$$\text{mmol/L} \times 18,02 = \text{mg/dL}$$

$$\text{mmol/L} \times 0,1802 = \text{g/L}$$

$$\text{mg/dL} \times 0,0555 = \text{mmol/L}$$

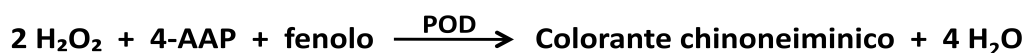
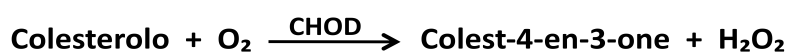
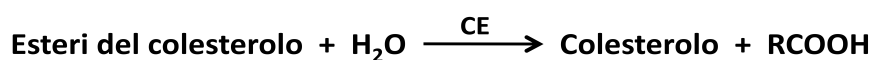
#### ***4.7 Dosaggio del colesterolo totale mediante metodo enzimatico colorimetrico***

Il colesterolo è uno steroide con un gruppo idrossilico secondario nella posizione C3. È sintetizzato in molti tipi di tessuto, ma principalmente nel fegato e nella parete intestinale, e deriva per circa tre quarti dalla sintesi endogena e per un quarto dall'assunzione alimentare. La determinazione del colesterolo viene impiegata nello screening del rischio aterosclerotico e nella diagnosi e nel trattamento di malattie con valori di colesterolo elevati, nonché di disturbi a carico del metabolismo lipidico e lipoproteico. Per il prelievo e la preparazione dei campioni è consigliato impiegare solo provette o contenitori di raccolta adatti e l'analisi può essere eseguita su siero o su plasma trattato con litio eparina o K<sub>2</sub>-EDTA. È sconsigliato l'uso di vacutainer trattate con citrato, ossalato o fluoruro e i campioni contenenti precipitati devono essere centrifugati prima dell'esecuzione del test (70).

Per il nostro studio, il sangue venoso è stato prelevato da soggetti a digiuno da almeno 12 ore utilizzando un sistema di provette sottovuoto. Il campione è stato centrifugato a 3470 xg per 10 minuti a 4°C, posizionato sul piatto portaprovette del cobas 6000 c501 e processato.

**Principio del test.** Gli esteri del colesterolo vengono scissi enzimaticamente per azione della colesterolo esterasi (CE), formando colesterolo libero e acidi grassi.

Successivamente la colesterolo ossidasi (CHOD) catalizza l'ossidazione del colesterolo, formando colest-4-en-3-one ( $\Delta^4$ -colestenone) e perossido di idrogeno ( $H_2O_2$ ), che viene misurato mediante reazione di Trinder (analisi end point). In presenza di perossidasi (POD), il perossido di idrogeno formatosi influenza sull'accoppiamento ossidativo del fenolo e del 4-aminofenazone (4-AAP), producendo un colorante chinoneiminico rosso. L'intensità di colore del prodotto formatosi è direttamente proporzionale alla concentrazione del colesterolo determinata misurando l'aumento dell'assorbanza (71;72).



I sistemi Roche/Hitachi cobas c effettuano il calcolo automatico della concentrazione dell'analita di ciascun campione utilizzando il seguente fattore di conversione:

$$\text{mmol/L} \times 38,66 = \text{mg/dL}$$

$$\text{mmol/L} \times 0,3866 = \text{g/L}$$

$$\text{mg/dL} \times 0,0259 = \text{mmol/L}$$

#### ***4.8 Dosaggio delle HDL mediante metodo enzimatico colorimetrico***

Le lipoproteine ad alta densità, note anche come HDL (High Density Lipoprotein), hanno la funzione di rimuovere il colesterolo in eccesso dai tessuti periferici per trasportarlo al fegato o ai tessuti steroidogenici, come le ghiandole surrenali o le gonadi. Il monitoraggio del colesterolo HDL nel siero è importante dal punto di vista clinico, dato che tra la concentrazione di colesterolo HDL ed il rischio di malattie aterosclerotiche sussiste una correlazione inversa. Concentrazioni elevate di colesterolo HDL hanno un effetto protettivo contro le cardiopatie coronariche, mentre una loro diminuzione, soprattutto in associazione ad un aumento dei trigliceridi, comporta un aumento del rischio di malattie cardiovascolari (70; 73).

Per il prelievo e la preparazione dei campioni è consigliato impiegare solo provette o contenitori di raccolta adatti e l'analisi può essere eseguita su siero o plasma trattato con litio eparina o K<sub>2</sub>-EDTA.

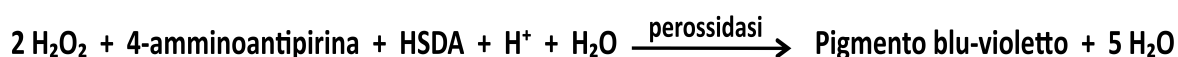
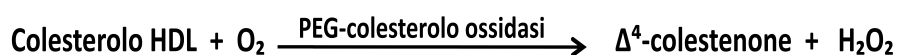


Inoltre, è necessario assicurarsi che i campioni siano privi di precipitati eliminandoli tramite centrifugazione prima dell'esecuzione del test. Per il nostro studio, il sangue venoso è stato prelevato da soggetti a digiuno da almeno 12 ore utilizzando un sistema di provette sottovuoto. Il campione è stato centrifugato a 3470 xg per 10 minuti a 4°C, posizionato sul piatto portaprovette del cobas 6000 c501 e processato.

**Principio del test.** Questo metodo sfrutta enzimi modificati con polietilenglicole (PEG) e solfato di destrano. La colesterolo esterasi e la colesterolo ossidasi modificate dal PEG possiedono attività catalitiche selettive rispetto alle diverse frazioni lipoproteiche, con una reattività crescente: LDL < VLDL  $\approx$  chilomicroni < HDL (74;75).

In presenza di ioni magnesio, il solfato di destrano forma selettivamente complessi idrosolubili con le LDL, le VLDL e i chilomicroni, resistenti però agli enzimi modificati con polietilenglicole. Gli esteri del colesterolo vengono scissi enzimaticamente per azione della PEG-colesterolo esterasi in colesterolo HDL libero e acidi grassi. In presenza di ossigeno, il colesterolo viene ossidato dalla PEG-colesterolo ossidasi a  $\Delta^4$ -colesenone e perossido di idrogeno ( $H_2O_2$ ). Successivamente, per azione della perossidasi, il perossido di idrogeno formatosi reagisce con la 4-amminoantipirina e l'HSDA (sodio N-(2-idrossi-3-solfopropil)-3,5-dimetossianilina). Questa reazione favorisce la formazione di un prodotto blu-violetto la cui intensità di colore è direttamente proporzionale alla

concentrazione di colesterolo HDL e viene misurata fotometricamente (74).



I sistemi Roche/Hitachi cobas c effettuano il calcolo automatico della concentrazione dell'analita di ciascun campione utilizzando il seguente fattore di conversione:

$$\text{mmol/L} \times 38,66 = \text{mg/d}$$

$$\text{mmol/L} \times 0,3866 = \text{g/L}$$

$$\text{mg/dL} \times 0,0259 = \text{mmol/L}$$

#### **4.9 Valutazione della concentrazione di LDL**

Le lipoproteine a bassa densità (LDL, Low Density Lipoprotein) presentano un nucleo di trigliceridi ed esteri del colesterolo, circondato da colesterolo libero e apolipoproteina B (apoB), e rappresentano la rimanenza delle lipoproteine a densità intermedia (IDL) non assorbite dal fegato. Veicolano tra il 60% e l'80% del colesterolo sierico presentando un'elevata affinità per le cellule dell'endotelio arterioso, dove liberano colesterolo promuovendo la formazione di placche ateromatose. Il valore del colesterolo LDL non viene stabilito direttamente dalle analisi di

laboratorio, ma lo si evince dai valori del colesterolo totale, dei trigliceridi e delle HDL. La formula di Friedewald per calcolare questo valore è:  
**colesterolo LDL = colesterolo totale – colesterolo HDL - (trigliceridi/5)**

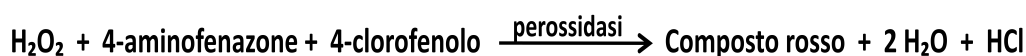
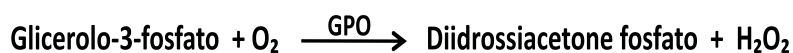
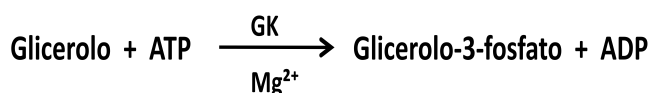
#### ***4.10 Dosaggio dei trigliceridi mediante metodo enzimatico colorimetrico***

I trigliceridi sono esteri dell'alcol trivalente glicerolo, recanti 3 acidi grassi a catena lunga. Essi vengono in parte sintetizzati nel fegato e in parte assorbiti con il cibo. La determinazione dei trigliceridi viene impiegata per la diagnosi e per il trattamento dei pazienti con diabete mellito, nefrosi, epatopatie ostruttive, alterazioni del metabolismo lipidico e con numerose altre malattie endocrine (76; 77).

Per il prelievo e la preparazione dei campioni è consigliato impiegare solo provette o contenitori di raccolta adatti e l'analisi può essere eseguita su siero o plasma trattato con litio eparina o K<sub>2</sub>-EDTA. Per il nostro studio, il sangue venoso è stato prelevato da soggetti a digiuno da almeno 12 ore utilizzando un sistema di provette sottovuoto. Il campione è stato centrifugato a 3470 xg per 10 minuti a 4°C, posizionato sul piatto portaprovette del cobas 6000 c501 e processato.

**Principio del test.** Questo metodo utilizza una lipoproteinlipasi (LPL) per la rapida e completa idrolisi dei trigliceridi in acidi grassi e glicerolo, che viene fosforilato a glicerolo-3-fosfato ad opera della glicerolochinasi (GK). Successivamente, la glicerolo-3-fosfato ossidasi

(GPO) ossida il glicerolo-3-fosfato formando diidrossiacetone fosfato e perossido di idrogeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Per azione dell'enzima perossidasi, il perossido di idrogeno reagisce con il 4-aminofenazone e il 4-clorofenolo e questa reazione favorisce la formazione di un composto di colore rosso (analisi end point, reazione a punto finale secondo Trinder), la cui intensità è direttamente proporzionale alla concentrazione dei trigliceridi presenti nel campione e può essere misurata fotometricamente (78).



I sistemi Roche/Hitachi cobas c effettuano il calcolo automatico della concentrazione dell'analita di ciascun campione utilizzando il seguente fattore di conversione:

$$\text{mmol/L} \times 88,5 = \text{mg/dL}$$

$$\text{mg/dl} \times 0,0113 = \text{mmol/L}$$

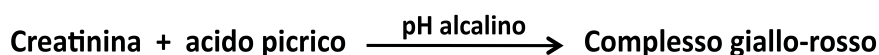
#### ***4.11 Dosaggio della creatinina mediante reazione cinetica di Jaffé con tampone e senza deproteinizzazione***

La creatinina viene sintetizzata per via endogena a partire da creatina e creatinfosfato. La determinazione della creatinina e la clearance urinaria sono usate per il monitoraggio di malattie renali acute e croniche e per il monitoraggio della dialisi renale. La creatinina sierica è un prodotto di rifiuto della deidratazione spontanea della creatina fisiologica (79). Gran parte della creatina dell'organismo si trova nel tessuto muscolare, dove compare come creatinfosfato e funge da riserva ad alta energia per la conversione dell'ADP (adenosina difosfato) in ATP (adenosina trifosfato). La velocità di formazione della creatinina è abbastanza costante: ogni 24 ore l'1-2% della creatina corporea viene convertita in creatinina (80). I livelli sierici di creatinina e urea risultano elevati in pazienti affetti da nefropatie, specialmente in caso di diminuita filtrazione glomerulare. Negli stadi iniziali del danno renale, in genere, l'aumento dei livelli di urea nel siero precorre l'aumento della creatinina nello stesso materiale biologico. Questo è principalmente attribuito al fatto che i livelli di creatinina nel siero tendono a mantenersi costanti e non sono condizionati dai fattori che, invece, influenzano i livelli sierici di urea (alimentazione, grado di idratazione e metabolismo proteico).

Per il prelievo e la preparazione dei campioni è consigliato utilizzare solo provette o contenitori di raccolta adatti; l'analisi può essere eseguita

su siero o plasma trattato con litio eparina o K<sub>2</sub>-EDTA e i campioni contenenti precipitati devono essere centrifugati prima dell'esecuzione del test. Per il nostro studio, il sangue venoso è stato prelevato da soggetti a digiuno da almeno 12 ore utilizzando un sistema di provette sottovuoto. Il campione è stato centrifugato a 3470 xg per 10 minuti a 4°C, posizionato sul piatto portaprovette del cobas 6000 c501 e processato.

**Principio del test.** In soluzione alcalina, la creatinina reagisce con il picrato (acido picrico), formando un prodotto di colore giallo-rosso. La velocità di formazione del prodotto colorato (l'intensità del colore) è direttamente proporzionale alla concentrazione di creatinina e viene misurata fotometricamente (81;82). I campioni di siero o plasma contengono proteine che nel metodo di Jaffé reagiscono in maniera non specifica quindi, per ottenere valori accurati, è necessario correggere i risultati sottraendo dai valori ottenuti 26 µmol/L (0,3 mg/dL).



I sistemi Roche/Hitachi cobas c effettuano il calcolo automatico della concentrazione dell'analita di ciascun campione utilizzando il fattore di conversione:

$$\mu\text{mol/L} \times 0,0113 = \text{mg/dL}$$

$$\mu\text{mol/L} \times 0,001 = \text{mmol/L}$$

#### **4.12 Dosaggio dell'urea mediante test cinetico con ureasi e glutammato deidrogenasi**

L'urea è il principale prodotto finale del metabolismo dell'azoto proteico e viene sintetizzata a livello epatico nel ciclo dell'urea a partire dall'ammoniaca, ottenuta per deaminazione degli aminoacidi. L'urea viene escreta soprattutto dai reni, ma in minima parte viene eliminata anche nel sudore o degradata nell'intestino per azione batterica. La determinazione dell'urea, assieme alla creatinina, viene usata nella diagnosi differenziale dell'iperuremia prerenale, renale e postrenale. Aumenti transitori possono verificarsi anche in caso di elevata assunzione proteica (79).

Per il prelievo e la preparazione dei campioni è consigliato utilizzare solo provette o contenitori di raccolta adatti e l'analisi può essere eseguita su siero o plasma trattato con litio eparina o K<sub>2</sub>-EDTA. È sconsigliato l'uso di vacutainer trattate con ammonio eparina ed è necessario assicurarsi che i campioni siano privi di precipitati, eliminandoli tramite centrifugazione prima dell'esecuzione del test.

Per il nostro studio, il sangue venoso è stato prelevato da soggetti a digiuno da almeno 12 ore utilizzando un sistema di provette sottovuoto. Il campione è stato centrifugato a 3470 xg per 10 minuti a 4°C, posizionato sul piatto portaprovette del cobas 6000 c501 e processato.

**Principio del test.** L'urea viene idrolizzata dall'enzima ureasi ad ammonio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) e carbonato (CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>). Nella reazione successiva, il 2-

chetoglutarato reagisce con l'ammonio formando L-glutammato in presenza dell'enzima glutammato deidrogenasi (GLDH) e del coenzima NADH. In questa reazione, per ogni mole di urea idrolizzata due moli di NADH vengono ossidate a  $\text{NAD}^+$ . La velocità di decremento della concentrazione di NADH è direttamente proporzionale alla concentrazione di urea nel campione e viene misurata fotometricamente (83).



I sistemi Roche/Hitachi cobas c effettuano il calcolo automatico della concentrazione dell'analita di ciascun campione utilizzando il seguente fattore di conversione:

$$\text{mmol/L} \times 6,006 = \text{mg/dL}$$

$$\text{mmol/L} \times 0,06006 = \text{g/L}$$

#### ***4.13 Determinazione della microalbuminuria mediante metodo colorimetrico***

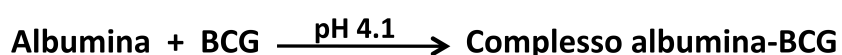
L'albumina è una proteina sierica con una massa molecolare di 68500 Da e rappresenta il 50-60% delle proteine totali. È essenziale per la regolazione ed il mantenimento della pressione oncotica, ovvero la



pressione osmotica necessaria per la corretta distribuzione dei liquidi corporei tra il compartimento vascolare e i tessuti.

Il significato fisiologico di questa proteina non è, però, limitato solo al mantenimento dell'equilibrio idrico: essa, infatti, svolge un rilevante ruolo nel trasporto, attraverso il circolo sanguigno, di molecole di grande importanza funzionale che lega rendendole solubili nel siero (acidi grassi, ormoni, farmaci, etc) (84). La molecola dell'albumina è carica negativamente, come la membrana del glomerulo renale, e la repulsione elettrostatica ne impedisce normalmente il passaggio nell'urina, limitato anche dall'elevata massa molecolare. Infatti, proteine con una massa relativa superiore a 40000 Dalton vengono trattenute quasi completamente nei capillari glomerulari. Nelle sindromi nefrosiche, caratterizzate da una alterata permeabilità della barriera di filtrazione glomerulare, questa proprietà viene persa e si osserva la comparsa di albumina nelle urine con concentrazioni superiori ai valori di riferimento (normoalbuminuria < 30 mg/L). La determinazione quantitativa dell'albumina escreta con le urine viene pertanto impiegata per la diagnosi e la valutazione della funzionalità d'organo in caso di malattie renali (85). Per il prelievo e la conservazione dei campioni è consigliato utilizzare solo provette o contenitori di raccolta adatti e il dosaggio è eseguito su un campione di urina del mattino. Per il nostro studio, ciascun campione è stato centrifugato a 1952 xg per 10 minuti a 4°C, posizionato sul piatto portaprovette del cobas 6000 c501 e processato.

**Principio del test.** A pH 4.1 l'albumina presenta un carattere sufficientemente cationico per potersi legarsi al verde di bromocresolo (BCG), un cromogeno anionico, e tale reazione determina la formazione di un composto colorato blu-verde. L'intensità del colore, direttamente proporzionale alla concentrazione di albumina nel campione, viene misurata fotometricamente (86).



I sistemi Roche/Hitachi cobas c effettuano il calcolo automatico della concentrazione dell'analita di ciascun campione utilizzando il seguente fattore di conversione:

$$\text{mg/L} \times 0,1 = \text{mg/dL}$$

$$\text{mg/L} \times 0,001 = \text{g/L}$$

#### ***4.14 Dosaggio dell'Hb glicata con metodica elettiva in HPLC (cromatografia liquida ad alta pressione)***

L'emoglobina (Hb) è un'oloproteina tetramericabile solubile di circa 64.000 Dalton costituita da due paia di catene polipeptidiche (globine  $\alpha$  e  $\beta$ ) uguali fra loro; a ciascuna di queste catene è attaccato un gruppo chimico, denominato eme, composto da un anello tetrapirrolico (protoporfirina IX) e da atomi di ferro in forma di ioni bivalenti.

L'emoglobina è una cromoproteina di colore rosso ed è localizzata all'interno degli eritrociti e svolge nell'organismo funzioni vitali, la più importante delle quali consiste nel trasporto dell'ossigeno e del biossido di carbonio nel sangue. Comprende numerose sottofrazioni e derivati diversi e, in questo gruppo eterogeneo, l'HbA1c è una delle emoglobine glicate, una sottofrazione formata dall'aggregazione di vari zuccheri alla molecola Hb. L'HbA1c si forma in due fasi, attraverso la reazione non enzimatica del glucosio con l'amminogruppo N-terminale della catena  $\beta$  dell' HbA (Hb dell'adulto normale). La prima fase è reversibile e rilascia HbA1c labile che si riorganizza, in una seconda fase della reazione, formando HbA1c stabile.

Negli eritrociti la quantità relativa di HbA convertita in HbA1c stabile aumenta con la concentrazione media di glucosio nel sangue. Tuttavia la conversione in HbA1c stabile è limitata dall'emivita dell'eritrocita di circa 100-120 giorni. Di conseguenza, l'HbA1c riflette il livello medio del glucosio ematico durante i 2-3 mesi precedenti e il suo dosaggio è da più di vent'anni il gold-standard per la valutazione del controllo glicemico nei soggetti diabetici (87; 88). Inoltre valori di HbA1c  $\geq 6,5\%$ , se confermati in almeno due occasioni successive, permettono di porre diagnosi di diabete (89).

La cromatografia liquida ad alta pressione (High Pressure Liquid Chromatography), più semplicemente nota con l'acronimo inglese HPLC, è una tecnica cromatografica che permette di separare due o più composti

presenti in un solvente, sfruttando l'equilibrio di affinità tra una "fase stazionaria" posta all'interno della colonna cromatografica e una "fase mobile" che fluisce attraverso essa. Alla fine della colonna è applicato un rilevatore (spettrofluorimetrico, spettrometro di massa etc) e un calcolatore che permettono di quantificare e/o identificare i composti presenti nel solvente (90).

Lo strumento utilizzato è il Tosoh G7, un analizzatore compatto e veloce, progettato per la misurazione di HbA1c nelle analisi di routine. Il Tosoh G7 utilizza un sistema analitico totalmente automatizzato basato sul metodo HPLC e la separazione dell'HbA1c è ottenuta sfruttando il principio alla base della cromatografia a scambio ionico.

**Figura 7.** Analizzatore automatico per cromatografia liquida ad alta prestazione Tosoh G7



In particolare viene utilizzata una colonna cromatografica a scambio cationico rivestita da una speciale resina contenente gruppi carichi negativamente, che attraggono molecole di carica opposta. La fase mobile è costituita da tre eluenti, soluzioni tampone con differente concentrazione salina, e l'eluizione può avvenire aumentando la forza ionica e/o il pH. Questo è reso possibile dal fatto che i sali competono con l'emoglobina per il legame alla resina, mentre un incremento del pH provoca il distacco di specie emoglobiniche dotate di punti isoelettrici differenti. L'emoglobina glicata presenta un punto isoelettrico leggermente inferiore a quello dell'HbA, in quanto la carica positiva del gruppo amminico terminale della catena  $\beta$  è mascherata dal legame con il glucosio. Questo fa sì che l'emoglobina glicata venga eluita prima dell'HbA.

Al termine dell'analisi sono stati esaminati i cromatogrammi ottenuti, in cui si distinguono picchi caratteristici delle diverse specie emoglobiniche, e la frazione di HbA1c è stata espressa come valore percentuale rispetto alla frazione di emoglobina totale.

#### ***4.15 Formula leucocitaria***

La formula leucocitaria esprime la percentuale relativa di una specifica popolazione di leucociti (basofili, eosinofili, linfociti, monociti e neutrofili) presente in un campione di sangue periferico. Normalmente, la formula viene effettuata dal sistema per ematologia SYSMEX SF3000, ma se lo strumento riscontra anomalie si procede con la lettura al microscopio

e il conteggio viene effettuato su strisci di sangue colorato con il metodo di May-Grünwald e Giemsa. In condizioni normali i leucociti circolanti sono costituiti in massima parte da granulociti neutrofili (40-75%) e da linfociti (20-50%), mentre gli altri elementi sono presenti in percentuale molto bassa (monociti 2-13%, granulociti eosinofili fino al 7%, granulociti basofili 0-1%). La formula leucocitaria è stata estrapolata dai valori ottenuti con l'esame emocromocitometrico, eseguito su un campione di sangue venoso raccolto in vacutainer trattate con eparina o EDTA.

#### ***4.16 Isolamento del DNA genomico da sangue intero***

**Principio di funzionamento.** Il kit utilizzato per il nostro studio, il Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, WI, USA), permette una rapida ed efficiente purificazione del DNA genomico dalle cellule nucleate di sangue trattato con EDTA, eparina o citrato. Il primo passo nella procedura di purificazione e isolamento del DNA genomico prevede la lisi delle membrane cellulari e nucleari, ed implica per prima, la lisi delle cellule eritrocitarie seguita poi dalla lisi cellulare dei leucociti e dei loro nuclei. A questo fa seguito l'aggiunta di RNasi che favorisce la digestione dell'RNA e una fase di precipitazione salina che facilita la precipitazione e rimozione delle proteine cellulari. Questo passaggio non altera gli acidi nucleici che vengono recuperati, dopo centrifugazione, in soluzione acquosa. Il DNA genomico viene successivamente concentrato, mediante

precipitazione con isopropanolo, e ripulito dai sali attraverso un trattamento con etanolo al 70%.

**Metodo.** Per prima sono stati aggiunti 300 µl di sangue in un'epENDORF da 1,5 mL contenente 900 µl di Cell Lysis Solution; i campioni sono stati poi agitati gentilmente per inversione e incubati a temperatura ambiente (RT) per 10 minuti. Questo passaggio garantisce la lisi delle cellule eritrocitarie ed è ottimizzato invertendo 2-3 volte i campioni. Al termine dell'incubazione i campioni sono stati passati al vortex per almeno 15 secondi e centrifugati a 13000-16000 xg per 20 secondi a RT. A questo punto il surnatante è stato rimosso e scartato con cura, facendo attenzione a non perdere il pellet bianco. Per campioni di sangue congelati è necessario ripetere questo passaggio finché il pellet non appare bianco. Successivamente, le cellule nucleate sono state risospese passando al vortex i campioni per almeno 10-15 secondi e la lisi delle membrane cellulari e nucleari dei leucociti è stata ottenuta aggiungendo 300 µl di Nuclei Lysis Solution. Qualora fossero ancora visibili degli ammassi cellulari è consigliato incubare i campioni per almeno 60 minuti a 37°C, così da favorire la loro completa dissoluzione. A questo punto sono stati aggiunti 1,5 µl di RNase solution al lisato nucleare, i campioni sono stati agitati per inversione e incubati a 37°C per 15 minuti. Al termine dell'incubazione, ai campioni equilibrati a temperatura ambiente, sono stati aggiunti 100 µl di Protein Precipitation Solution. Dopo un passaggio al vortex di 10-20 secondi e dopo aver centrifugato a 13000-

16000 xg per 3 minuti, la precipitazione delle proteine è risultata visibile come un pellet di colore marrone sul fondo della provetta. Gli acidi nucleici presenti in soluzione acquosa (surnatante), sono stati poi recuperati e trasferiti in un'epENDORF contenente 300 µl di isopropanolo a RT, che ne ha facilitato la precipitazione. Successivamente, ciascuna epENDORF è stata capovolta finché non è risultata visibile una massa bianca (il "gomitolo" di DNA), precipitata sul fondo della provetta dopo centrifugazione a 13000-16000 xg per 60 secondi. Dopo aver rimosso e scartato il surnatante, tramite aspirazione o decantazione, sono stati aggiunti 500 µl di etanolo al 70% a RT e i campioni sono stati centrifugati a 13000-16000 x g per 3 minuti. Questo passaggio favorisce la rimozione e il lavaggio del pellet di DNA dall'eccesso di sali precipitati. A questo punto è stato rimosso e scartato l'eccesso di etanolo e il pellet è stato lasciato ad asciugare a RT per 10-15 minuti. Infine il DNA è stato reidratato aggiungendo 100 µl di DNA Rehydration Solution e incubato overnight a 4°C e stoccato a -20°C.

#### ***4.17 Isolamento dell'RNA totale da linfomonociti***

**Principio di funzionamento.** Gli RNA Mini kit garantiscono l'estrazione di RNA totale utilizzando colonnine da centrifuga, che permettono di ottenere RNA intatto e ad alta purezza. Dopo lisi cellulare, una colonnina di filtrazione facilita l'isolamento dell'RNA totale e la rimozione di gran parte del DNA genomico. L'aggiunta di DNasi, per la



totale eliminazione del DNA genomico, viene effettuata a discrezione dell'operatore (91).

**Principio del test.** Il kit utilizzato per il nostro studio, il QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, CA, USA), permette l'isolamento dell'RNA in modo semplice e veloce. La membrana QIAamp assicura il recupero di RNA estremamente puro e intatto, garantendone un uso affidabile nel settore delle tecnologie di amplificazione. L'RNA può essere isolato da plasma (trattato con anticoagulanti diversi dall'eparina), siero, linfociti e altri fluidi corporei cell-free.

Il carrier-RNA, aggiunto al buffer AVL, migliora il legame dell'RNA alla membrana di silice QIAamp, mentre le condizioni saline ed il pH assicurano che proteine e altri contaminanti, che potrebbero inibire le reazioni enzimatiche a valle, non vengano trattenute sulla colonna. Eventuali agenti inquinanti residui sono eliminati, in modo efficiente, usando due differenti tamponi di lavaggio, AW1 e AW2, che migliorano significativamente la purezza dell'RNA eluito. Inoltre, l'uso del buffer AVE (acqua RNasi-free e sodio azide 0,04%) impedisce la crescita microbica e l'eventuale contaminazione con RNasi, favorendo allo stesso tempo l'eluizione dell'RNA totale legato alla colonna.

**Metodo.** Per l'esecuzione del protocollo sono stati utilizzati materiali e soluzioni RNA-free così da evitare possibili contaminazioni del campione. Il primo passaggio del protocollo è servito a preparare la soluzione di buffer AVL-carrier RNA necessaria per l'estrazione dell'RNA

totale da 140 µl di soluzione contenente linfomonociti ( $\approx 5 \times 10^6$  cellule) e ottenuta mediante l'aggiunta al buffer AVL di un volume di carrier RNA-buffer AVE contenente 5,6 µg di carrier. Per prima sono stati trasferiti 140 µl di campione in una eppendorf contenente 560 µl di buffer AVL-carrier RNA, ciascun campione è stato passato al vortex per almeno 15 secondi e incubato a RT per 10 minuti. Agenti potenzialmente infettivi ed RNasi vengono inattivati nel buffer AVL, mentre l'aggiunta del carrier-RNA garantisce l'isolamento di acidi nucleici integri. Al termine dell'incubazione i campioni sono stati centrifugati a 6000 xg (8000 rpm) per 30 secondi. Successivamente è stato scartato il surnatante, sono stati aggiunti 560 µl di etanolo freddo (96-100%) e ciascuno campione è stato passato al vortex per 15 secondi. A questo punto 630 µl della soluzione ottenuta è stata trasferita su colonnina e centrifugata a 6000 xg (8000 rpm) per 60 secondi; dopo aver scartato l'eluato, la colonnina è stata inserita in un nuovo tubo da 2 mL e l'intero passaggio è stato ripetuto un'ulteriore volta. Eventuali agenti inquinanti residui sono stati eliminati mediante due successive fasi di lavaggio che hanno previsto tempi e velocità di centrifugazione differenti. Per prima, sono stati aggiunti alla colonnina 500 µl di tampone detergente AW1 e di seguito i campioni sono stati centrifugati a 6000 x g (8000 rpm) per 60 secondi. A questo punto, dopo aver scartato l'eluato, sono stati aggiunti 500 µl di tampone detergente AW2, ciascuna colonnina è stata centrifugata a 15700 x g (13000 rpm) per 4 minuti e trasferita in un'eppendorf da 1,5 mL. Infine sono stati aggiunti

40 µl di buffer AVE, i campioni sono stati centrifugati a 6000 x g (8000 rpm) per 2 minuti e l'eluato recuperato è stato quantificato allo spettrofotometro (Lambda Bio 20, Perkin Elmer, MA, Usa ). Poiché la molecola dell'RNA, pur conservandola a -20°C, si degrada molto rapidamente (2-3 giorni), è necessario precipitare l'RNA totale con 0,1 volumi di Acetato di Sodio 2 M e 2 volumi di Etanolo puro freddo. Questa procedura permette di conservare il campione a -20°C per lunghi periodi di tempo.

#### ***4.18 Quantificazione allo spettrofotometro degli acidi nucleici***

**Principio del saggio.** Le basi puriniche e pirimidiniche sono caratterizzate dalla capacità di assorbire le radiazioni U.V. con lunghezza d'onda di 260 nm. L'assorbimento a 280 nm è tipico dei residui amminoacidici aromatici e di eventuali proteine contaminanti. Per tale motivo la purezza di un campione è considerata accettabile quando il valore del rapporto fra l'assorbanza a 260 nm e l'assorbanza a 280 nm è compreso fra 1,65 e 2,5. Per la quantificazione dell'RNA totale o del DNA genomico è fondamentale che la fase di eliminazione dal campione del DNA o dell'RNA venga eseguita nella maniera più accurata possibile, così da non alterare l'assorbanza della soluzione e causare errori di quantificazione.

**Metodica.** Per eseguire la quantificazione è stata rilevata l'assorbanza di 5 µl di estratto diluiti in 995 µl di H<sub>2</sub>O deionizzata posti in una cuvetta di quarzo. Lo strumento (Lambda Bio 20, Perkin Elmer, MA, Usa) è stato programmato di modo tale da fornire la concentrazione (µg/ml) degli acidi nucleici.

#### **4.19 Retrotrascrizione (RT) dell'RNA totale estratto**

**Principio di funzionamento.** La retrotrascrizione produce molecole di DNA complementari a tutti gli mRNA presenti nel campione. La reazione avviene grazie all'enzima *trascrittasi inversa*, che sintetizza una catena di DNA complementare ad uno stampo di mRNA, utilizzando i quattro desossiribonucleotidi trifosfato (dNTP) ed un primer, una breve molecola che si appaia all'estremità 3', necessario per avviare la reazione. Un valido primer per la trascrittasi inversa può essere un oligo dT, poichè l'estremità 3' dell'mRNA è dotata di una coda di poli(A).

**Metodica.** Il kit di retrotrascrizione da noi utilizzato (iScript™ cDNA Synthesis Kit, Bio-Rad, CA, USA) è composto da una miscela di reazione 5x iScript reaction mix (miscela dei quattro dNTP 25 mM), dall'enzima trascrittasi inversa iScript reverse transcriptase e da H<sub>2</sub>O nuclease-free. Per prima è stata preparata una miscela con 4 µl di 5x iScript reaction mix, 1 µl di iScript reverse transcriptase, 1 µg di RNA totale, portata a volume con H<sub>2</sub>O RNase-free. La soluzione è stata poi incubata in un cicizzatore (GeneAmp PCR System 2400, PerkinElmer, MA, USA) per 5 minuti a

25°C e per 30 minuti a 42°C e l'attività della polimerasi è stata inibita innalzando la temperatura della soluzione a 85°C per 5 minuti. L'alta temperatura è servita anche per separare le catene di cDNA di nuova sintesi dalle catene di RNA complementari. I campioni sono stati utilizzati subito per la PCR o stoccati a -20°C.

#### **4.20 Real-Time PCR**

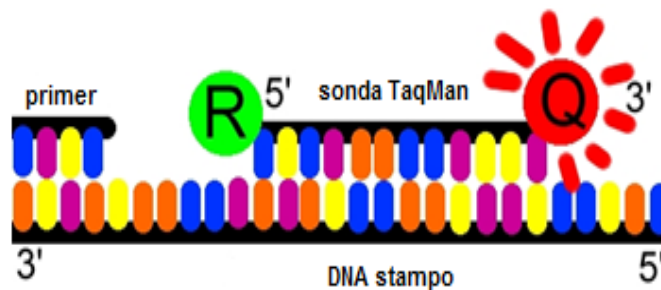
**Principi generali.** La Reazione a Catena della Polimerasi (PCR-Polymerase Chain Reaction) rappresenta una delle tecniche di biologia molecolare più diffusamente utilizzate nei laboratori di ricerca e di diagnostica. Nata nel 1983 da un'idea di Kary Mullis, per anni è stata disponibile solamente nella sua forma originale che, seppur rivoluzionaria e geniale, consente la rapida amplificazione di un segmento di DNA in studio ma non la sua quantificazione. Da alcuni anni è stato possibile superare tale limite grazie all'introduzione di una variante della tecnica di base, oggi nota come Real Time PCR. Questa tecnica permette di quantificare le molecole di DNA in maniera straordinariamente semplice e precisa a partire da poche molecole di DNA. Questa tecnica basa sulla possibilità di misurare l'accumulo dei prodotti di PCR in tempo reale durante tutti i cicli della reazione. Grazie al suo elevato "range" di quantificazione e all'alto grado di sensibilità, la real-time PCR è la tecnica di quantificazione del DNA più usata in medicina molecolare, nelle

biotecnologie, microbiologia e diagnostica. Il metodo "Gold standard" utilizzato in real-time PCR è il metodo Ct che si basa sulla definizione di un livello di fluorescenza soglia scelto dall'operatore in maniera tale da intersecare le curve di tutti i campioni nella fase esponenziale. Il valore Ct rappresenta il ciclo frazionario della reazione di amplificazione in cui il segnale della fluorescenza del campione interseca il valore soglia (92). I metodi più comunemente utilizzati per la quantificazione prevedono l'uso di coloranti fluorescenti che si intercalano nella molecola del DNA a doppio-filamento (Sybr Green) o sonde specifiche rivelatrici di fluorescenza (TaqMan).

La Real-Time PCR TaqMan utilizza sonde rivelatrici di fluorescenza capaci di accrescere significativamente la specificità di amplificazione. La valutazione quantitativa dell'acido nucleico è quindi affidata alla rivelazione e alla conseguente quantificazione di un "reporter" fluorescente, il cui segnale cresce in maniera proporzionale alla quantità del prodotto di PCR presente. A tal proposito viene disegnata una sonda gene-specifica, generalmente lunga 20-30 paia di basi, capace di appaiarsi all'interno della sequenza riconosciuta dalla coppia di primer utilizzata (**Figura 8**). Tale sonda contiene due fluorocromi: FAM (6-carboxy-fluorescein) o VIC come *reporter* fluorescente legato covalentemente all'estremità 5' e TAMRA (6-carboxy-tetramethyl-rhodamine) come *quencher* fluorescente legato covalentemente all'estremità 3', capace di assorbire nello spettro di emissione del reporter

(Figura 8). Finché la sonda è integra, la vicinanza tra quencher e reporter annulla l'emissione del segnale di fluorescenza.

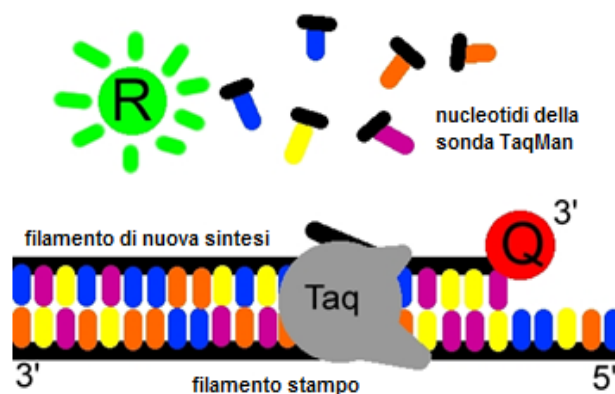
**Figura 8.** Appaiamento tra sonda TaqMan e il filamento DNA stampo



Replicando lo stampo, la Taq DNA polimerasi incontra la sonda e comincia a degradarla grazie alla sua attività 5'-esonucleasica. L'allontanamento del reporter dal quencher pone fine all'attività di assorbimento di quest'ultimo e fa sì che il reporter inizi ad emettere fluorescenza (Figura 9). L'incremento di fluorescenza osservato è proporzionale alla quantità di prodotto di PCR presente. La possibilità di

utilizzare vari tipi di fluorocromi per marcare sonde diverse consente di rilevare contemporaneamente più di una sequenza target in una sola reazione, realizzando così una reazione in multiplex.

**Figura 9.** Emissione di fluorescenza del reporter

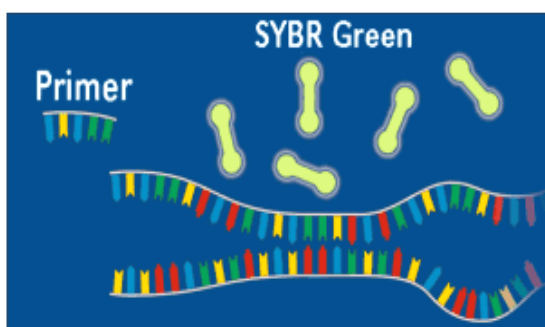


Il Sybr Green invece è una molecola fluorescente e si lega, in modo aspecifico, al solco minore del DNA a doppio filamento (dsDNA). Il complesso DNA-colorante assorbe luce blu ad una lunghezza d'onda max di 488 nm ed emette luce verde a una lunghezza d'onda maggiore ( $\lambda_{\text{max}} = 522 \text{ nm}$ ). All'inizio del processo di amplificazione, la miscela di reazione contiene DNA denaturato, primers e molecole fluorescenti Sybr Green

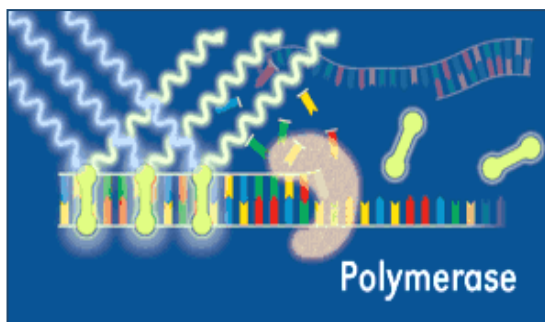


(**Figura 10 A**). Dopo l'annealing dei primers, solo poche molecole di Sybr Green si legano al dsDNA ed iniziano ad emettere fluorescenza. Durante la fase di sintesi gli ampliconi prodotti generano un segnale molto intenso e l'incremento di fluorescenza emessa è proporzionale al numero di molecole di fluoroforo intercalate nel dsDNA (**Figura 10 B**).

**Figura 10.** Fase iniziale di amplificazione (**A**) e di sintesi con emissione di fluorescenza (**B**)



**A**



**B**

#### **4.21 Valutazione delle estremità telomeriche mediante multiplex Real-Time QPCR**

**Concetti generali.** La valutazione delle estremità telomeriche è stata realizzata mediante multiplex Real-Time QPCR (*Quantitative Polymerase Chain Reaction*) e normalizzata per il numero di ripetizioni di un gene a singola copia (93; 94; 95; 96).

Questo sistema ha permesso di determinare contemporaneamente il numero relativo di copie di due differenti sequenze sfruttando un singolo fluoroforo intercalante del DNA, il Sybr Green.

La molecola del Sybr Green, legandosi a dsDNA, consente di acquisire il segnale fluorescente emesso dagli ampliconi dei telomeri e dagli ampliconi dell'albumina, usata come riferimento. La lunghezza relativa media dei telomeri viene poi espressa come rapporto **T/A**, dove **T** rappresenta il numero di copie delle ripetizioni telomeriche sintetizzate ed **A** il numero di copie di albumina amplificate.

Il segnale fluorescente relativo alla sequenza target più abbondante (telomeri) viene acquisito nei primissimi cicli di amplificazione, quando il segnale della sequenza target meno abbondante (albumina) è ancora ad un livello basale. L'acquisizione di quest'ultimo avviene, invece, ad una temperatura ben al di sopra della temperatura di melting ( $T_m$ ) del primo amplicone, in corrispondenza della quale è ormai completamente denaturato e a singolo filamento.

Questo metodo possiede tuttavia lo svantaggio di generare segnali non specifici, a causa delle proprietà di legame del Sybr Green, generando falsi positivi. Pertanto la specificità della reazione è determinata analizzando una *curva di melting* (curva di dissociazione), specifica per ciascun amplicone prodotto, inserita al termine della reazione di PCR.

**Sintesi di primer specifici delle estremità telomeriche.** La lunghezza media relativa dei telomeri può essere stimata mediante QPCR per mezzo di primer (Telg e Telc) capaci di ibridare lungo le ripetizioni esameriche presenti alle estremità telomeriche. In **Tabella 1** è riportata la coppia di primer utilizzata nel nostro studio, sintetizzata sulla sequenza descritta nel lavoro di Cawthon e capace di generare un prodotto di lunghezza fissa pari a 79 bp (93).

| Primer | Sequenza 5'→3'                             |
|--------|--|
| Telg   | ACACTAAGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTAGTGT   |
| Telc   | TGTTAGGTATCCCTATCCCTATCCCTATCCCTATCCCTAACA |

**Tabella 1.** Coppia di primers utilizzata nella multiplex QPCR per la valutazione delle estremità telomeriche



A questo prodotto di sintesi (amplicone) corrisponde una curva di melting coerente con le caratteristiche del prodotto generato e ben separabile dalla curva di melting specifica degli ampliconi dell'albumina.

**Sintesi di primer specifici per il gene di riferimento a singola copia.** Anche in questo in caso i primer specifici per l'albumina sono stati opportunamente disegnati per assicurare prodotti corti di PCR (98 bp) e sintetizzati sulla sequenza descritta nel lavoro di Cawthon (93). Inoltre, ad entrambe l'estremità 5' dei primers sono state inserite delle sequenze *tag* ricche in CG (**Tabella 2**) che conferiscono ai prodotti amplificati una  $T_m$  superiore a quella degli ampliconi dei telomeri.

| Primer | Sequenza 5'→3'  |
|--------|---|
| Albu   | <b>cgggcggcggggcgggcgggcggtgggcgggAAATGCTGCACAGAATCCTTG</b> |
| Albd   | <b>gccccggccccgcggcgccccgtcccgccgGAAAAGCATGGTCGCCTGTT</b>   |

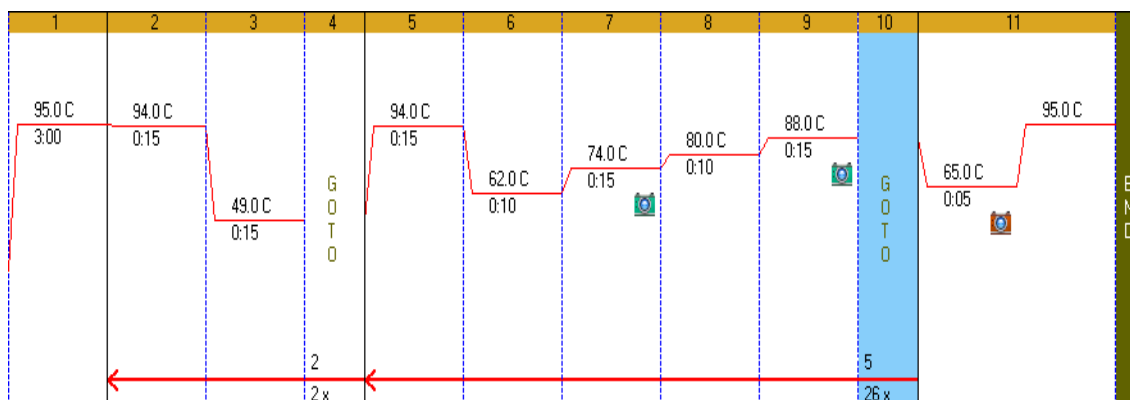
**Tabella 2.** Coppia di primers utilizzata nella multiplex QPCR per la valutazione del gene a singola copia (albumina). Le ripetizioni GC (in grigio) rappresentano le sequenze tag inserite all'estremità 5' dei primers.

Il segnale fluorescente emesso dagli ampliconi dell'albumina è, infatti, acquisito ad una temperatura piuttosto elevata (88°C), che

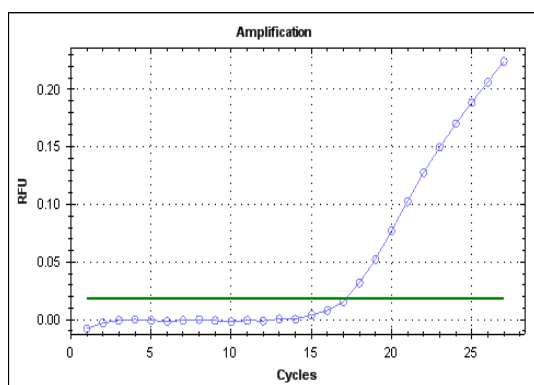
favorisce la denaturazione degli ampliconi dei telomeri annullandone l'emissione di fluorescenza, assicurando allo stesso tempo sia l'appaiamento dei primer per il gene a singola copia che il legame del Sybr Green I.

**Profilo termico e cicli di amplificazione.** Il protocollo per la valutazione della lunghezza telomerica prevede 26 cicli di amplificazione. Come descritto in **Figura 12**, il primo punto del protocollo serve a denaturare e termoattivare la Taq polimerasi. A questa seguono due fasi necessarie per l'annealing specifico dei primer Telg e Telc (62°C) e la sintesi dei telomeri (74°C). In corrispondenza di quest'ultima si acquisisce il segnale fluorescente emesso dagli ampliconi dei telomeri (**Figura 13 A**). A questo punto fanno seguito un'incubazione di 10 secondi a 80°C e una di 15 secondi a 88°C necessaria per l'acquisizione del segnale di fluorescenza specifico del gene per l'albumina (**Figura 13 B**). La reazione di sintesi è favorita dall'incremento della temperatura che assicura la completa denaturazione degli ampliconi dei telomeri e il rilascio della Taq polimerasi.

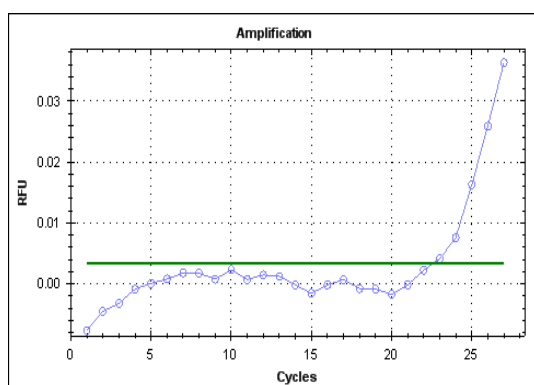
**Figura 12.** Profilo termico e cicli di amplificazione per l'analisi dei telomeri e dell'albumina



**Figura 13.** Esempio di curva di amplificazione specifica per le estremità telomeriche (A) e l'albumina (B)



A



B

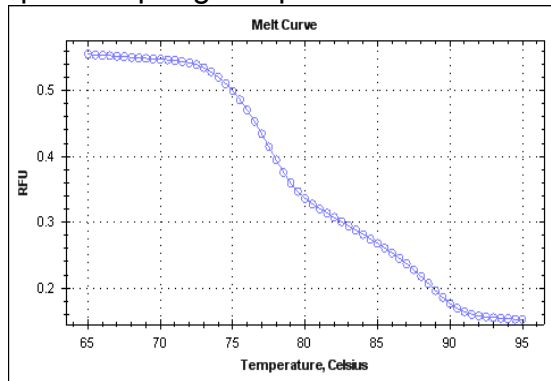
In una PCR multiplex convenzionale le elevate concentrazioni del prodotto amplificato nei primi cicli inibiscono spesso l'amplificazione successiva delle sequenze target meno abbondanti, così da dover ricorrere a ridotte concentrazioni dei loro primer specifici. In questo sistema, la fase di incubazione a 84°C elimina questo inconveniente, garantendo allo stesso tempo un'efficiente sintesi del prodotto del gene a singola copia. L'ulteriore incremento della temperatura a 88°C serve ad assicurare la completa denaturazione degli ampliconi dei telomeri, eliminandone del tutto l'emissione di fluorescenza. È ragionevole supporre che a 74°C siano rilevati entrambi i segnali, ma il principio su cui si basa tale sistema prevede l'amplificazione di un gene a singola copia troppo poco abbondante per contribuire al segnale di fluorescenza acquisito e specifico dei telomeri.

***Analisi della curva di melting.*** Poiché questo sistema è basato sull'utilizzo della molecola Sybr Green I è stato necessario procedere con l'analisi della curva di melting, capace di fornire un'indicazione sulla purezza dell'amplificato e sulla presenza di eventuali dimeri di primer (97;98) (**Figura 14 A**). Al termine della reazione di PCR la temperatura viene gradualmente aumentata da 65°C, condizione in cui tutto il DNA è a doppia elica e la fluorescenza è massima, a 95 °C, temperatura alla quale tutto il DNA è presente in forma dissociata e la fluorescenza è minima. Questo lento incremento della temperatura induce un decremento della

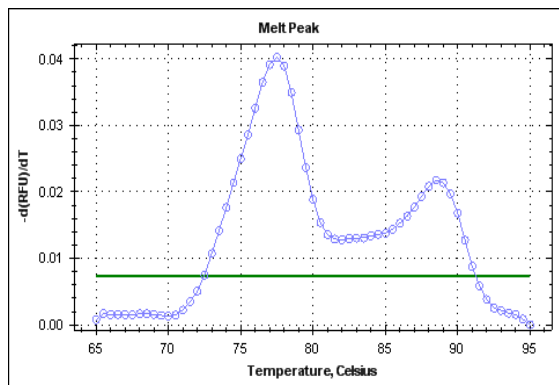


fluorescenza e la temperatura in corrispondenza della quale si ha un repentino decremento del segnale fluorescente corrisponde alla  $T_m$  del prodotto amplificato, ovvero la temperatura alla quale il 50% del DNA è in forma di singolo filamento (ssDNA). Osservando una curva di melting è possibile notare un flesso in corrispondenza di ciascuna specifica  $T_m$ . Naturalmente se si distinguono più flessi di fluorescenza, è logico desumere che nella reazione di PCR siano stati prodotti amplificati aspecifici. I flessi di fluorescenza, per comodità, sono trasformati in picchi eseguendo la derivata prima della curva. I flessi di fluorescenza della curva di melting, per comodità di interpretazione, sono stati trasformati in picchi eseguendo la derivata prima della curva (**Figura 14 B**).

**Figura 14.** Esempio di curva di melting (A) e derivata negativa (B) specifica per gli ampliconi dei telomeri e dell'albumina



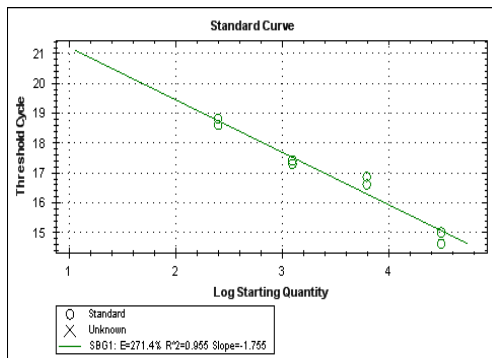
**A**



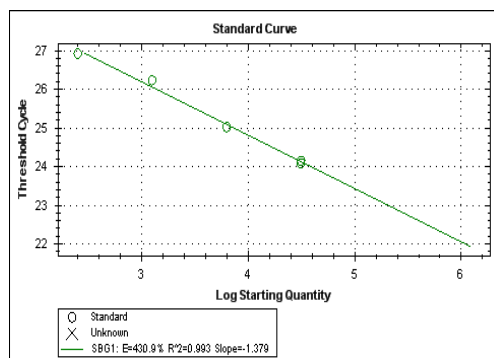
**B**

I risultati di ciascuna PCR sono stati inoltre espressi in relazione ad una curva standard costruita utilizzando campioni di DNA di riferimento. Le **Figure 15 A-B** mostrano due curve standard indipendenti, una specifica per le sequenze telomeriche e l'altra per il gene a singola copia (albumina), ottenute dai medesimi campioni acquisendo il segnale di fluorescenza SYBR Green I emesso dagli ampliconi alla temperatura di 74°C (telomeri) e 88°C (albumina).

**Figura 15.** Curva standard per la valutazione dei telomeri (A) e dell'albumina (B)



**A**



**B**

**Preparazione dei campioni.** Per ogni punto sperimentale è stata preparata una miscela di reazione contenente 10 µl di SYBR GREEN (composta da desossiribonucleotidi trifosfato, Taq DNA polimerasi e molecola Sybr Green I) (Bio-Rad Laboratories, Hemel Hempstead, UK), 7 µl di H<sub>2</sub>O RNase-free, 1 µl di ciascun oligo specifico per i telomeri (Telg e Telc) (**Tabella 1**) e per l'albumina (Albd e Albu) (**Tabella 2**).

Successivamente, in ogni pozzetto di una piastra da 48 posti per lettura in fluorescenza (Multiplate<sup>®</sup> PCR Plates<sup>™</sup>, Bio-Rad, CA, USA), sono stati aggiunti 19 µl della miscela preparata e 1 µl di retrotrascritto (20 ng di cDNA).

#### **4.22 Valutazione dell'espressione genica di hTERT e hTERC mediante Real-Time RT-PCR con Sybr Green**

**Concetti generali.** L'enzima telomerasi è una trascrittasi inversa telomero specifica e consta di una subunità a RNA (hTR, human Telomerase RNA) ed una subunità proteica ad attività catalitica (hTERT, human Telomerase Reverse Transcriptase). L'espressione di questi due geni è stata quantificata mediante RT-QPCR (*Reverse Transcription Quantitative Polymerase Chain Reaction*) monitorando in tempo reale l'andamento della reazione di sintesi della DNA polimerasi. Questo sistema sfrutta la molecola fluorescente Sybr Green I e richiede l'analisi di

una curva di melting per la discriminazione dei prodotti di PCR ottenuti (controllo qualità) (97;98).

**Primers utilizzati per l'analisi.** In **Tabella 3**, sono riportate le coppie di primers grazie alle quali è stato possibile valutare l'espressione del gene hTR (TR-46S e TR-148A) e l'espressione del gene hTERT (hTERT-1783S e hTERT-2247A) (99;100).

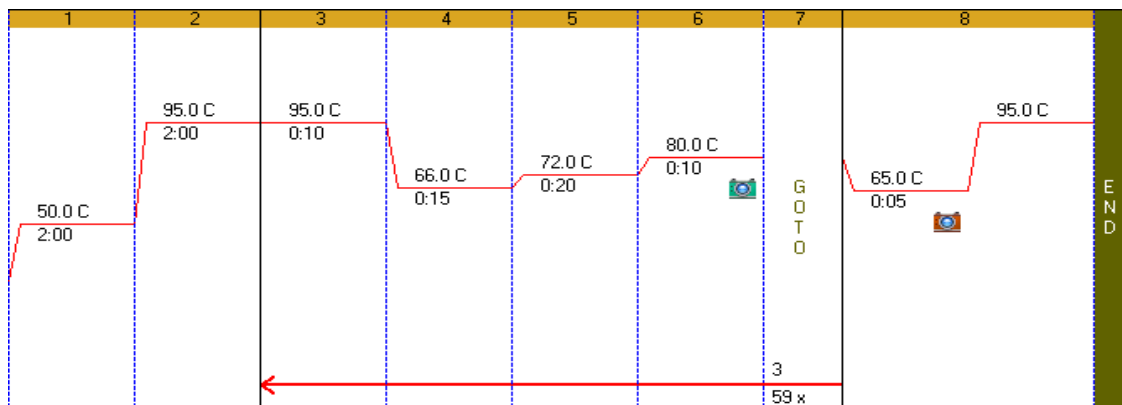
| Primer             | Sequenza 5'→ 3'           |
|--------------------|---------------------------|
| <b>TR-46S</b>      | CTAACCTAACTGAGAAGGGCGTAG  |
| <b>TR-148A</b>     | GAAGGCGGCAGGCCGAGGCTTTTCC |
| <b>hTERT-1783S</b> | CCGGAAGAGTGTCTGGAGCAAGT   |
| <b>hTERT-2247A</b> | CTGGCGATGACCTCCGTGAGC     |

**Tabella 3.** Coppie di primers utilizzate nella Real-Time RT-PCR per la valutazione dell'espressione genica di hTR (hTERC) e hTERT

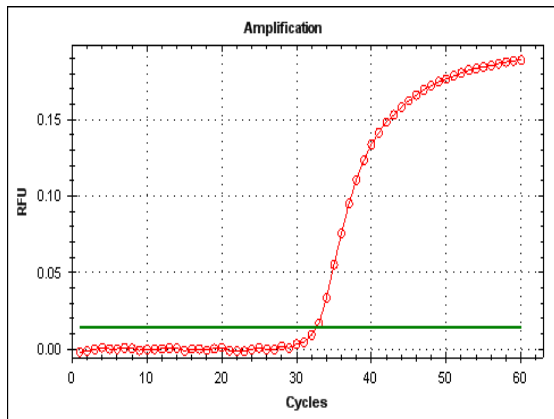
**Protocollo e cicli di amplificazione.** Il protocollo utilizzato e adattato per il nostro studio ha previsto un profilo termico specifico e 59 cicli di amplificazione (**Figura 16**): l'acquisizione del segnale fluorescente Sybr Green I avviene in corrispondenza della fase di sintesi di entrambi i geni (**Figura 17**). Questo permette di valutare in tempo reale l'amplificazione dell'espressione genica. Al termine della reazione di PCR è stata inoltre inserita una curva di melting per mezzo della quale è stato

possibile discriminare tra prodotti di amplificazione specifici e aspecifici  
(Figura 18 A-D).

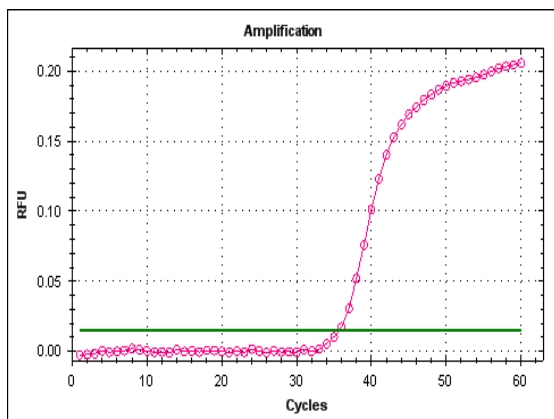
**Figura 16.** Protocollo e cicli di amplificazione per la valutazione delle componenti della telomerasi



**Figura 17.** Esempio di curva di amplificazione di hTERC (**A**) e di hTERT (**B**)

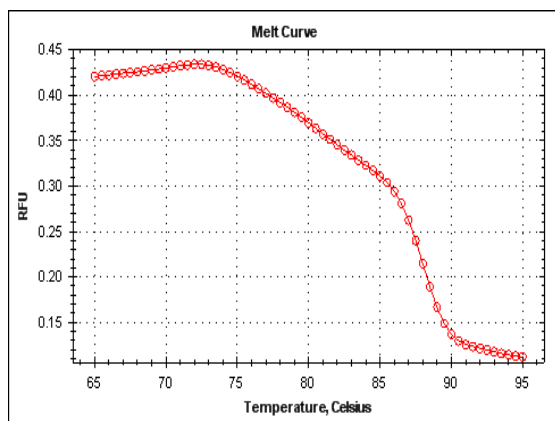


**A**

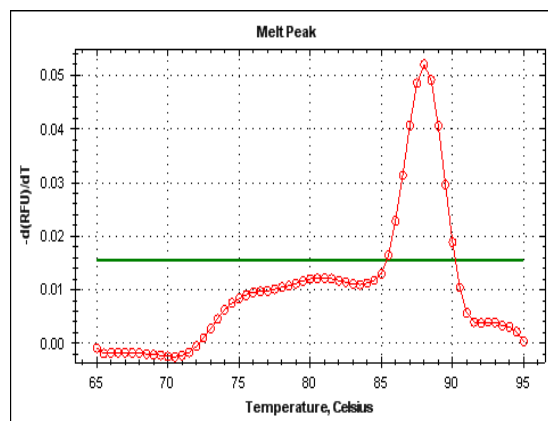


**B**

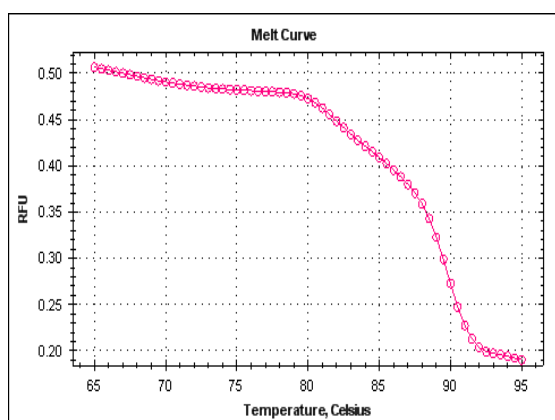
**Figura 18.** Esempio di curva di melting e derivata negativa di hTERC (A,B) e di hTERT (C,D)



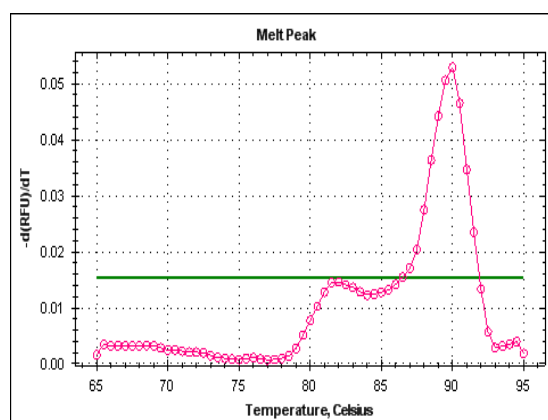
A



B



C



D

**Preparazione dei campioni.** Per prima cosa sono state preparate due miscele, specifiche per ciascuna delle componenti della telomerasi, con 10  $\mu$ l di SYBR GREEN (contenente desossiribonucleotidi trifosfato, la Taq DNA polimerasi e la molecola Sybr Green I), 7  $\mu$ l di H<sub>2</sub>O RNase-free,



1  $\mu$ l degli oligo senso e 1  $\mu$ l degli oligo antisenso. A questo punto sono stati aggiunti 19  $\mu$ l di ciascuna miscela preparata ai pozzetti di una piastra da 48 posti adatta per letture in fluorescenza (Multiplate<sup>®</sup> PCR Plates<sup>™</sup>, Bio-Rad, CA, USA) e 1  $\mu$ l di retrotrascritto (20 ng di cDNA).

#### **4.23 Dosaggio proteico con il metodo Bradford**

**Principio del test.** Il dosaggio delle proteine con il metodo Bradford è basato sulla misura dell'assorbanza di un reagente affine per le proteine, il Comassie Brilliant Blue. Questo colorante in soluzione acida si lega alle proteine tramite legami elettrostatici fra i propri gruppi sulfonici e la proteina, formando un complesso colorato con una lunghezza d'assorbimento di 595 nm.

**Metodica.** Per prima cosa è stata preparata una curva di taratura ottenuta diluendo una soluzione standard di albumina a differenti concentrazioni (2 mg/ml, 1 mg/ml, 0.25 mg/ml, 0.125 mg/ml e 0.0625 mg/ml) e sono stati diluiti 1:50 i campioni da dosare. A questo punto è stato aggiunto 1 mL di Comassie Brilliant Blue (reattivo di Bradford) a 20  $\mu$ l di ciascuno standard, a 20  $\mu$ l di H<sub>2</sub>O deionizzata (utilizzata come bianco) e ad un'aliquota di 20  $\mu$ l di ciascun campione proteico. Infine, i campioni sono stati incubati 5 minuti a temperatura ambiente prima della lettura allo spettrofotometro (Lambda Bio 20, Perkin Elmer, MA, USA) ad una lunghezza d'onda di 595 nm. La concentrazione proteica di ciascuna

soluzione è stata estrapolata dalla curva di taratura precedentemente preparata.

#### **4.24 Dosaggio della nitrotirosina con metodica ELISA**

**Principio del test.** I residui di tirosina presenti all'interno delle proteine rappresentano il principale bersaglio delle specie reattive NO-derivate e possono essere convertiti a 3-nitrotirosina attraverso l'aggiunta di un gruppo nitro-NO<sub>2</sub> all'anello aromatico (reazione di nitratura). Tale conversione determina una modifica covalente e stabile dei residui di tirosina, che altera la struttura e la funzione biologica della proteina nitrata.

La concentrazione della nitrotirosina (N-tyr) plasmatica è stata determinata mediante saggio ELISA, come indice della presenza di perossinitrito, un potente ossidante. In questa metodica è utilizzato un anticorpo primario monoclonale diretto contro un epitopo della nitrotirosina attiva (mouse, monoclonal HM111, IgG<sub>b</sub>, 0.1 mg/ml, BIOMOL, PA, USA) e un anticorpo secondario anti-mouse coniugato con l'enzima perossidasi di rafano (anti-mouse, 200 µg/0.5 ml, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA). L'aggiunta della 3, 3', 5, 5'-tetrametilbenzidina (TMB), substrato cromogeno della perossidasi, implica la formazione di un composto colorato di blu, la cui misura è proporzionale alla concentrazione di enzima coniugato all'anticorpo, che a sua volta riflette la quantità di antigene presente.

**Metodica.** Il primo passo è stato quello di dosare la concentrazione proteica dei plasma in modo tale da caricare sulla piastra 65 µl di campione con lo stesso contenuto proteico. La normalizzazione è stata effettuata attraverso diluizioni con buffer carbonato (NaHCO<sub>3</sub>, 0.1 M, pH 9.6). Successivamente è stata costruita una curva di calibrazione ottenuta attraverso diluizione in buffer carbonato di albumina nitrata (NT-BSA, Sigma Aldrich, CA, USA), usata come standard. Infine sono stati aggiunti ai pozzetti di una piastra trattata per adesione (Bibby-IWAKI per ELISA cod 3801-096, Giappone) 200 µl di buffer carbonato come NTC, 200 µl di ciascun punto sperimentale della curva standard (50, 10, 5, 1, 0.5 nmol/l) e 200 µl del campione da dosare (65 µl plasma + 135 µl di buffer carbonato 0.1 M). La piastra è stata poi incubata per tutta la notte a 4 °C, così da favorire l'adesione delle proteine sul fondo dei pozzetti. Il giorno successivo la piastra è stata svuotata accuratamente e rimosse le proteine non adese mediante 3 lavaggi consecutivi per 2 minuti a temperatura ambiente con 150 µl di tampone di lavaggio (PBS 1X + 0.05% Tween 20). A questo punto, sono stati aggiunti per ciascun pozzetto 200 µl di BSA 0.1% in PBS-T, necessaria a bloccare i legami aspecifici, e la piastra è stata incubata per 60 minuti a 37°C. Al termine di tale periodo, sono stati effettuati due lavaggi, aggiunti a ciascun pozzetto 100 µl di anticorpo primario monoclonale anti-nitrotirosina (HM111, anti-nitrotirosina, mouse IgG<sub>b</sub>, 0.1 mg/ml, diluizione 1:400 in PBS-T 0.1% BSA, BIOMOL, PA, USA) e la piastra è stata nuovamente incubata per 60 minuti a 37°C. Al termine

dell'incubazione, dopo tre lavaggi, sono stati aggiunti 100 µl di anticorpo secondario (anti-mouse, 200 µg/0.5 ml, diluizione 1:1000 in PBS-T 0.1% BSA, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) e la piastra è stata incubata a 37°C per 45 minuti. A questo punto è stato rimosso l'eccesso di anticorpo secondario mediante tre lavaggi, sono stati aggiunti 150 µl di TMB e la piastra è stata incubata per 10-15 minuti al buio, controllando periodicamente lo sviluppo del colore. Quando la quantità di cromogeno generato è risultata sufficiente, la reazione è stata bloccata aggiungendo 50 µl di soluzione di stop ( $H_2SO_4$  0.5 M) e la lettura è stata eseguita alla lunghezza d'onda di 450 nm con fondo a 650 nm, in un lettore per piastre (MultiSkan Ex, ThermoElectron Corporation, Ohio, USA) (54; 101).

## 5. ANALISI STATISTICA

L'analisi statistica sull'intera popolazione studiata è stata condotta con il modello di regressione lineare semplice, regressione semplice stepwise e regressione multipla. Sui singoli gruppi di studio è stata, invece, applicata la correlazione multipla, il test t di Student per dati indipendenti e l'ANOVA con correzione del Bonferroni.

Il modello lineare classico di regressione è usato per spiegare la relazione esistente fra una variabile dipendente e più variabili indipendenti e la relazione causale implicata in questo modello ipotizza che una sola variabile possa essere la spiegazione di un'altra. Tuttavia, è più probabile che esistano più cause concomitanti che concorrono, in misura diversa, a spiegare la variabile dipendente.

La regressione multipla è, quindi, un ampliamento di quella semplice, in quanto presuppone che più variabili indipendenti siano necessarie per spiegare una singola variabile dipendente. A tal proposito, è stato necessario effettuare una selezione delle variabili da utilizzare come regressori. In particolare, per la selezione dei regressori, le procedure più utilizzate sono la selezione *backward* e *forward* che permettono in modo quasi automatico di eliminare o aggiungere le variabili esplicative che non influenzano, o influenzano, significativamente le variabili risposta. Nel nostro studio è stata applicata, come procedura

sequenziale di scelta delle variabili da includere nel modello di regressione multipla, la regressione stepwise forward.

L'analisi statistica per singoli gruppi è stata eseguita mediante correlazione multipla, test t di Student per dati indipendenti e tramite analisi della varianza (ANOVA) con correzione del Bonferroni  $\pm$  errore standard (ES) per i gruppi.

Il test t permette di verificare se due variabili hanno medie, varianze o distribuzioni sovrapponibili e viene utilizzato per constatare se, la differenza presente tra il valore medio di una medesima misura, rilevata in due popolazioni differenti, sia dovuta o meno al caso.

Il test ANOVA è invece utilizzato per confrontare due o più gruppi di dati, confrontando la variabilità interna a questi gruppi con la variabilità tra i gruppi. Si ricorre a questo test quando si vuole verificare se, la variabilità delle medie dei valori riscontrati in una popolazione sottoposta a diversi trattamenti, sia dovuta o meno al caso.

Per la correzione del Bonferroni, se uno sperimentatore sta analizzando  $n$  ipotesi (dipendenti o indipendenti) su una serie di dati, il livello di significatività statistica che dovrebbe essere utilizzato per ogni ipotesi è  $1/n$  volte quello che sarebbe loro attribuito se anche solo un'ipotesi fosse empiricamente testata.

## 6. RISULTATI

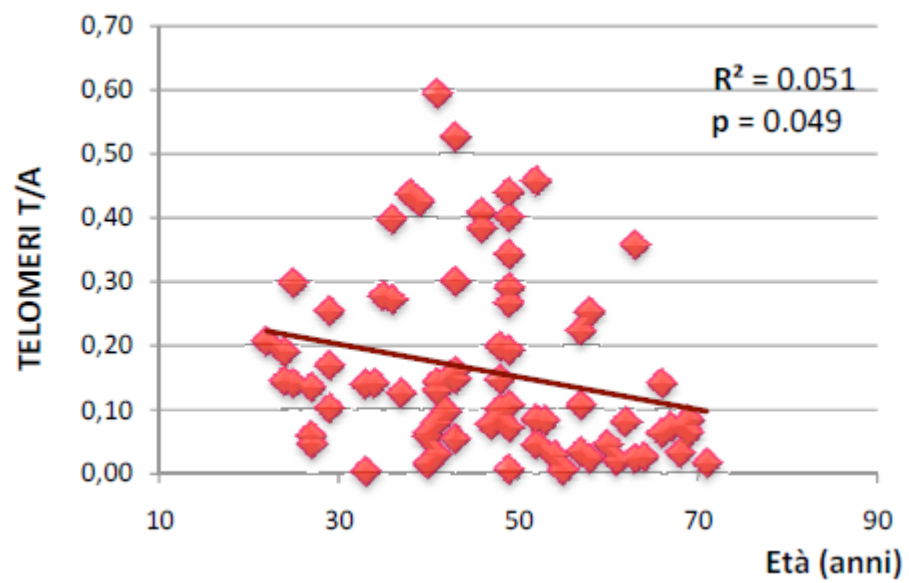
### *6.1 Lunghezza telomerica*

La lunghezza telomerica è stata valutata sul DNA genomico dei soggetti studiati, attraverso metodica Real-Time con protocollo modificato presso il nostro laboratorio.

Utilizzando una regressione lineare semplice, la lunghezza delle estremità telomeriche è stata correlata con i dati antropometrici, glicometabolici e di funzionalità d'organo disponibili.

Su tutta la popolazione esaminata è emersa una correlazione negativa significativa fra la lunghezza dei telomeri (espressa come rapporto valore Telomero/Albumina), e l'età del soggetto (**Figura 19**).

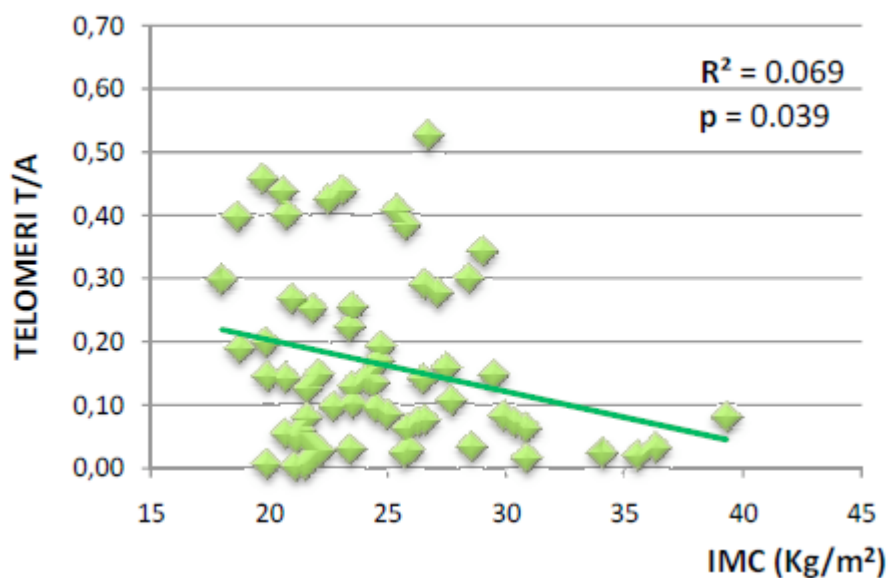
**Figura 19.** Correlazione negativa fra la lunghezza dei telomeri ed età dei soggetti studiati.





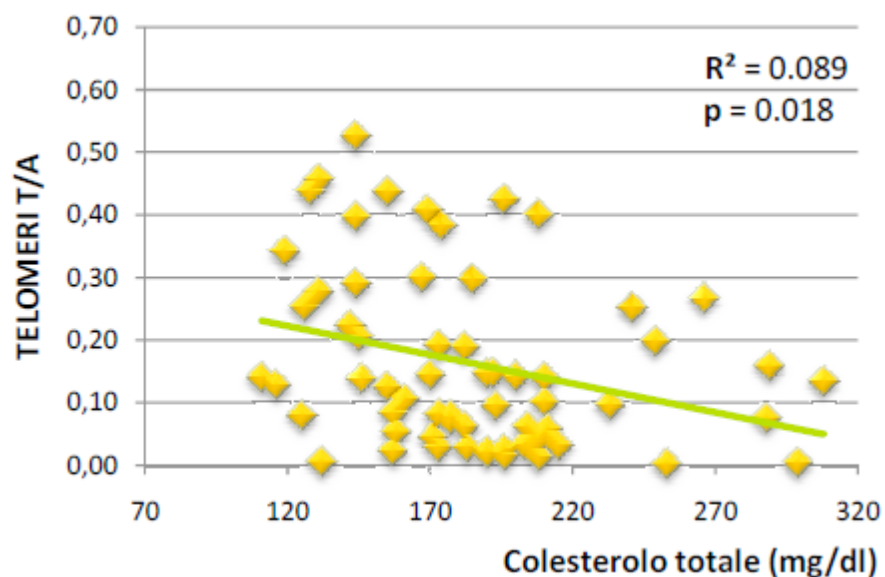
Inoltre la lunghezza dei telomeri è risultata inversamente correlata anche con il BMI (body mass index) o IMC (indice di massa corporea) (**Figura 20**).

**Figura 20.** Correlazione negativa fra la lunghezza dei telomeri e l'Indice di Massa Corporea.

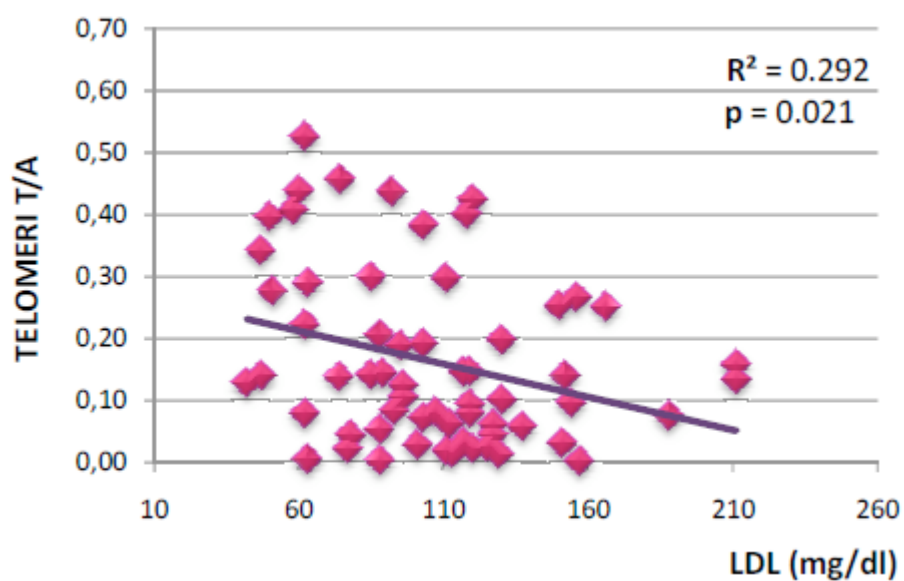


Valutando la correlazione tra lunghezza dei telomeri e parametri di controllo metabolico, abbiamo documentato un'associazione negativa significativa con i livelli plasmatici di colesterolo totale (**Figura 21**) e di colesterolo LDL (**Figura 22**).

**Figura 21.** Correlazione negativa fra la lunghezza dei telomeri e la concentrazione di colesterolo totale.

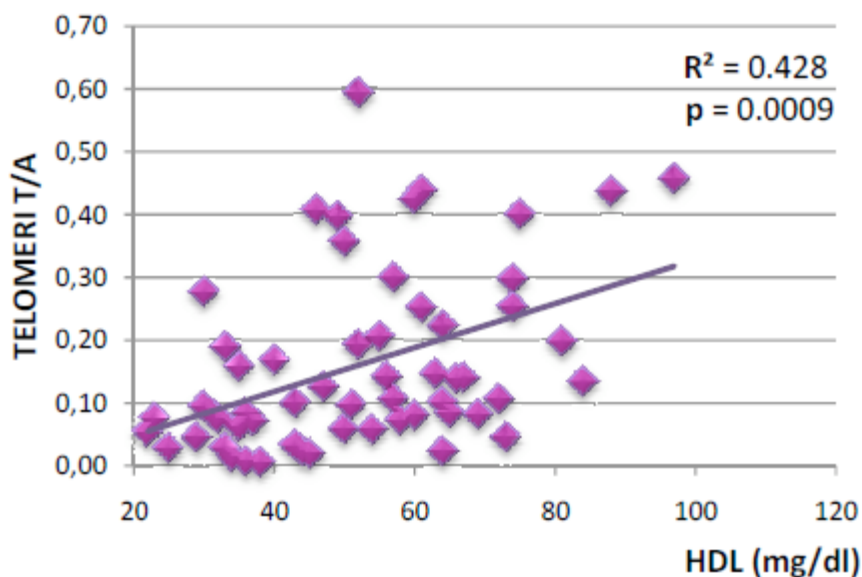


**Figura 22.** correlazione negativa fra la lunghezza dei telomeri e la concentrazione di LDL.



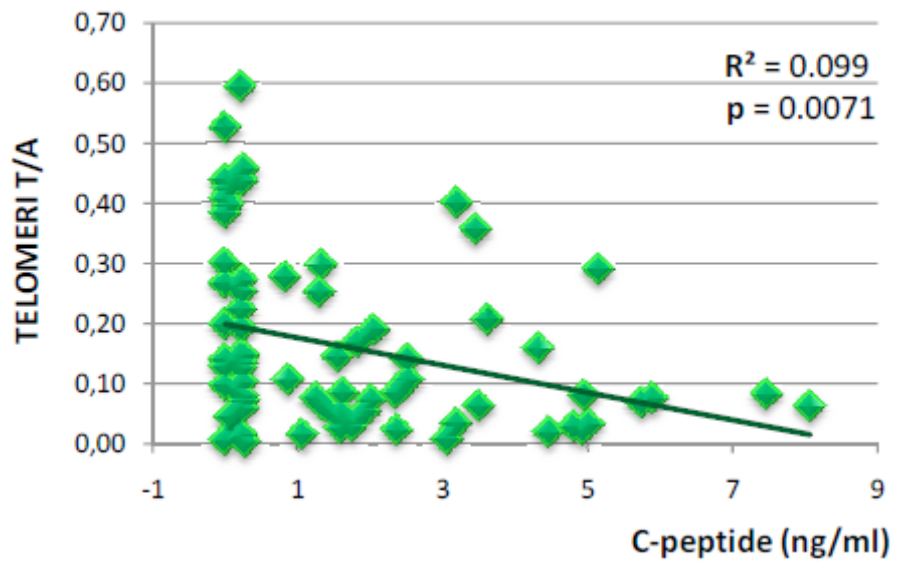
E' inoltre emersa una correlazione positiva significativa fra la lunghezza dei telomeri ed il colesterolo HDL (**Figura 23**).

**Figura 23.** Correlazione positiva fra la lunghezza dei telomeri e la concentrazione di HDL.

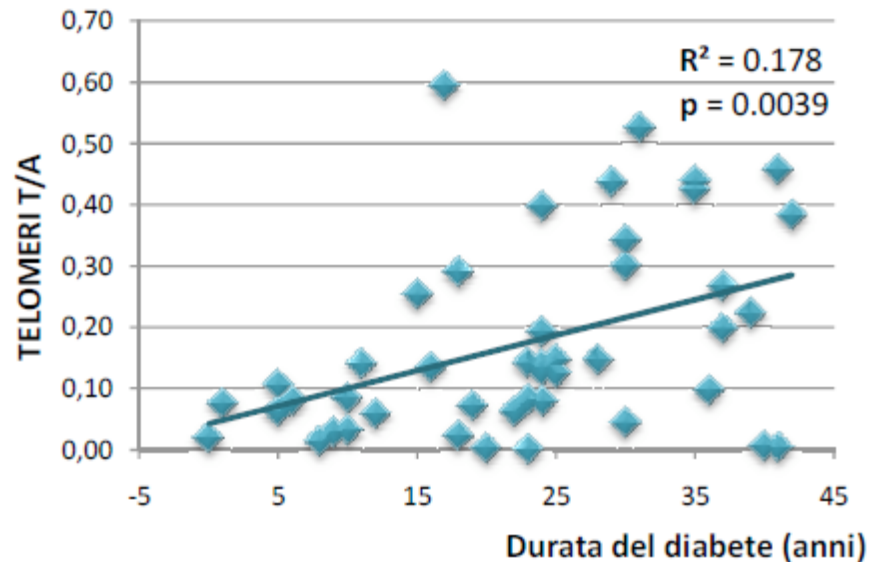


Abbiamo osservato infine una correlazione negativa con la concentrazione del C-peptide (**Figura 24**) ed una correlazione positiva con gli anni di durata di malattia (**Figura 25**).

**Figura 24.** Correlazione inversa tra lunghezza telomerica e concentrazione plasmatica di C-peptide.

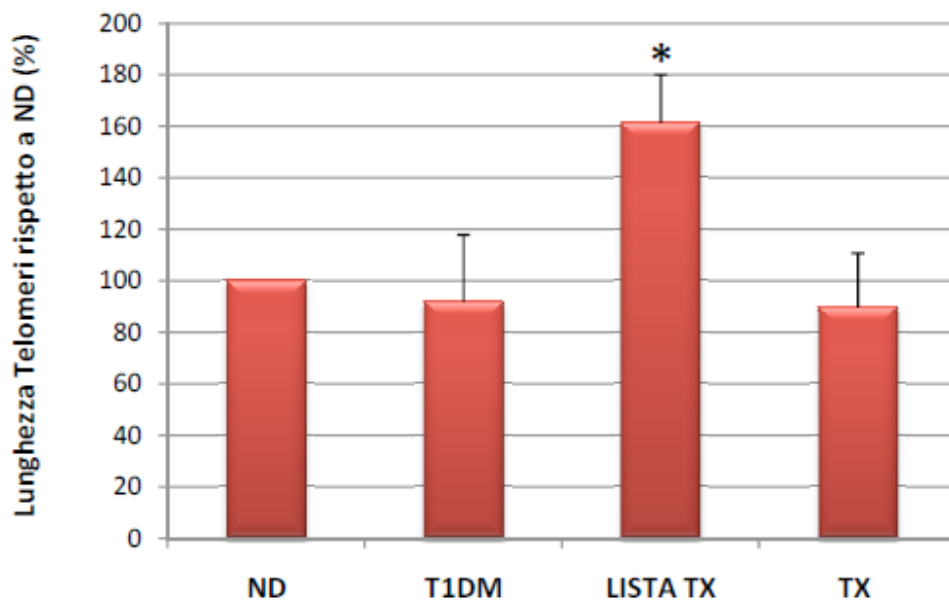


**Figura 25.** Correlazione diretta tra lunghezza telomerica ed anni di durata di malattia.



Valutando i soli soggetti affetti da T1DM LISTA TX, T1DM, TX) rispetto ai controlli sani (ND), la lunghezza dei telomeri è risultata significativamente aumentata nei soggetti in valutazione per trapianto (LISTA TX) ( $p < 0.05$  per il test t di Student) (**Figura 26**), mentre nel gruppo T1DM tale parametro non differiva rispetto ai controlli ND. L'aumento significativo della lunghezza telomerica nei pazienti LISTA TX andava incontro ad una normalizzazione nel gruppo TX. Ciascun dato è stato espresso come variazione percentuale rispetto al controllo.

**Figura 26.** Lunghezza dei telomeri valutata su pazienti non-diabetici (ND), diabetici tipo 1 (T1DM), diabetici tipo 1 candidati al trapianto di pancreas (LISTA TX) e pazienti trapiantati (TX). Rispetto ai ND, la lunghezza dei telomeri risulta significativamente aumentata nei pazienti LISTA TX (\*= $p<0.05$ ).



La regressione stepwise (procedura sequenziale utilizzata per scegliere le variabili da includere in un modello di regressione multipla) dimostra che, tra tutte le variabili indipendenti analizzate, la durata di malattia, il BMI, il colesterolo HDL ed il peso dei soggetti hanno un'incidenza maggiore rispetto alle altre (**Tabella 4**).

|                                | <b>F-to-enter (<math>\geq 4.00</math>)</b> |
|--------------------------------|--|
| <b>Durata di malattia (aa)</b> | 13.56                                      |
| <b>BMI (kg/mq)</b>             | 5.62                                       |
| <b>HDL (mg/dl)</b>             | 5.50                                       |
| <b>Peso (kg)</b>               | 4.21                                       |

**Tabella 4.** Regressione stepwise per il confronto della lunghezza dei telomeri con tutti i dati antropometrici e glicometabolici. Le variabili più incidenti sono risultate: durata di malattia, BMI e colesterolo HDL.

Queste variabili sono state quindi utilizzate come regressori nell'analisi di regressione multipla, da cui è emerso che durata del diabete e concentrazione plasmatica di HDL sono le due variabili che influenzano in misura maggiore la lunghezza dei telomeri (**Tabella 5**).

|                                | Valore di p       |
|--------------------------------|-------------------|
| <b>Durata di malattia (aa)</b> | <b>0,0176</b>     |
| BMI (kg/mq)                    | 0,3897            |
| <b>HDL (mg/dl)</b>             | <b>&lt;0,0001</b> |
| Peso (kg)                      | 0,4300            |

**Tabella 5.** regressione multipla delle variabili indipendenti risultate significativamente incidenti nella regressione stepwise. Durata di diabete ed HDL sono state identificate come le variabili che possono maggiormente influenzare la lunghezza telomerica.

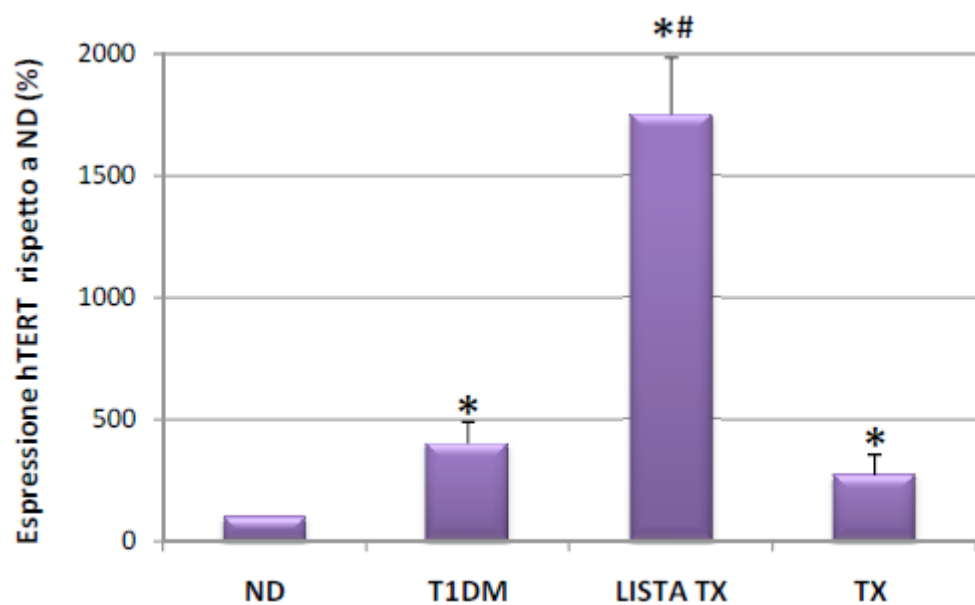


## **6.2 Attività Telomerasica**

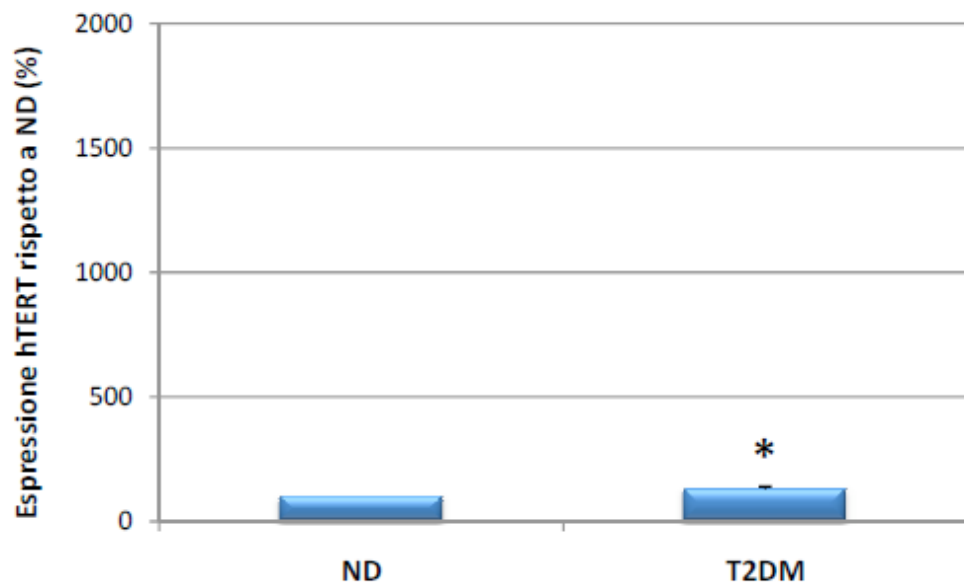
Per quanto concerne l'attività telomerasica, l'espressione del gene per la subunità proteica ad attività catalitica hTERT è risultata significativamente aumentata in tutti i gruppi (T1DM, LISTA TX e TX) rispetto ai controlli sani (ND) (**Figura 27**). Nello specifico, nei pazienti LISTA TX tale espressione genica è risultata significativamente aumentata anche rispetto ai T1DM. Tale aumento tende a normalizzarsi con il trapianto (TX), pur mantenendosi significativamente più elevato rispetto al gruppo di controllo (ND).

Un incremento significativo dell'espressione della subunità catalitica (sebbene meno marcato rispetto al T1DM) si è osservato anche nel gruppo dei T2DM (**Figura 28**).

**Figura 27.** Espressione del gene per la subunità catalitica hTERT in ND, T1DM, LISTA TX e TX, espressa come variazione percentuale rispetto ai ND. L'espressione genica aumenta significativamente in tutti i gruppi studiati rispetto ai ND (\*=  $p < 0.05$  per il test t di Student). Inoltre nella LISTA TX l'espressione risulta significativamente aumentata anche rispetto ai T1DM (#= $p < 0.05$  per il test ANOVA con correzione di Bonferroni). Il trapianto tende a normalizzare l'espressione di hTERT.

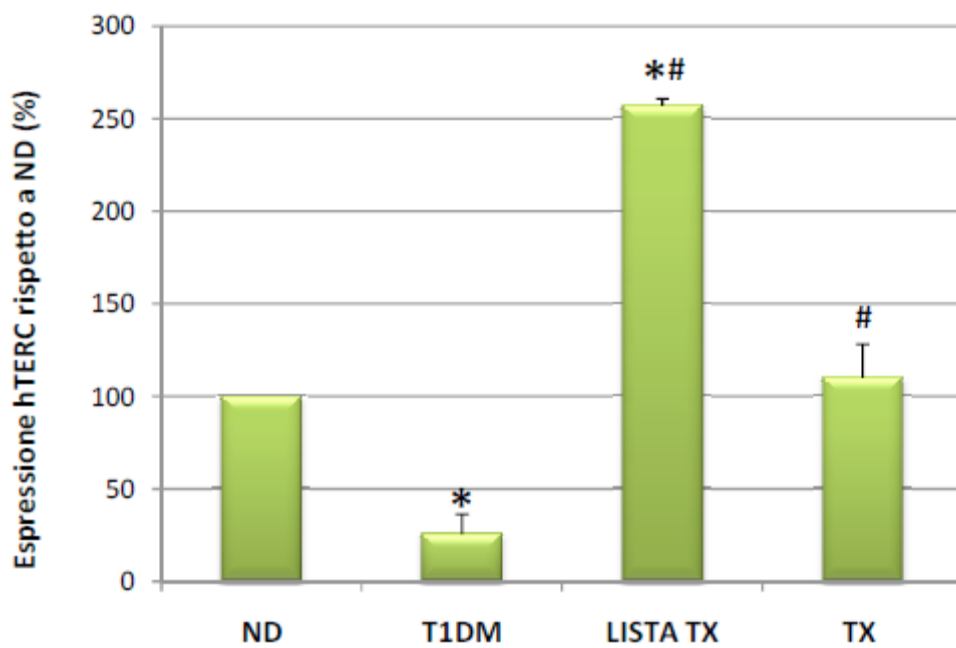


**Figura 28.** Espressione del gene per la subunità catalitica hTERT in ND e T2DM, espressa come variazione percentuale rispetto ai ND. L'espressione genica risulta significativamente aumentata nei pazienti diabetici (\*= $p < 0.05$  per il test t di Student).

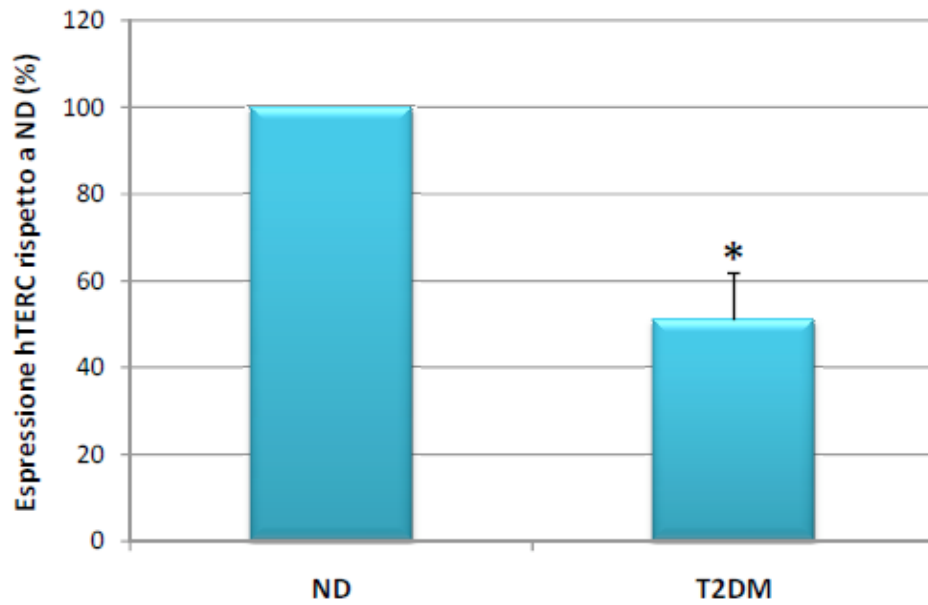


In merito all'espressione della subunità a RNA hTERC della telomerasi, essa è risultata significativamente ridotta nei soggetti affetti da T1DM non complicato rispetto ai ND, mentre abbiamo documentato un aumento significativo dell'espressione di hTERC nei soggetti LISTA TX sia rispetto ai ND che ai T1DM (\*= $p < 0.05$  per il test t di Student) (**Figura 29**). Sempre rispetto ai ND, l'espressione genica di hTERC è risultata significativamente ridotta anche in T2DM (\*= $p < 0.05$  per il test t di Student) (**Figura 30**).

**Figura 29.** Attività della telomerasi valutata come espressione di hTERC misurata su plasma di pazienti non-diabetici (ND), diabetici tipo 1 (T1DM), diabetici tipo 1 candidati al trapianto di pancreas (LISTA TX) e pazienti trapiantati (TX). Rispetto ai ND, l'espressione è significativamente ridotta in T1DM, significativamente aumentata nei pazienti LISTA TX, per ritornare a valori simili ai controlli ND nei TX (\*=  $p < 0.05$  vs ND per il test ANOVA con correzione di Bonferroni; #= $p < 0.001$  vs T1DM per il test di Student).



**Figura 30.** Attività della telomerasi valutata come espressione di hTERC misurata su plasma di pazienti non-diabetici (ND) e diabetici tipo 2 (T2DM). Rispetto ai ND, l'espressione genica è significativamente ridotta in T2DM (\*= $p < 0.05$  per il test t di Student).



### ***6.3 Normalizzazione della lunghezza telomerica per l'espressione della subunità catalitica hTERT***

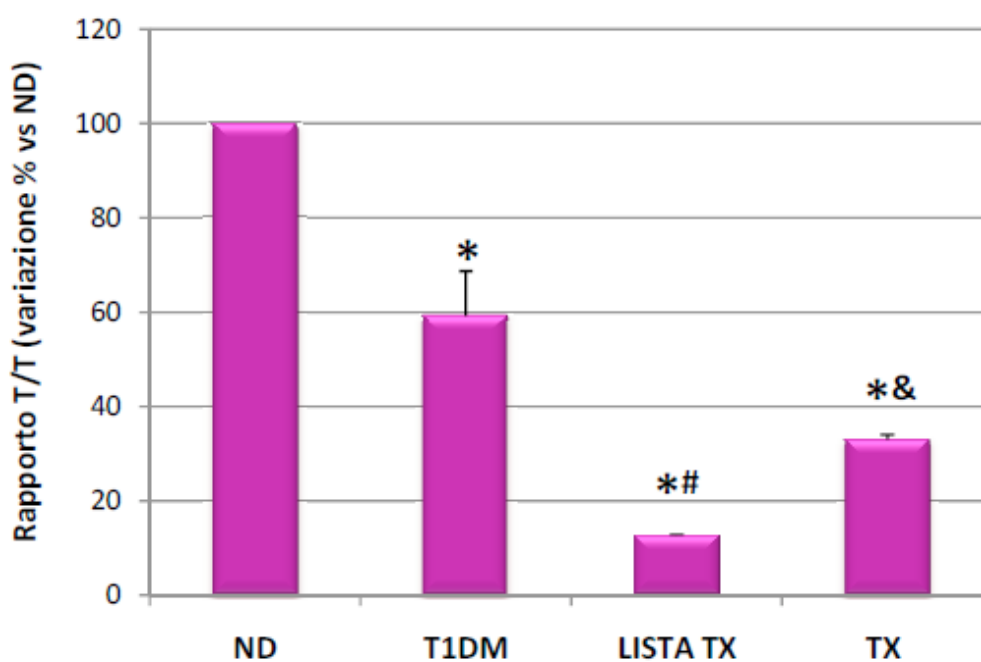
Data la marcata differenza di espressione della subunità catalitica hTERT riscontrata in tutti i gruppi rispetto ai controlli, è stata valutata la lunghezza telomerica, espressa come T/A, normalizzata per l'attività telomerasica (Rapporto T/T).

Tale rapporto è risultato, rispetto ai ND, significativamente ridotto nel T1DM, e ulteriormente ridotto, sempre in misura significativa (si rispetto ai ND che ai T1DM) nel gruppo LISTA TX.

Nel gruppo TX, a seguito del trapianto, si assiste ad un parziale recupero di tale rapporto (aumento significativo rispetto a LISTA TX) che tuttavia si mantiene significativamente ridotto rispetto ai ND (**Figura 31**).

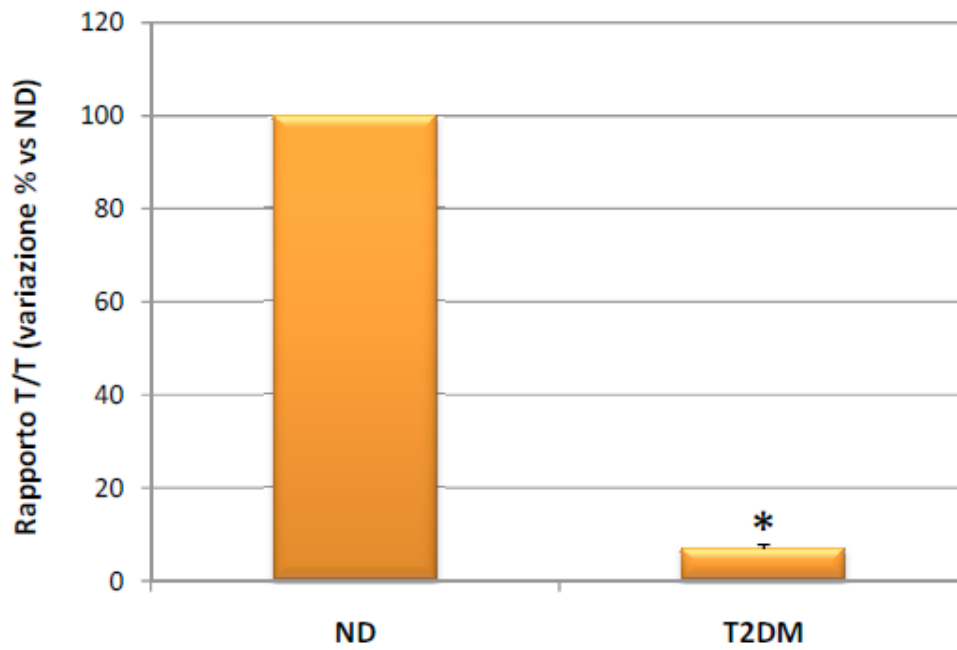
Una riduzione significativa del rapporto T/T è stata osservata anche nei T2DM (**Figura 32**).

**Figura 31.** Rapporto (T/T) in ND, T1DM, LISTA TX e TX, espresso come variazione percentuale rispetto ai ND. T/T si riduce significativamente in tutti i gruppi ( $*=p<0.05$  per il test ANOVA con correzione del Bonferroni), in modo più marcato nei LISTA TX dove risulta significativamente ridotto anche rispetto ai T1DM ( $\#=p<0.05$  vs T1DM per il test t di Student). Il trapianto tende a normalizzare questo dato che, pur rimanendo significativamente ridotto rispetto ai ND, aumenta in modo significativo rispetto ai LISTA TX ( $\&=p<0.001$  vs LISTA TX per il test t di Student).





**Figura 32.** Rapporto (T/T) in ND e T2DM, espresso come variazione percentuale rispetto ai ND. T/T si riduce significativamente nei T2DM rispetto ai ND (\*= $p < 0.05$  per il test t di Student).

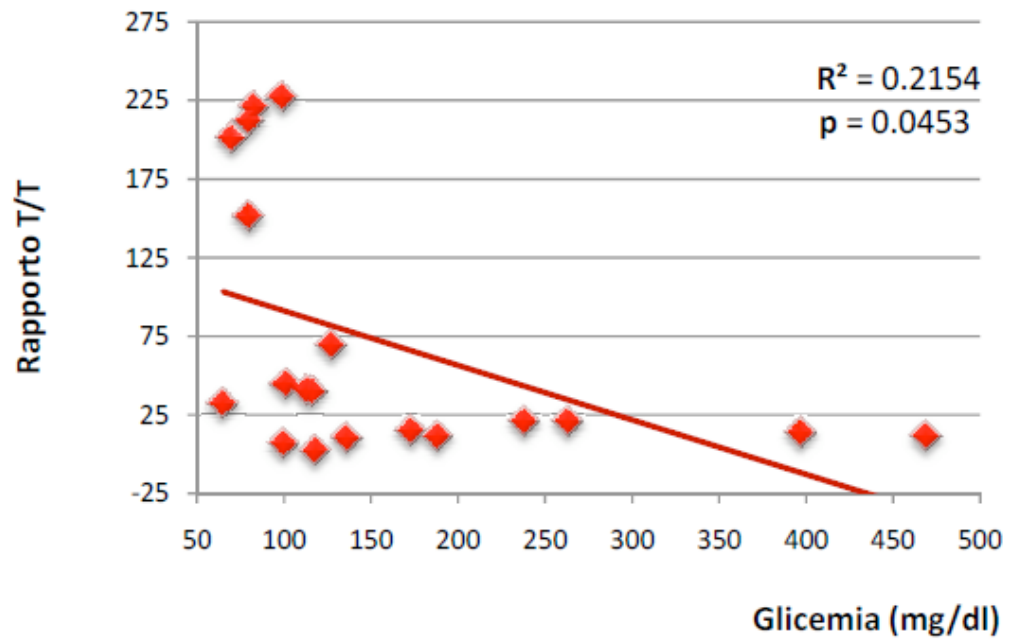


#### **6.4 Regressione semplice del rapporto T/T e dell'espressione di hTERT con glicemia, emoglobina glicata e C-peptide**

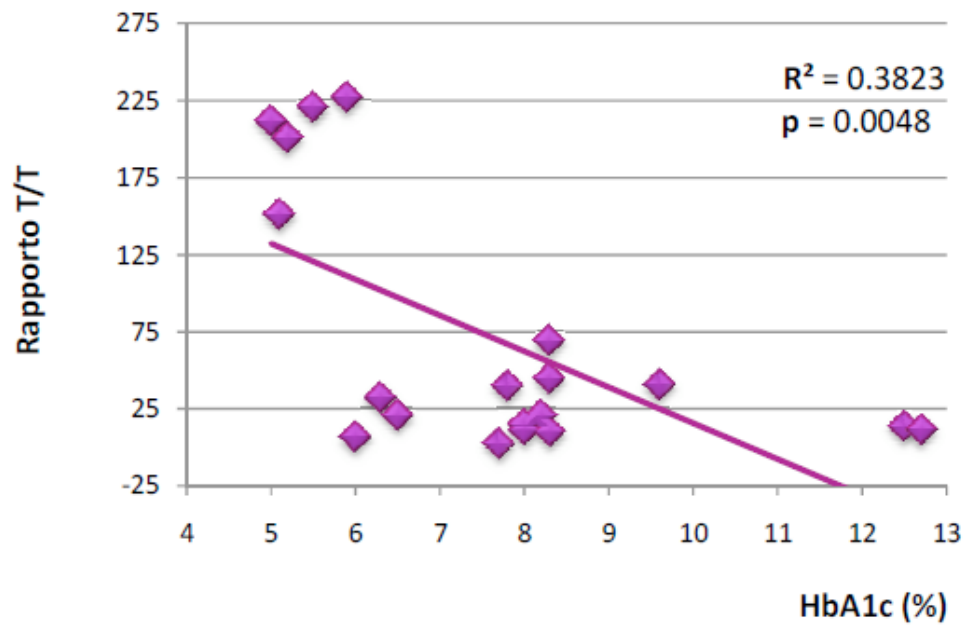
Secondo un modello di regressione semplice abbiamo osservato che la lunghezza dei telomeri normalizzata per l'attività della telomerasi (T/T) mostra una correlazione negativa con la glicemia e con l'emoglobina glicata, mentre una correlazione positiva con il C-peptide (**Figura 33 A-C**).

Invece, per quanto riguarda la subunità catalitica hTERT, abbiamo documentato una correlazione positiva con glicemia e con emoglobina glicata, ma nessun tipo di correlazione con il C-peptide (**Figura 33 D-E**).

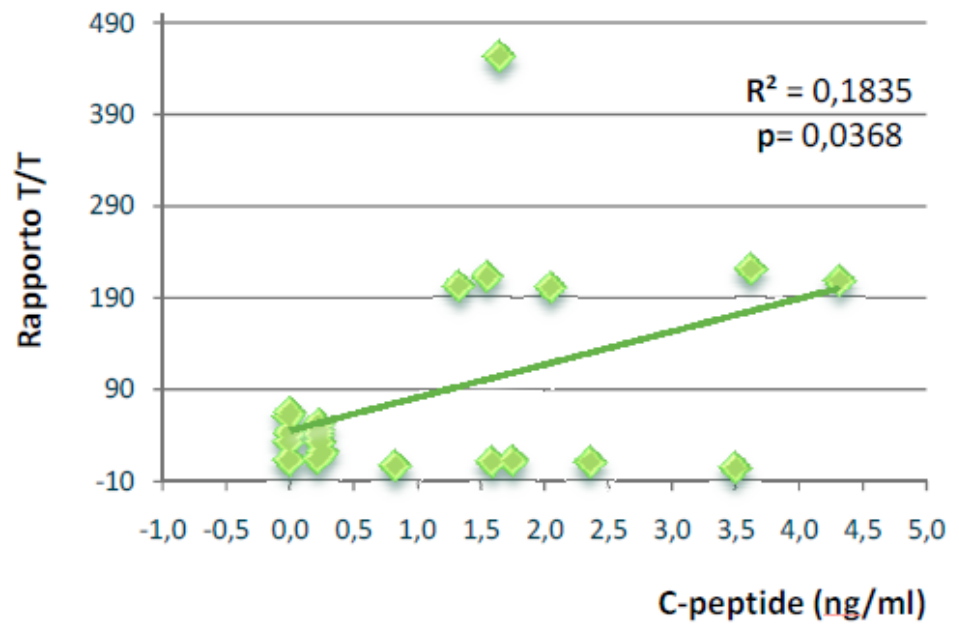
**Figura 33 A.** Regressione lineare semplice fra il rapporto T/T e la glicemia. T/T correla negativamente con la glicemia ( $R^2=0.2154$ ;  $p=0.0453$ )



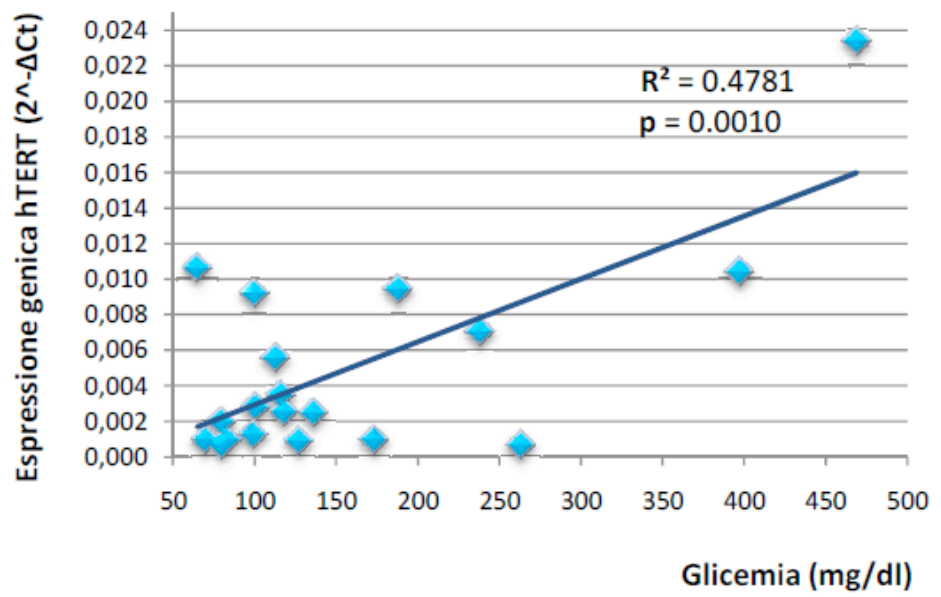
**Figura 33 B.** Regressione lineare semplice fra il rapporto T/T e l'emoglobina glicata (HbA1c). T/T correla negativamente con HbA1c ( $R^2=0.3823$ ;  $p=0.0048$ )



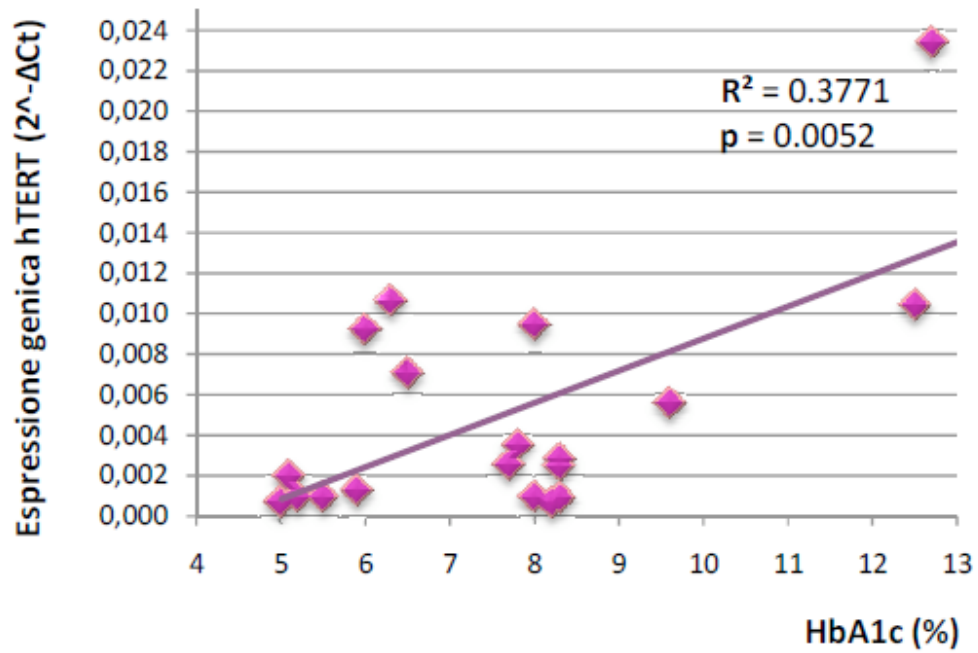
**Figura 33 C.** Regressione lineare semplice fra il rapporto T/T e il C-peptide. T/T correla positivamente con il C-peptide ( $R^2=0.1835$ ;  $p=0.0368$ )



**Figura 33 D.** Regressione lineare semplice fra l'espressione genica di hTERT e la glicemia. L'espressione di hTERT correla positivamente con la glicemia ( $R^2=0.4781$ ;  $p=0.0010$ ).



**Figura 33 E.** Regressione lineare semplice fra l'espressione genica di hTERT e l'emoglobina glicata (HbA1c). L'espressione di hTERT correla positivamente con HbA1c ( $R^2=0.3771$ ;  $p=0.0052$ ).



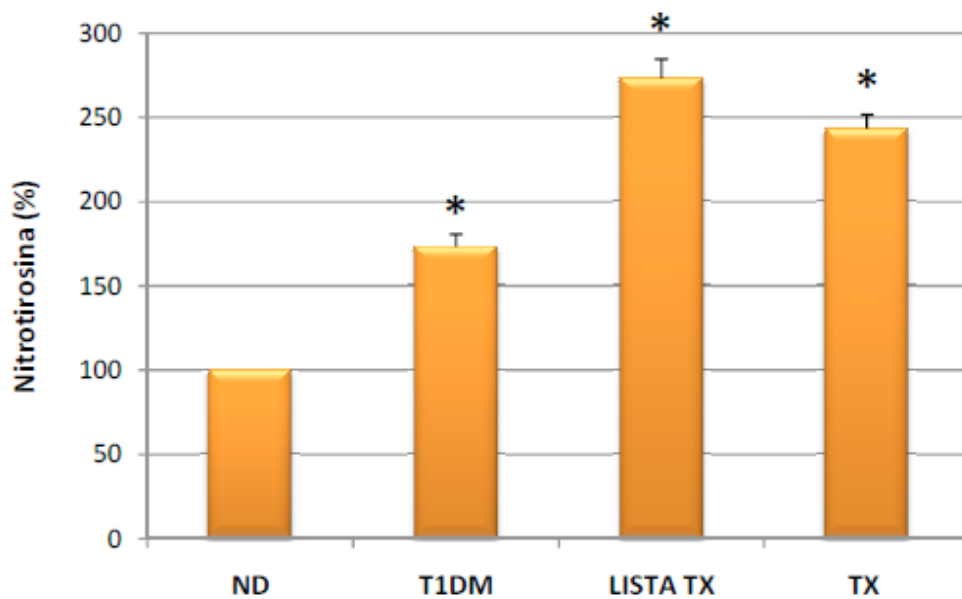
#### **6.4 Dosaggio della nitrotirosina**

Poiché i livelli di stress ossidativo sembrano incidere sull'attrito delle estremità telomeriche, è stato eseguito dosaggio della nitrotirosina quale marker di stress ossidativo sulla componente plasmatica dei campioni disponibili di ND, T1DM, T2DM, LISTA TX e TX, mediante saggio ELISA. I valori ottenuti sono stati espressi come variazione percentuale rispetto ai ND.

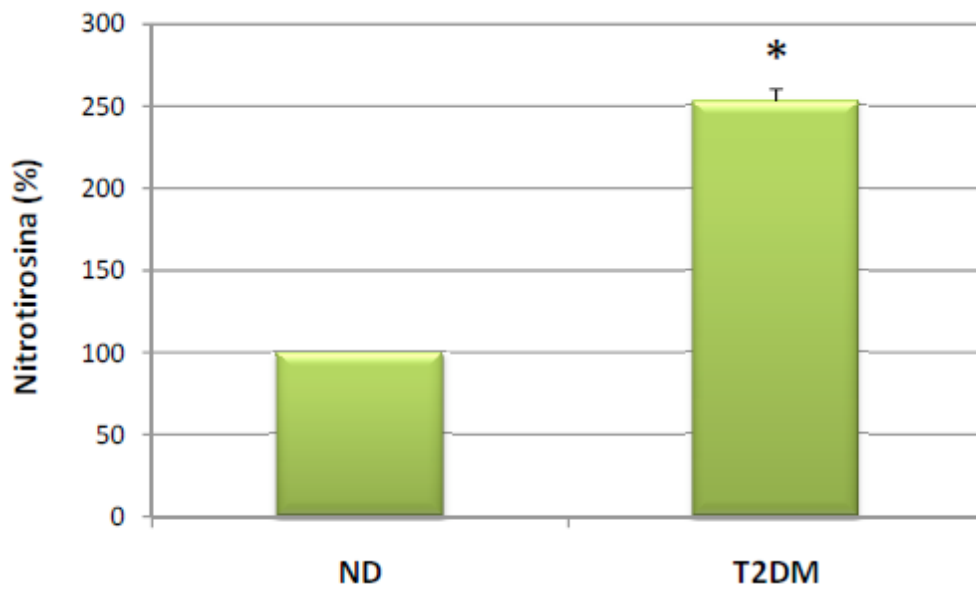
I livelli di nitrotirosina sono risultati significativamente più elevati in tutti i gruppi studiati rispetto a ND (**Figure 34-35**).



**Figura 34.** Concentrazione del marker di stress ossidativo nitrotirosina valutata su plasma di pazienti non-diabetici (ND), diabetici tipo 1 (T1DM), diabetici tipo 1 candidati al trapianto di pancreas (LISTA TX) e trapiantati (TX). Rispetto ai ND, lo stress ossidativo risulta significativamente aumentato in tutti i gruppi studiati (\*=  $p < 0.05$  per il test ANOVA con correzione di Bonferroni).

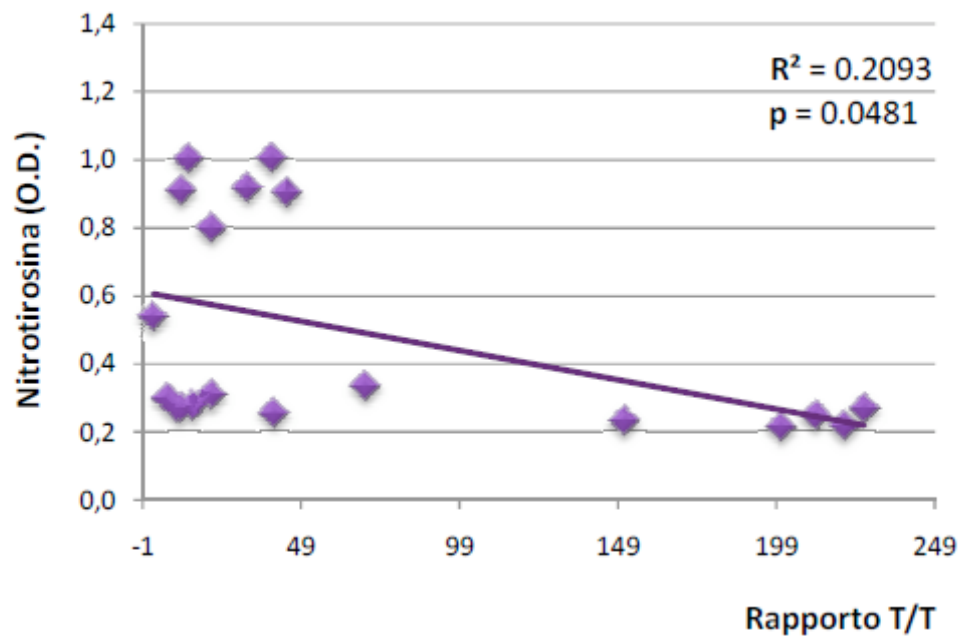


**Figura 35.** Concentrazione del marker di stress ossidativo nitrotirosina valutata su plasma di pazienti non-diabetici (ND) e diabetici tipo 2 (T2DM). Rispetto ai ND, lo stress ossidativo risulta significativamente aumentato nei pazienti diabetici (\*=  $p < 0.001$  per il test t di Student).

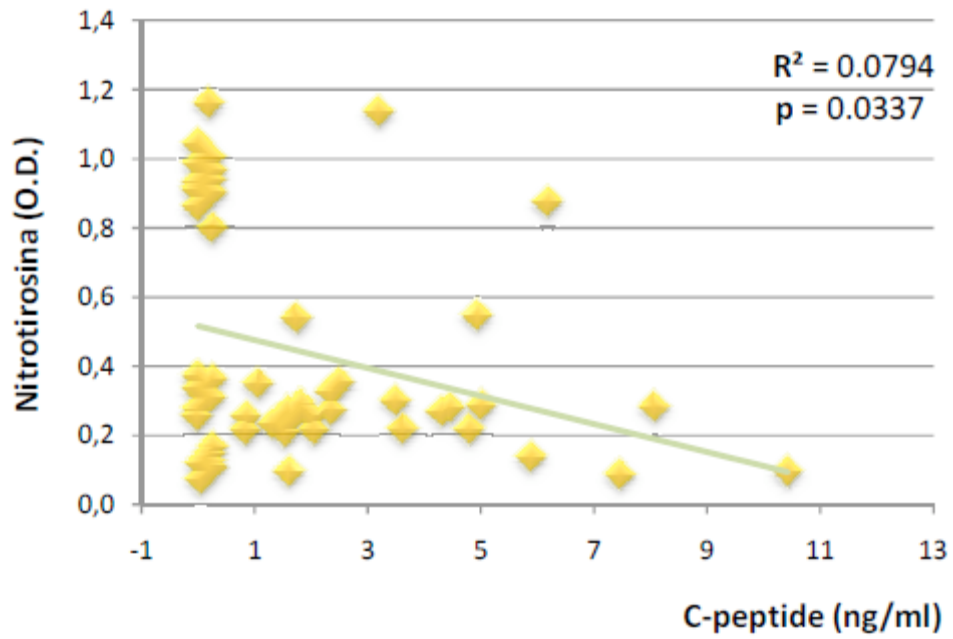


Utilizzando una regressione lineare semplice, la concentrazione di nitrotirosina è risultata correlata negativamente con il rapporto T/T, con il C peptide, mentre è emersa una correlazione positiva con l'espressione della subunità catalitica hTERT dell'enzima telomerasi (**Figure 36 A-C**).

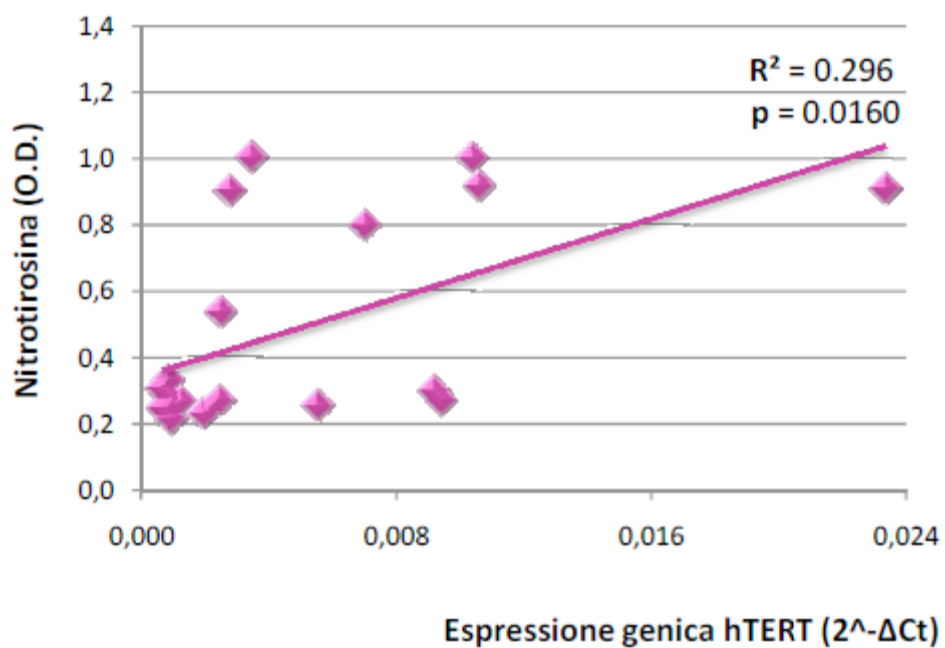
**Figura 36 A.** Regressione semplice tra concentrazione di nitrotirosina e rapporto T/T (lunghezza dei telomeri normalizzata per la subunità catalitica hTERT). La nitrotirosina correla negativamente con i telomeri.



**Figura 36 B.** Regressione semplice tra concentrazione di nitrotirosina e concentrazione plasmatica di C peptide. La nitrotirosina correla negativamente con il C peptide.



**Figura 36 C.** Regressione semplice tra concentrazione di nitrotirosina ed espressione della subunità catalitica hTERT. La nitrotirosina correla positivamente con hTERT.



## 7. DISCUSSIONE

Il nostro lavoro conferma la correlazione inversa già nota tra lunghezza dei telomeri ed indice di massa corporea (33;102). I meccanismi sottostanti a questa associazione sembrano risiedere nello stato pro-infiammatorio che si osserva nei casi di eccesso ponderale.

La correlazione significativa negativa è peraltro emersa anche con l'età dei soggetti, con il colesterolo totale ed LDL ed il C-peptide, mentre una correlazione positiva è stata dimostrata con i livelli di HDL e la durata del diabete (103).

Venendo ai risultati osservati sui parametri dell'assetto lipidico dei pazienti presi in esame, essi confermano in primo luogo la correlazione positiva tra i livelli di colesterolo HDL e la lunghezza dei telomeri. Questa associazione può essere riferibile all'azione anti-aterogena riconosciuta al colesterolo HDL, che probabilmente media i processi di invecchiamento a livello vascolare riducendo il danno di tipo ossidativo (104; 105). Viceversa, una correlazione negativa è emersa tra la lunghezza dei telomeri ed il colesterolo totale ed LDL, ossia quella quota di colesterolo caratterizzata per l'azione pro-infiammatoria e pro-aterogena.

Questi dati possono essere interpretati come indicativi dell'effetto determinato da un profilo lipidico ad alto rischio (elevato colesterolo LDL e ridotto colesterolo HDL) su di un marker riconosciuto di invecchiamento cellulare, associato al rischio di malattie cardiovascolari. Tuttavia, non è possibile escludere che il profilo lipidico stesso possa invece essere oggetto di una regolazione da parte del metabolismo dei telomeri.

Nell'analisi dei diversi gruppi, la lunghezza dei telomeri è risultata significativamente aumentata nei soggetti diabetici complicati in lista di trapianto, mentre i soggetti già trapiantati ed i soggetti con diabete mellito tipo 1 non complicato hanno mostrato una lunghezza telomerica simile a quella del gruppo di controllo sano.

Altri autori avevano osservato una tendenza dei soggetti con diabete mellito tipo 1 ad avere un attrito telomerico più lento rispetto ai controlli (48), e l'ipotesi che avevano avanzato valutava la possibilità che i trattamenti farmacologici di tipo terapeutico e le modifiche allo stile di vita adottate potessero rallentare il logoramento delle estremità telomeriche, eventualmente modificando anche l'attività telomerasica. In particolare, era stato osservato che i pazienti che assumevano il solo ACE-inibitore avevano telomeri più corti rispetto a quelli che assumevano sia beta-bloccanti che calcio-antagonisti.

Relativamente all'attività misurata sul plasma dei pazienti, essa è risultata significativamente aumentata sempre nel gruppo dei soggetti con T1DM, in particolare in coloro in lista per trapianto, mentre nei soggetti già sottoposti a trapianto non è emersa nessuna significativa differenza rispetto ai soggetti non diabetici.

Questi risultati possono essere interpretati come indicativi di un'alterazione nel metabolismo dei telomeri sicuramente presente nella malattia diabetica e correlata alla presenza o meno di complicanze, alterazione che viene in qualche misura "normalizzata" dalla sostituzione d'organo ottenuta con il trapianto. Infatti, sia per quanto concerne la lunghezza dei telomeri che per quanto riguarda l'attività telomerasica, i dati sui soggetti già sottoposti a trapianto tendono ai livelli documentati nei soggetti non diabetici.

E' plausibile ipotizzare che, nei pazienti con diabete mellito tipo 1, l'alterazione del metabolismo dei telomeri attivi un meccanismo compensatorio tale per cui l'attività telomerasica risulti aumentata, allo scopo di ostacolare l'eccessivo accorciamento dei telomeri.

Normalizzando poi i dati di lunghezza dei telomeri per l'attività telomerasica (rapporto T/T), è stato comunque documentato un accorciamento telomerico significativo nei soggetti diabetici rispetto ai controlli sani, in particolare nei candidati al trapianto.



L'analisi su questi dati sembra complessivamente supportare l'ipotesi che l'indiscutibile alterazione del metabolismo telomerico presente nel diabete risenta favorevolmente del trapianto, progredendo nella direzione di un ripristino delle condizioni presenti nel soggetto non diabetico.

Inoltre, il rapporto T/T è risultato correlare negativamente con glicemia ed emoglobina glicata, a conferma di un dato presente in letteratura (39) che supporta il ruolo dell'ottenimento del buon compenso glicometabolico nel controllo dell'accorciamento dei telomeri.

Inedito è invece il dato emerso di correlazione positiva tra rapporto T/T e concentrazione plasmatica di C-peptide.

In merito ai livelli di stress ossidativo, esso è risultato significativamente aumentato in tutti i soggetti studiati rispetto ai controlli sani, indipendentemente dal tipo di diabete (sebbene nel diabete tipo 1 i livelli siano risultati più contenuti che nel tipo 2) e del ricevimento o meno della procedura trapiantologica; tuttavia, nei soggetti in lista di trapianto così come in quelli già trapiantati, i livelli di nitrotirosina sono risultati significativamente più alti che nei soggetti con diabete tipo 1 non complicato. E' possibile che la presenza di complicanze e comorbidità, e quindi la gravità della malattia, correlino con uno stato pro-infiammatorio

più avanzato, che la sostituzione d'organo non è in grado di correggere,  
per lo meno nei tempi da noi osservati.

## **8. CONCLUSIONI**

I dati ottenuti permettono di concludere che, se come verosimilmente appare, i telomeri rivestono un ruolo nell'ambito della fisiopatologia del diabete mellito, il trapianto di pancreas, sia esso isolato od associato al rene si associa alla tendenza verso la normalizzazione di questi parametri di senescenza cellulare.

Tuttavia, il significato di queste alterazioni, nell'ambito dell'inquadramento e del trattamento della malattia, resta ancora da definire.

L'associazione tra lunghezza dei telomeri, attività telomerasica e livelli di stress ossidativo invece sembra essere solo parziale benché presente, per cui possiamo ipotizzare l'intervento di altri fattori determinanti la dinamica dei telomeri nell'ambito del diabete, che ulteriori studi dovranno investigare.

## 9. BIBLIOGRAFIA

1. Blackburn EH, Gall JG. A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in *Tetrahymena*. *Journal of Molecular Biology* 1978; 120: 33-53
2. Szostack JW, Blackburn EH. Cloning yeast telomeres on linear plasmid vectors. *Cell* 1982;29:245-255
3. Greider CW, Blackburn EH. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts. *Cell* 1985;43:405-413
4. McClintock B. The stability of broken ends of chromosomes in *Zea mays*. *Genetics* 1941; 26: 234-282
5. Haber JE, Thorburn PC. Healing of broken linear dicentric chromosome in yeast. *Genetics* 1984; 106: 207-226
6. De Lange T, Shiue L, Myers RM, et al Structure and variability of human chromosome ends. *Mol cell. Biol* 1990; 10: 518-527
7. Chatziantonou V. Telomerase: biological function and potential role in cancer management. *Pathol. Oncology Res.* 2001;7: 161-170
8. Hayflick L. the limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp cell Res* 1965; 37: 614-636
9. Palm W, de Lange T. How shelterin protects mammalian telomeres. *Annu Rev Genet* 2008;42: 301-334
10. De Lange T. Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes Dev.* 2005;19:2100-2110.
11. Blackburn EH, Switching and signaling at the telomere. *Cell* 2001; 106: 661-673.
12. De Lange T. Protection of mammalian telomeres. *Oncogene* 2002; 21:621-627.

- 13.** Wong JM, Collins K. Telomere maintenance and disease. *Lancet* 2003;362:983-988
- 14.** Harrington L, Robinson MO. Telomere dysfunction multiple paths to the same end. *Oncogene* 2002; 21:592-597
- 15.** Nawrot TS, Staessen JA, Gardner JP, Aviv A. Telomere length and possible link to X chromosome. *Lancet* 2004;363:507-510
- 16.** Slagboom PE, Droog S, Boomsma DI. Genetic determination of telomere length in humans: a twin study of three age groups. *Am J Hum Genet* 1994; 55: 876-882
- 17.** Epel ES, Blackburn EH, Lin J et al. Accelerated telomere shortening in response to life stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:17312-17315
- 18.** Cherif H, Tarry JL, Ozanne SE, Hales CN. Ageing and telomeres: a study into organ- and gender specific telomere shortening. *Nucleic Acid Res* 2003; 31: 1576-1583
- 19.** Calado RT, Young NS. Telomere disease. *NEJM* 2009: 2353-2365
- 20.** Greider CW, Blackburn EH. The telomere terminal transferase of *Tetrahymena* is a ribonucleoprotein enzyme with two kinds of primer specificity. *Cell* 1987;51(6):887-898
- 21.** Morin GB. The human telomerase terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats. *Cell*, 59:521-529
- 22.** Harley CB, Villeponteau B. telomeres and telomerase in aging and cancer. *Curr Opin Genet Dev* 1995; 5:249-255
- 23.** Levy MZ, Allsopp RC, Futcher AB, et al. Telomere end replication problem and cell aging. *J Mol Biol.* 1992;225:951-960
- 24.** Olovnikov AM. A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides

and biological significance of the phenomenon. *J theor Biol* 1973; 41:181-190

**25.** Wyatt HD, West SC, Beattie TL. InTERTpreting telomerase structure and function. *Nucleid Acid Res.* 2010 Sep 1;38(17): 5609-5622. Review

**26.** Chang JT, Lu YC, Chen YJ, et al. hTERT phosphorylation by PKC is essential for telomerase holoprotein integrity and enzyme activity in head neck cancer cells. *Br J Cancer.* 2006 Mar 27;94(6):870-878

**27.** Kang SS, Kwon T, Kwon DY, et al. Akt protein kinase enhances human telomerase activity through phosphorylation of telomerase reverse transcriptase subunit. *J Biol Chem.* 1999 May 7;274(19):13085-13090

**28.** Harley CB, Futcher AB, Greider CW. Telomeres shorten during ageing of human fibroblast. *Nature* 1990; 345: 458-460

**29.** Hiyama K, Hirai y, Kyoizumi S et al. Activation of telomerase in human lymphocytes and hemopoietic progenitor cells. *J Immunol* 1995; 155:3711-3715

**30.** Mondello C, Petropoulou C, Monti D, et al. Telomere length in fibroblasts and blood cells from healthy centenarians. *Exp Cell Res* 1999; 248:234-242

**31.** Blasco MA, Funk W, Villeponteau B and Greider CW. Functional characterization and developmental regulation of mouse telomerase RNA. *Science* 1995; 269: 1267–1270

**32.** Adaikalakoteswari A, Balasubramanyam M, Ravikumar R, Deepa R, Mohan V. association of telomere shortening with impaired glucose tolerance and diabetic macroangiopathy *Atherosclerosis* 2007; 195: 83-89

- 33.** Gardner JP, Li S, Srinivasan SR et al. Rise in insulin resistance is associated with escalated telomere attrition. *Circulation* 2005; 111: 2171-2177
- 34.** Demissie S, Levy D, Benjamin EJ et al. Insulin resistance, oxidative stress, hypertension, and leukocyte telomere length in men from the Framingham Heart Study. *Aging Cell* 2006;5: 325-330
- 35.** Satoh M, Ishikawa Y, Takahashi Y, et al. Association between oxidative DNA damage and telomere shortening in circulating endothelial progenitor cells obtained from metabolic syndrome patients with coronary heart disease. *Atherosclerosis* 2008; 198: 347-353
- 36.** Sampson MJ, Winterbone MS, Hughes JC et al. Monocyte telomere shortening and oxidative DNA damage in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2006; 29: 283–289
- 37.** Adaikalakoteswari A, Balasubramanyam M, Mohan V. Telomere shortening occurs in Asian Indian Type 2 diabetic patients. *Diabet Med* 2005; 22: 1151–1156
- 38.** Albarran-Tamayo F, Murillo Ortiz B, Arenas-Aranda D et al. Association of the telomere length in patients with type 2 diabetes mellitus (DM2) with age since diagnosis and stress. The Endocrine Society's 89th Annual Meeting. Toronto, Canada, 2007
- 39.** Uziel O, Singer JA, Danicek V et al. Telomere dynamics in arteries and mononuclear cells of diabetic patients: effect of diabetes and of glycemic control. *Exp Gerontol* 2007; 42: 971–978
- 40.** Del Prato S, Bianchi C, Marchetti P. beta-cell function and anti-diabetic pharmacotherapy. *Diabetes Metab Res Rev* 2007; 23(7): 518-527
- 41.** Porte D, Kahn SE. Jr. Beta-cell dysfunction and failure in type 2 diabetes: potential mechanisms. *Diabetes* 2001; 50 (Suppl 1): S160–S163

- 42.** Lupi R, Del Prato S. cell apoptosis in type 2 diabetes: quantitative and functional consequences. *Diabetes and Metabolism* 2008; 34: 856-864
- 43.** Sakuraba H, Mizukami H, Yagihashi N et al. Reduced beta-cell mass and expression of oxidative stress-related DNA damage in the islet of Japanese Type II diabetic patients. *Diabetologia* 2002; 45: 85–96
- 44.** Halvorsen TL, Beattie GM, Lopez AD et al. Accelerated telomere shortening and senescence in human pancreatic islet cells stimulated to divide in vitro. *J Endocrinol* 2000; 166: 103–109
- 45.** Tarry-Adkins JL, Chen JH, Smith NS et al. Poor maternal nutrition followed by accelerated postnatal growth leads to telomere shortening and increased markers of cell senescence in rat islets. *FASEB J* 2009; 23: 1521–1528
- 46.** Tentolouris N, Nzietchueng R, Cattan V et al. white blood cell telomere length is shorter in males with type 2 diabetes and microalbuminuria. *Diabetes Care* 2007; 30:2909-2915
- 47.** Verzola D, Gandolfo MT, Gaetani G et al. accelerated senescence in the kidney of patients with type 2 diabetic nephropathy. *Am J Physiol* 2008; 295:F1563-1573
- 48.** Fyhrquist F, Tiitu A, Saijonmaa O et al. Telomere length and progression of diabetic nephropathy in patients with type 1 diabetes. *J Internal Medicine* 2010;267:278-286
- 49.** Sampson MJ, Hughes DA. Chromosomal telomere attrition as a mechanism for the increase risk of epithelial cancers and senescent phenotypes in type 2 diabetes. *Diabetologia* 2006;49:1726-1731
- 50.** Salpea KD, Humphries SE. Telomere length in atherosclerosis and diabetes. *Atherosclerosis* 2010;209:35-38



- 51.** Olivieri F, Lorenzi M, Antonicelli R et al. leucocyte telomere shortening in elderly type 2 DM patients with previous myocardial infarction. *Atherosclerosis* 2009;206: 588-593
- 52.** Astrup AS, Tarnow L, Jorsal A et al. telomere length predicts all-cause mortality in patients with type 1 diabetes. *Diabetologia* 2010; 53: 45-48
- 53.** Jones DP, Go YM. Redox compartmentalization and cellular stress. *Diabetes Obes Metab* 2010;12:116-125 Review
- 54.** Mancarella R, Del Guerra S, Masini M et al. Beneficial effect of the nonpeptidyl low molecular weight radical scavenger IAC on cultured human islet function. *Cell Transplant.* 2008; 17:1271-1276
- 55.** Del Guerra S, Lupi R, Marselli L et al. Functional and molecular defects of pancreatic islets in human type 2 diabetes. *Diabetes* 2005; 54: 727-735
- 56.** Jonas JC, Bensellam M, Duprez J et al. Glucose regulation of islet stress responses and beta-cell failure in type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab.* 2009; 11: 65-81
- 57.** Urso C, Caimi G. Oxidative stress and endothelial dysfunction. *Minerva Med.* 2011; 102:59-77
- 58.** Freise CE, Narumi S, Stock PG et al. Simultaneous pancreas-kidney transplantation: an overview of indications, complications and outcomes. *West J Med.* 1999;170:11-18. Review
- 59.** Richter A, Lerner S, Schroppel B. Current state of combined kidney and pancreas transplantation. *Blood Purif* 2011;31:96-101
- 60.** Pelegri C, Rodriguez-Palmero M, Morante MP, et al. comparison of four lymphocyte isolation methods applied to rodent T cell subpopulations and b cells. *J Immunol Methods* 1995 Dec 1; 187(2):26: 265-271
- 61.** Palmer JP. C-peptide in the natural history of type 1 diabetes. *Diabetes metab res Rev.* 2009 may; 25(4):325-328

- 62.** Brandenburg D. History and diagnostic significance of C peptide. *Exp Diabetes Res* 2008; 2008: 576862 Review
- 63.** Winter WE, Schatz DA. Autoimmune markers in diabetes. *Clin chem* 2011 Feb;57(2):168-175. Review
- 64.** Siljander HT, Simell S, Hekkala A, et al. Predictive characteristics of diabetes-associated autoantibodies among children with HLA conferred disease susceptibility in the general population. *Diabetes* 2009, 58(12):2835-2842.92
- 65.** Bonifacio E, Ziegler AG. Advances in the prediction and natural history of type 1 diabetes. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2010 Sep 39(3):513-525. Review
- 66.** Sacks DB. Carbohydrates. In: Burtis Ca, Ashwood ER, eds. *Tietz textbook of clinical chemistry*, 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders; 1999. P 790-796
- 67.** Knudson PE et al. Carbohydrates. In: Henry JB, ed *Clinical diagnosis and Management by Laboratory Methods*. 20<sup>th</sup> ed. Philadelphia, PA: WB Saunders Co.; 2001: 214-218
- 68.** Kunst A, Draeger B, Ziegenhorn J. In: Bergmeyer. *Methods of enzymatic analysis*, 3<sup>o</sup> ed. Vol. VI, Metabolites 1: Carbohydrates. 1984:163-172
- 69.** Tietz NW. *Clinical Guide to laboratory test*, 4<sup>o</sup> ed. Philadelphia. WB Saunders Company. 2006:444-451
- 70.** Lee JM, Choudhury RP. Atherosclerosis regression and high-density lipoproteins. *Expert Rev Card, Reardon CA.* HDL apolipoprotein-related peptides in the treatment of atherosclerosis and other inflammatory disorders. *Curr Pharm Des* 2010;16(28):3173-3184. Review
- 71.** Greiling H, Gressner AM. Eds. *Lehrbuch der Klinischen Chemie und pathobiochemie*, 3<sup>o</sup> ed. Stuttgart/New York: Schattauer, 1995

72. Liebmann C. Ber Dtsch chem. Ges 1885;18:1803
73. Nauk M, Wiebe D, Warnik G. measurement of high-Density-Lipoprotein Cholesterol. 221-244. In: Handbook of lipoprotein Testing (eds. Rifai, Wornick and Dominiczak) 2° ed.
74. Sugiuchi H, Uji Y, Okabe H, Irie T, et al. Direct measurement of high-density lipoprotein cholesterol in serum with polyethylene glycol-modified enzymes and sulfate alpha-cyclodextrin Clin Chem 1995;41:717-723
75. Hatch FT, Lees RS. Practical methods for plasma lipoprotein analysis. Adv Lipid Res 1968;6:1-68
76. Fredrickson DS, Levy Ri, Lees RS. Fat transport in lipoproteins – an integrated approach to mechanism and disorders. N Engl J Med. 1967 Feb 2; 276(5):273-281
77. Bucolo G, David H. quantitative determination of serum triglycerides by the use of enzymes. Clin chem. 1973 May;19(5):476-482
78. Wahlefeld AW, Bergmeyer HU, eds. Methods of Enzymatic Analysis 2° ed. inglese. New york, NY: Academic Press Inc, 1974:1831
79. Rock RC, Walker WG, Jennings CD. Nitrogen metabolites and renal function. In: Tietz NW, ed. Fundamentals of Clinical Chemistry. 3° ed. Philadelphia: WB Saunders 1987; 669-704
80. Botev R, Mallié JP, Wetzels JF, et al. the Clinician end Estimation of Glomerular Filtration Rate by Creatinine-based formulas: Current limitations and Quo vadis. Clin J Am Soc Nephrol. 2011 Mar 31
81. Fabiny DL, Ertingshausen G. Automated Reaction-Rate Method for Determination of serum creatinine with the CentrifChem. Clin Chem 1971;17:696-700

- 82.** Bartels H, Bohmer M. Micro-determination of creatinine. *Clin Chim Acta* 1971;32:81-85
- 83.** Tiffany TO, Jansen JM, Burtis CA, et al. Enzymatic Kinetic Rate and End-Point Analyses of Substrates, by use of a GeMSAEC Fast Analyser. *Clin Chem* 1980;26:816-826]
- 84.** Grant GH, Silverman LM, Christenson RH. Aminoacids and proteins. In: tietz N.W. ed. *Fundamentals of Clinical Chemistry*, 3<sup>o</sup> Philadelphia, Pa: WB Saunders, 1987:328-330
- 85.** Phillipou G, James SK, Seaborn CJ, et al. Screening for microalbuminuria by use of a rapid, low-cost colorimetric assay. *Clin Chem*.1989 Mar;35(3)456-458
- 86.** Doumas BT, Watson WA, Biggs HG. Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromocresol green. *Clin Chim Acta* 1971;31:87-96
- 87.** Little RR, Rohlfing CL, Sacks DB. National Glycohemoglobin Standardization Program (NGSP) Steering Committee. Status of haemoglobin A1c measurement and goals for improvement: from chaos to order for improving diabetes care. *Clin Chem* 2011 Feb;57(2):205-214
- 88.** Nitin S. HbA1c and factors other than diabetes mellitus affecting it. *Singapore Med J* 2010 Aug;51(8):616-622
- 89.** Cheng P, Neugaard B, Foulis P, et al. Hemoglobin a1c as a predictor of incident diabetes. *Diabetes Care*. 2011 Mar; 34(3):610-615
- 90.** Hosseini SS, Bibler I, Charles MA. The narrow therapeutic window of glycated hemoglobin and assay variability. *Metabolism* 1999. Dec;48(12):1498-1502
- 91.** Kleines M, Schellenberg K, Ritter K. Efficient extration of viral DNA and viral RNA by the Chemagic viral DNA/RNA kit allows sensitive detection of citomegalovirus, hepatitis B virus, and

hepatitis G virus by PCR. *J Clin Microbiol.* 2003 Nov;41(11): 5273-5276

**92.** Livak KJ (1997) PE Applied Biosystems. Livak KJ, Schmitthen TD (2001) *Methods* 25(4),402-408

**93.** Cawthon RM. Telomere length measurement by a novel monochrome multiplex quantitative PCR method. *Nucleic Acids Res.* 2009 Feb;37(3):e21

**94.** Cawthon RM. Telomere measurement by quantitative PCR. *Nucleic Acids Research* 2002(10) e47

**95.** O'Callaghan NJ, Fenech M. A quantitative PRC method for measuring absolute telomere length. *Biol Proced Online* 2011 Jan 31;13:3.

**96.** Gil ME, Coetzer TL. Real-time quantitative PCR of telomere length. *Mol Biotechnol.* 2004 Jun; 27(2):169-72.

**97.** Rajtak U, Leonard N, Bolton D, et al . a real-Time Multiplex SYBR Green I Polymerase Chain Reaction Assay for rapid screening of Salmonella Serotypes prevalent in the European Union. *Foodborne Pathog Dis.* 2011 Mar 7

**98.** Chomic A, Winder L, Armstrong KF, et al. Detection and discrimination of members of the family Luteoviridae by real-time PCT and SYBR®GreenER™melting curve analysis. *J Virol Methods* 2011 Jan;171(1):46-52

**99.** Ulaner GA, Hu JF, Vu TH et al. telomerase activity in human development is regulated by human telomerase reverse transcriptase (hTERT) transcription and by alternate splicing of hTERT transcripts. *Cancer Res.* 1998;58:4168-4172

**100.** Ulaner GA, Hu JF, Vu TH et al. Tissue-specific alternate splicing of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) influences telomere lengths during human development. *Int J Cancer.* 2001;91:644-649

- 101.** Novelli M, D'Aleo V, Lupi R, et al. Reduction of oxidative stress by a new low-molecular-weight antioxidant improves metabolic alterations in a non obese mouse diabetes model. *Transl Res.* 2010 Apr;155(4):164-165
- 102.** Kim S, Parks CG, DeRoo LA, Chen H, Taylor JA, Cawthon RM, Sandler DP. Obesity and weight gain in adulthood and telomere length. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009;18(3):816-820
- 103.** Takubo K, Aida J, Izumiyama-Shimomura N et al. Changes of telomere length with aging. *Geriatr Gerontol Int* 2010; Suppl 1: S197-206 Review
- 104.** Walter M. Interrelationships among HDL metabolism, aging, and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009;29:1244-1250
- 105.** Chen W, Gardner JP, Kimura M, et al. Leukocyte telomere length is associated with HDL cholesterol levels: The Bogalusa heart study. *Atherosclerosis.* 2009;205:620-625