



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI
SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE BIOMEDICHE

Direttore della Scuola: Prof. Franca Deriu
**INDIRIZZO IN FISIOLOGIA, FARMACOLOGIA, MORFOLOGIA E
FISIOPATOLOGIA DEL SISTEMA NERVOSO**

Responsabile di Indirizzo: Prof. Eusebio Tolu

XXVI CICLO

**L' ASSE IPOTALAMO-IPOFISI GH-IGF-1 NEL DIABETE MELLITO
DI TIPO 2 E NEL LADA: RUOLO DELL' ADIPONECTINA**

Direttore:

Prof. Franca Deriu

Tutor:

Dott. Giuseppe Fanciulli

Tesi di dottorato di:

Dott. Alessandro Palmerio Delitala

La presente tesi è stata prodotta nell'ambito della scuola di dottorato in Scienze Biomediche dell'Università degli Studi di Sassari, a.a. 2010/2011 – XXVI ciclo, con il supporto di una borsa di

studio finanziata con le risorse del P.O.R. SARDEGNA F.S.E. 2007-2013 - Obiettivo competitività regionale e occupazione, Asse IV Capitale umano, Linea di Attività I.3.1.

Introduzione

L' ormone della crescita

L' ormone della crescita (growth hormone, GH) è secreto dalle cellule somatotropiche le quali sono localizzate prevalentemente nelle parti laterali della ipofisi e rappresentano circa il 35-45% delle cellule della ghiandola. Le cellule somatotropiche hanno aspetto ovoidale e contengono abbondanti granuli secretori ed apparato del Golgi particolarmente sviluppato. Il contenuto ipofisario totale di GH è compreso tra 5 e 15 mg (1).

La sua sintesi è regolata dal locus presente nel braccio lungo del cromosoma 17q22-24 ed è costituito da circa 66 Kilobasi. Nel locus sono rappresentati 5 geni, ciascuno costituito da 5 esoni separati da 5 introni, i quali codificano le varie forme di GH e somatomammotropina corionica (CS) (2):

1. hGH-N è codificato da GH1 (growth hormone 1)
2. hCS-1 è codificato da CSHL 1 (somatomammotropina corionica-like 1)
3. hCSA-A è codificato da CSH1 (somatomammotropina corionica 1)
4. hGH-V è codificato da GH2 (growth hormone 2)
5. hCSA-B è codificato da CSH2 (somatomammotropina corionica 2).

I geni hCSA, hCSA-B ed il gene hCS-1 sono espressi nella placenta (3). Anche il gene hGH-V è espresso nel sinciziotrofoblasto placentare: questo gene codifica un proteina di 22 Kilodalton (kDa) che è rilevabile nella circolazione materna intorno al 4-5 mese di gestazione ma diviene indosabile immediatamente dopo il parto. Le elevate concentrazioni materne di hGH-V si accompagnano ad una riduzione della secrezione ipofisaria di hGH-N suggerendo la presenza di un meccanismo di feed-back negativo esercitato dal GH placentare sul sistema ipotalamo-ipofisario.

Il gene GH1 è selettivamente trascritto nelle cellule somatotrope dell'ipofisi (4). Codifica per una singola catena di 191 aminoacidi (22 kDa) la quale è sintetizzata e secreta dalla adenoipofisi. Questo peptide di 22 kDa costituisce la componente maggiore (75%) del GH secreto dalla ghiandola e circolante nel plasma. Gli aminoacidi 32-46 di questa molecola vengono eliminati per "splicing" alternativo del gene generando il GH 20 kDa. Questo composto ha una emivita maggiore della molecola 22 kDa e costituisce circa il 10% del GH ipofisario. Altre componenti minori del GH plasmatici sono una forma 22 kDa acetilata e due molecole desaminate.

Controllo neuroendocrino della secrezione del GH

La secrezione del GH è di tipo pulsatile (5). Normalmente le concentrazioni plasmatiche dell'ormone, valutate con prelievi seriati ogni 10 minuti, risultano estremamente basse, spesso ai limiti od al disotto della sensibilità delle metodiche comunemente utilizzate nella pratica clinica (dosaggi RIA, IRMA, chemiluminescenza), per elevarsi in picchi secretori spontanei talvolta estremamente elevati (15-40 ng/ml nel sangue periferico). Questa caratteristica secretoria del GH deriva da un bilancio netto della interazione tra la stimolazione indotta dal GH releasing hormone (GHRH) e la inibizione causata dalla somatostatina (SST), ambedue effetti esercitati direttamente sulle cellule somatotrope ipofisarie (5). Questi meccanismi di regolazione secretoria del GH (la SST ed il GHRH costituiscono i terminali della neuroregolazione dell'ormone) sono inoltre modulati da numerose influenze metaboliche (le concentrazioni di glucosio nel sangue) e nervose (neuropeptidi, neurotrasmettitori, neuromodulatori etc.) le quali modificano, stimolando e/o inibendo la secrezione ipotalamica (e la dismissione nel circolo portale ipofisario) della somatostatina e del GHRH.

La secrezione del GH è infine regolata da un meccanismo di feedback negativo esercitato dalla somatomedina C (insulin-like growth factor-1, IGF-1) e dallo stesso ormone sia a livello ipotalamico che ipofisario (Figura 1).

Somatostatina. La SST, un peptide presente sia nel tubo digerente che nel sistema nervoso centrale, è un potente agente inibitorio della secrezione di GH, sia spontanea che stimolata, ed antagonizza l'effetto mitogeno del GHRH sulle cellule somatotropiniche. Questo peptide ciclico di 14 aminoacidi (SST-14), sintetizzato nei nuclei parvicellulari, venne identificato nel 1973 (6). Successivamente venne isolata una seconda forma di SST, la SST-28, anch'essa derivante da una comune molecola progenitrice. La SST-28 è maggiormente rappresentata nel tubo digerente, mentre la SST-14 è maggiormente rappresentata nell'ipotalamo (7). Attualmente sono stati identificati e clonati 5 sottotipi di recettore per la SST (8). Tutti questi sottotipi recettoriali sono rappresentati nell'ipofisi, ma la densità maggiore, nelle cellule somatotropiniche, è costituita dai recettori SSTR2 e SSTR5. Il legame recettore-SST attiva le proteine G inibitorie legate alla membrana plasmatica della cellula, con successiva riduzione della attività della adenilato ciclasi, diminuzione del cAMP e del Ca^{++} intracellulari. Queste modificazioni intracellulari costituiscono il meccanismo principale coinvolto nella inibizione della secrezione di GH indotta dalla SST. L'effetto antiproliferativo della SST sulla crescita delle cellule somatotropiniche sarebbe invece modulato dalla inibizione della attività della MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase). La SST, in condizioni fisiologiche, regola la frequenza e la massa degli episodi secretori del GH attraverso variazioni nella sua secrezione ipotalamica. Il nadir secretorio della SST si associa, infatti, al picco secretorio del GH, la cui entità è proporzionale alla durata della inibizione indotta dalla SST precedente al suo nadir (9).

GHRH. La esistenza di fattori ad attività stimolante la secrezione del GH era conosciuta da tempo in quanto estratti di ipotalamo stimolavano la secrezione ipofisaria dell'ormone, sia in vitro che in vivo, nell'animale da esperimento. La identificazione del GHRH venne definitivamente dimostrata con la sequenziazione del peptide e successiva clonazione da tessuto neoplastico pancreatico responsabile di un quadro di acromegalia da secrezione

ectopica di GHRH (10). Le due forme molecolari principali sono composte rispettivamente da 40 e 44 aminoacidi: quest'ultima forma contiene nel suo interno quella a 40 aminoacidi. Tutte e due le forme di GHRH derivano da modificazioni post-traslazionali di precursori polipeptidici di maggiori dimensioni (107-108 aminoacidi) (11). Il frammento più piccolo della molecola naturale che conserva la piena attività biologica è costituita dalla sequenza aminoacidica 1-29-NH₂.

Oltre che nell'ipotalamo (il GHRH è sintetizzato nel nucleo arcuato e nel nucleo ventromediale) il gene GHRH è espresso anche in altri tessuti (placenta, ovaio, utero) sebbene non sia stato ancora chiarito il suo ruolo fisiologico.

Il recettore per il GHRH appartiene alla famiglia di recettori accoppiati alla proteina G. Il legame GHRH-recettore attiva la adenilato-ciclastasi con aumento del cAMP e del Ca⁺⁺ intracellulare, secrezione di GH preformato, successiva stimolazione della trascrizione di mRNA del GH e nuova sintesi dell'ormone (12).

Growth Hormone-releasing peptides. Durante alcune ricerche relative al controllo oppioide della secrezione del GH, venne riscontrato che alcuni analoghi della Met-enkefalina (GH-releasing peptide GHRP-6, hexarelin) erano potenti secretagoghi del GH. Successivamente venne identificato un recettore accoppiato alla proteina G, caratterizzato da una elevata selettività per la classe di questi GH secretagoghi, denominato GHSR (growth hormone secretagogue receptor) (13). Questo recettore non è imparentato al recettore "classico" del GH (GHR), ed è notevolmente espresso nella ipofisi anteriore e nell'ipotalamo medio-basale. Queste evidenze suggeriscono la esistenza di un legante naturale per questo tipo di recettore coinvolto nella regolazione fisiologica della secrezione dell'ormone. Un possibile ligando candidato potrebbe essere la ghrelina, un peptide prodotto e secreto nella circolazione dallo stomaco, ma anche presente nel nucleo arcuato ipotalamico e nella ipofisi anteriore dove agirebbe con meccanismi paracrine (14).

Neurotrasmettitori-Neuropeptidi. Numerosi neurotrasmettitori e neuropeptidi sono coinvolti nella regolazione del GH. Le evidenze ottenute in campo sperimentale sembrano dimostrare che queste sostanze agirebbero a livello dell'ipotalamo, attraverso la modulazione della secrezione di GHRH e SST.

La importanza di meccanismi α -adrenergici coinvolti nella secrezione di GH derivarono dalla osservazione che la somministrazione di clonidina, un agonista dei recettori α -2 centrali, determinava un rapido e consistente incremento nella concentrazioni plasmatiche dell'ormone. Il ruolo dei recettori α -1, viceversa, è di tipo inibitorio in quanto la secrezione basale di GH si riduce dopo somministrazione dell' α -1 agonista metoxamina (5). Anche i recettori β -adrenergici svolgono un ruolo inibitorio sul GH: questo effetto è ampiamente dimostrato dal potenziamento secretorio dell'ormone a numerosi stimoli fisiologici e farmacologici indotti dalla somministrazione di farmaci β -bloccanti.

Il ruolo svolto dalle vie dopaminergiche ipotalamiche sul GH è ampiamente documentato dall'incremento secretorio indotto dalla somministrazione acuta della Levo-dopa, della apomorfina e dai derivati ergotini (diretti agonisti del recettore dopaminico), dalle amfetamine e dalla fenildidano. E' verosimile che il controllo dopaminergico della secrezione di GH possa essere mediato attraverso una inibizione transitoria della secrezione portale della SST (5).

Le evidenze relative al controllo colinergico della secrezione di GH, nell'uomo, sono più recenti e derivano da alcuni studi di neurofarmacoendocrinologia i quali inequivocabilmente dimostrarono che farmaci antagonisti dei recettori colinergici muscarinici bloccano completamente la secrezione basale e stimolata del GH. In aggiunta a queste evidenze, la somministrazione di farmaci stimolanti le vie colinergiche come la piridostigmina, un inibitore della colinesterasi, determina un notevole potenziamento della secrezione stimolata dell'ormone (15). Le evidenze sperimentali ed i dati ottenuti nell'uomo dimostrano che le vie

ipotalamiche colinergiche modulano, attraverso meccanismi inibitori, la secrezione ipotalamica di SST.

Le evidenze sperimentali per un ruolo svolto dalla istamina e dalla serotonina nella modulazione secretoria del GH sono meno evidenti ed i risultati ottenuti non sempre univoci. E' comunque ipotizzata una attività stimolatoria, probabilmente modulatoria, della secrezione dell'ormone (5).

L'intervento degli oppioidi endogeni e dei loro recettori nel controllo secretorio della ipofisi e del GH in particolare è documentato anche nell'uomo (16). In particolare, la stimolazione del GH indotta dalla Met-enkefalina e bloccata da antagonisti muscarinici sembrerebbe suggerire che gli oppioidi stimolano il GH attraverso la riduzione della SST (17). Questo meccanismo medierebbe anche l'attività GH stimolante dell'arginina.

Insulin-like growth factors. La IGF-1 è un polipeptide a singola catena aminoacidica la quale svolge un ruolo fisiologico importante nella crescita, nella differenziazione cellulare e nel metabolismo. Appartengono a questa famiglia di polipeptidi la proinsulina, la insulina, la IGF-1 e la IGF-2 (18). Questi ultimi due polipeptidi hanno molte sequenze aminoacidiche in comune con la proinsulina e le loro azioni a livello cellulare sono mediate dai classici recettori di superficie ad attività tirosina-kinasi peraltro molto simile al recettore insulinico. Questi recettori si trovano ciascuno come dimero sulla superficie cellulare e, quando entrambi vengono espressi si formano, sostanzialmente per eterodimerizzazione, recettori ibridi IGF-1-Insulina (18).

Il recettore per la IGF-2 è completamente differente e non correlato al recettore insulinico e per la IGF-1. E' un recettore transmembrana, costituito da una singola proteina, ma senza le caratteristiche di un recettore di segnale. Questo recettore agirebbe anche come recettore metabolico che contribuirebbe in maniera sostanziale alla clearance della IGF-2. In campo

sperimentale, la assenza del recettore determina, infatti, un aumento nei livelli di IGF-2 ed una ipercrescita dell'animale (18).

In particolare, IGF-1 e IGF-2 derivano da due geni distinti e vengono potenzialmente trascritte da tutte le cellule dell'organismo (19). Quando questi composti vennero caratterizzati dal punto di vista strutturale, si scoprì che la IGF-1 agisce in maniera autocrina e paracrina, ma anche come sostanza ormonale. Circa il 75% della produzione di questo polipeptide avviene a livello epatico. La espressione del gene *ig-1* è prevalentemente regolata dal GH, ma è influenzata anche dallo stato nutrizionale e dall'insulina (20). La IGF-1, a sua volta, interferisce con la secrezione ipofisaria di GH regolandone la dismissione attraverso un meccanismo di feed-back inibitorio.

La espressione tissutale del gene *ig-2* è indipendente dal GH ed i livelli ematici sono circa 3 volte maggiori di quelli della IGF-1 e rimangono costanti nel corso della vita. Viceversa, le concentrazioni plasmatiche della IGF-1 tendono a ridursi progressivamente dopo la pubertà (21).

Gli effetti della IGF-1 sono mediati, a livello cellulare, dal recettore IGF-1, tirosina chinasi eterotetramero legato alla membrana cellulare. Il recettore cellulare per la IGF-1 presenta per circa il 60% omologie con i recettori per l'insulina A e B, ma differisce da questi per la affinità e specificità del ligando e per le vie di trasduzione del segnale (22).

La bioattività delle IGFs è modulata dalle proteine di legame della molecola (IGF-binding proteins, IGFBPs) le quali ne facilitano la stabilità nel plasma e tessuti (23). La espressione e distribuzione delle IGFBPs (ne sono state isolate 6) sono tessuto-dipendenti e sono modificate da numerose variabili come l'esercizio fisico, lo stato nutrizionale, l'invecchiamento, la gravidanza (24). In particolare, durante la gravidanza la proteina legante (BP) predominante è la IGFBP2 mentre per tutto il periodo postnatale oltre l'85% del pool di IGF è legato alla IGFBP3 in un complesso ternario con la subunità acido-labile (ALS); quest'ultima

glicoproteina (complessata anche con IGFBP5) ha la funzione di stabilizzare maggiormente il composto ternario (18). Solo il 5% del pool della IGF-1 si trova non legata alle BPs e circola libera nel plasma. La funzione globale delle BPs è probabilmente quella di ridurre o facilitare la biodisponibilità della IGF ai tessuti agendo come composto di riserva della molecola nella microcircolazione tissutale. La concentrazione delle IGFs nei tessuti è infatti circa il 20% di quella presente nel plasma (23). Questo meccanismo di regolazione della attività biologica della IGF-1 è spiegato anche dalla maggiore affinità della IGF-1 per le BPs rispetto alla propria affinità per il suo stesso recettore. Il passaggio della IGF-1 attraverso l'endotelio dei capillari per raggiungere i vari tessuti responsivi alla molecola sarebbe mediato dal legame della IGFBP3 ai proteoglicani della membrana cellulare con successivo distacco della ALS dal composto ternario: questo meccanismo renderebbe possibile la diffusione del complesso IGFBP3-IGF-1 dai capillari all'interstizio. Un altro meccanismo coinvolto in questi processi metabolici sarebbe l'attività di specifiche proteasi presenti nella circolazione e nei tessuti le faciliterebbero l'utilizzo tissutale delle IGFs (25).

La IGF-2 è la più rappresentata ed ha la concentrazione più elevata per tutta la durata della vita post-natale. La IGF-2 svolge il suo ruolo più importante nella crescita durante il periodo fetale e neonatale. Il ruolo fisiologico di questo composto nelle epoche successive della vita non sono chiare, nonostante le concentrazioni plasmatiche rimangano elevate e certamente superiori (circa 4 volte) di quelle della IGF-1. Alcune evidenze cliniche sembrano peraltro suggerire un ruolo della IGF-2 nel metabolismo glicidico. La eccessiva produzione di IGF-2 da parte di alcuni tumori si associa spesso ad ipoglicemia. Alcuni studi di genetica hanno inoltre evidenziato che polimorfismi del gene per la IGF-2 (è localizzato sul cromosoma 11, vicino a quello insulinico) sarebbero responsabili di un maggior accumulo di tessuto adiposo viscerale e sarebbero associati ad un maggior rischio di malattia metabolica (25).

Il tessuto adiposo “endocrino”. Il tessuto adiposo bianco, in condizioni fisiologiche, costituisce circa il 20% del peso nell'uomo e circa il 30% del peso nel sesso femminile. La differenza di genere nella distribuzione anatomica del grasso è legata prevalentemente alle influenze ormonali (26). Questo dimorfismo sessuale si manifesta soprattutto all'epoca della pubertà ed è legata principalmente alla attività dell'enzima lipoproteinlipasi (LPL) (27). La LPL è l'enzima endoteliale responsabile dell'idrolisi dei trigliceridi (TG) contenuti nelle lipoproteine circolanti; in tal modo gli acidi grassi dei TG possono diffondere nelle cellule per essere utilizzati. Negli adipociti, gli acidi grassi assorbiti sono riesterificati a trigliceridi (lipogenesi).

Nella femmina in età fertile la attività della LPL è maggiore nella regione gluteo-femorale mentre nel maschio la attività di questo enzima è maggiore negli adipociti addominali rispetto a quella della regione gluteo-femorale. Queste differenze di genere concorrono, in situazione patologiche di espansione del tessuto adiposo, alla obesità ginoide (gluteo-femorale o obesità a pera) nella donna ed alla obesità androide (addominale) nel maschio (28). Nelle menopausa, la attività della LPL è maggiore negli adipociti viscerali rispetto a quelli della regione gluteo-femorale. In situazioni di carenza estrogenica aumenta l'accumulo di grasso nell'omento. Poiché gli estrogeni riducono la densità dei recettori per gli androgeni, la carenza estrogenica favorisce l'accumulo del grasso viscerale (29).

Accanto alla differente localizzazione del tessuto adiposo (sottocutaneo e viscerale), gli adipociti dei due distretti presentano differenze morfologiche e funzionali. Gli adipociti viscerali sono infatti più piccoli di quelli sottocutanei, ed il tessuto adiposo viscerale è caratterizzato da una ricca vascolarizzazione e dalla presenza di macrofagi, cellule infiammatorie e fibroblasti. Inoltre, gli adipociti viscerali presentano una maggiore espressione di recettori β -adrenergici, una ridotta concentrazione di recettori α -adrenergici e sono meno sensibili all'effetto antilipolitico della insulina (30). Queste caratteristiche

funzionali conferiscono all'adipocita viscerale una maggiore attività metabolica che si traduce in una lipolisi aumentata con eccessiva liberazione di acidi grassi non esterificati (NEFA) nel circolo portale. I NEFA a livello epatico riducono l'attività biologica della insulina contribuendo alla insulino-resistenza, ad una riduzione del metabolismo insulinico con conseguente iperinsulinemia. L'eccessivo afflusso di NEFA al fegato determina, una volta saturata la β -ossidazione dei NEFA, la sintesi eccessiva di TG con conseguente steatosi epatica (31). L'ipertrigliceridemia induce un aumento della produzione di VLDL molto ricche in trigliceridi, che, attraverso l'idrolisi di trigliceridi, sono convertite in LDL nel circolo. Il contenuto originale di trigliceridi relativamente elevato comporta la produzione di particelle di LDL che sono più piccole e più dense rispetto a quelle presenti in un individuo senza adiposità intra-addominale e insulino-resistenza (30).

La proteina di trasporto del colesterolo esterificato (CETP) scambia colesterolo fra HDL e VLDL e LDL. Gli elevati livelli di trigliceridi presenti nelle VLDL tenderanno ad aumentare lo scambio di colesterolo attraverso la CETP, e ciò avrà come risultato la formazione di particelle HDL ricche in trigliceridi. Così come avviene con il colesterolo LDL, queste particelle sono soggette a lipolisi, e ne risulta la produzione di particelle HDL piccole e dense che sono catabolizzate più rapidamente. Il risultato netto è una riduzione globale dei livelli di colesteroli HDL (30) (Figura 2).

La più recente dimostrazione che l'adipocita viscerale produce e secerne sostanze differenti dai NEFA (adipsina nel 1987, il TNF- α nel 1993, leptina 1994) (32) ha sostanzialmente modificato il concetto della funzione fisiologica di questo tessuto nell'organismo: da un tessuto con prevalente funzione di deposito energetico (TG) si è passati a considerare il tessuto adiposo come un organo a funzione endocrina.

La importante funzione endocrina del tessuto adiposo è evidenziata dalle conseguenze metaboliche negative causate da una alterata regolazione della massa adiposa. Numerose

evidenze cliniche hanno infatti dimostrato come un eccesso di massa adiposa, particolarmente nel compartimento viscerale, si associa alla insulino-resistenza, al diabete mellito tipo 2 (DM2), alla ipertensione arteriosa, a condizioni infiammatorie e protrombotiche e a malattie cardiovascolari riconducibili alla sindrome metabolica. Con tali meccanismi l'eccesso della massa adiposa contribuisce alla patogenesi dei disordini clinici legati alla obesità (33-35).

E' ormai evidente come il tessuto adiposo ed i suoi compartimenti anatomici rappresenta un organo endocrino metabolicamente attivo il quale è completamente integrato con tutti i sistemi fisiologici di controllo del metabolismo.

Il metabolismo e la funzione endocrina dell'adipocita è profondamente influenzata dalla differenza di genere e dalle concentrazioni circolanti e tessutale degli ormoni sessuali (30). Inoltre, altre sostanze ormonali, oltre agli androgeni ed agli estrogeni, contribuiscono alla distribuzione dell'adipe nella direzione viscerale dal momento che livelli elevati di cortisolo e una ridotta secrezione di GH possono incrementare la massa viscerale degli adipociti. Anche le modificazioni della composizione corporea legata all'invecchiamento si accompagna ad un aumento della massa adiposa la quale è prevalentemente viscerale e probabilmente legata alla riduzione dell'attività di alcuni assi endocrini come, ad esempio, l'asse ipotalamo-GH-IGF-1 (29,36-39).

In questi ultimi anni sono stati identificati e caratterizzati funzionalmente nel tessuto adiposo numerose sostanze e recettori. Numerose molecole classicamente riconosciute come segnali endocrini prodotti da organi e tessuti non adiposi sono state definitivamente identificate come prodotti con attività ormonale (adipochine) secreti anche dall'adipocita. In definitiva, gli adipociti e la componente stromale, usando le adipochine quale sistema di comunicazione, possono influenzare la attività di numerosi tessuti ed organi, quali il fegato, il muscolo, il surrene, il Sistema Nervoso Centrale (SNC), l'ipofisi, il sistema simpatoadrenergico, il sistema riproduttivo, le cellule β pancreatiche, e possono partecipare nel controllo del bilancio

energetico, del centro dell'appetito, della pressione arteriosa, del metabolismo lipidico, della angiogenesi e della emostasi.

Leptina. La leptina è un ormone peptidico di 16 kDa, non glicosilato, codificato dal gene dell'obesità (gene *ob*) prodotto prevalentemente dal tessuto adiposo (40). Regola la sensazione della fame a livello ipotalamico (41). La molecola recettoriale corta (34 aminoacidi endocellulari) è espressa prevalentemente nei plessi corioidei e medierebbe prevalentemente il trasporto dell'ormone attraverso la barriera ematoencefalica. L'isoforma recettoriale lunga (303 aminoacidi nel dominio intracellulare) rappresenterebbe il vero recettore di trasduzione del segnale ed è espresso in tutto l'organismo (42). Il recettore solubile della leptina originerebbe dalle forme recettoriali legate alla membrana e rappresenterebbe la più importante attività di legame leptinico nel plasma. Un aumento della leptina sopprime, a livello del nucleo arcuato ipotalamico, i peptidi oressigeni Y (NPY) e l'AGRP (agouti-related peptide). La leptina inoltre stimolerebbe la produzione di peptidi anoressigeni quali α -MSH, riducendo, nel complesso, l'assunzione dei nutrienti. In aggiunta a queste funzioni, la leptina regola la funzione neuroendocrina stimolando l'asse ipofisogonadico (41). Nella obesità può instaurarsi una condizione di leptino-resistenza probabilmente legato, in presenza di elevati livelli dell'ormone, alla saturazione dei recettori coinvolti nel trasporto della leptina attraverso la barriera ematoencefalica (43).

Il ruolo svolto dalla leptina, in concentrazioni fisiologiche, nel metabolismo glicidico non è chiaro. Gli effetti sarebbero molteplici e si esplicherebbero a più livelli, spesso con effetti contrastanti (44-47):

- Nel muscolo stimola la β -ossidazione dei NEFA e diminuisce la riesterificazione in TG.
- Nel muscolo e negli adipociti stimola la idrolisi dei TG.

- Stimola (muscolo, pancreas, fegato, adipociti) le termogemine (UCP1) stimolando la termogenesi ed il dispendio energetico.
- Riduce la sintesi epatica del colesterolo e stimola la sintesi degli acidi biliari.
- Modula la secrezione pancreatica di insulina e la sensibilità tissutale all' insulina.
- Riduce l'accumulo dei TG nei tessuti non adiposi (muscolo, fegato, pancreas, miocardio) prevenendo la lipotossicità e migliorando la sensibilità all' insulina.
- Attiva la proliferazione di cellule NK, dei macrofagi e la produzione di citochine.
- Stimola la crescita delle cellule endoteliali e la angiogenesi.
- Stimola il sistema simpatoadrenergico.
- Determina disfunzione endoteliale.
- Stimola la liberazione locale di ossido d'azoto.

Molti studi clinici hanno inoltre evidenziato che un eccesso di leptina può contribuire alla patogenesi dell'aterosclerosi probabilmente attraverso la stimolazione della proliferazione ed ipertrofia delle cellule muscolari lisce e la espressione della PCR nelle cellule endoteliali coronariche.

Adiponectina. L' adiponectina venne scoperta nel 1996, due anni dopo la scoperta della leptina (48-51). La importanza di questo ormone nella regolazione del metabolismo venne successivamente evidenziata con la dimostrazione del suo ruolo protettivo nella patogenesi delle complicazioni correlate alla obesità. Questo ormone circola nel plasma in concentrazioni piuttosto elevate (500-3000 µg/l), come trimero, esamero ed altre isoforme ad elevato peso molecolare. Le concentrazioni sono inferiori nel maschio e questa differenza di genere sarebbe legata agli effetti degli ormoni androgeni. L'azione della adiponectine è mediata prevalentemente a livello epatico (recettore tipo 2) e nel muscolo scheletrico (recettore tipo 1), attraverso la attivazione della chinasi attivata dalla adenosin monofosfato (AMPK). La attivazione di questa chinasi, attraverso la espressione del recettore PPAR- α (peroxisome

proliferators-activated receptor), induce un aumento della espressione genica degli enzimi della ossidazione dei NEFA e del uptake del glucosio : questi due effetti sarebbero

I meccanismi molecolari principali attraverso i quali la adiponectina potenzia la insulino-sensibilità tessutale. In aggiunta, la adiponectina stimolerebbe la espressione del trasportatore del glucosio (GLUT-4) contribuendo ulteriormente alla insulino-sensibilità (52,53).

Sebbene la adiponectina sia sintetizzata e secreta esclusivamente dagli adipociti (prevalentemente nel compartimento viscerale), i livelli circolanti di questa molecola sono diminuiti nella obesità, nella insulino-resistenza, nelle malattie cardiovascolari e nelle dislipidemie (54). La obesità si accompagna inoltre ad una riduzione della espressione tessutale dei recettori per l'ormone, alterando nel contempo il segnale post-recettoriale della leptina. Bassi livelli dell'ormone si associano alla infiammazione endoteliale e del processo aterosclerotico queste evidenze suggeriscono la necessità di concentrazioni ottimali della molecola per mantenere un fenotipo non infiammatorio della parete vasale (55,56). La adiponectina infatti inibisce la adesione dei monociti alle cellule endoteliali e la trasformazioni dei macrofagi in cellule schiumose (56). La progressione della ipertrofia miocardica sarebbe ritardata dall'ormone, probabilmente attraverso la attivazione della AMPK (57).

Numerose sostanze hanno effetti inibitori sulla secrezione dell'adiponectina. Queste includono i glicocorticoidi, le catecolamine, gli androgeni, la interleuchina 6 ed il fattore di crescita tumorale- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) (58-60). L'aumento della produzione e secrezione di queste due citochine da parte degli adipociti determinerebbe, in corso di espansione del compartimento adiposo viscerale, la riduzione nelle concentrazioni plasmatiche di adiponectina le quali, in definitiva, sono inversamente proporzionali alla massa dell'adipe viscerale.

Resistina. La resistina è un ormone secreto dalle cellule della componente stromale e vascolare del tessuto adiposo (61). L'azione principale di questo ormone è quella di ridurre la sensibilità all'insulina a livello dei tessuti (55). La resistina, secreta anche dai macrofagi delle placche aterosclerotiche, stimola la produzione di endotelina 1 e la produzione di molecole di adesione. I livelli circolanti aumentano con la obesità e contribuiscono, insieme alle altre adipochine, alla regolazione dello stato infiammatorio endoteliale e delle alterazioni metaboliche presenti nella obesità (62,63).

Visfatina. La visfatina è prodotta prevalentemente dagli adipociti viscerali, eserciterebbe un ruolo insulino-mimetico. Non è chiaro, tuttavia, l'azione fisiologica di questo ormone nella specie umana (64).

Proteine del sistema renina-angiotensina. Gli adipociti producono numerose proteine del sistema renina-angiotensina (RAS), Queste includono la renina, l'angiotensinogeno, l'angiotensina 1 e 2 e l'enzima di conversione. Questo sistema funzionalmente attivo ed iperespresso nella ipertrofia adiposa, potrebbe svolgere un ruolo nella patogenesi multifattoriale della ipertensione arteriosa associata alla obesità. Il sistema renina-angiotensina è inoltre coinvolto, in senso stimolatorio, sulla adipogenesi e sulla espansione della massa adipocitaria ed interferisce sul metabolismo del glucosio stimolando la neoglicogenesi. Le evidenze, nel complesso, suggeriscono che le componenti del RAS derivate dagli adipociti possono svolgere un ruolo importante di tipo autocrino, paracrino ed endocrino nella patogenesi della obesità, insulino-resistenza ed ipertensione arteriosa (65,66).

Inibitore dell'attivatore del plasminogeno-1. L'inibitore dell'attivatore del plasminogeno-1 (plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1), E' un inibitore degli attivatori del plasminogeno e della attività fibrinolitica, prodotto principalmente dal fegato e dalle cellule endoteliali. Regola la formazione del trombo inibendo la attività dell'attivatore tissutale del plasminogeno La espressione del PAI-1 è aumentata nella obesità e può rappresentare un

elemento patogenetico che lega la obesità alle malattie cardiovascolari ed alla insulino-resistenza (67).

TNF- α . Originariamente venne dimostrato che il TNF- α può indurre necrosi tumorale dopo una infezione batterica. Questa citochina, in realtà, è coinvolta in numerose funzioni immunologiche, nella replicazione virale, nello shock settico e nella patogenesi della febbre. Il TNF- α è sovraespresso nella obesità e si associa alla insulino-resistenza (68,69). Gli adipociti esprimono anche i recettori (legati alla membrana e solubile) per il TNF- α . Lo stimolo iniziale che porta alla secrezione di questa citochina non è completamente chiaro. Poiché la sorgente maggiore della produzione è rappresentata dai macrofagi attivati, è possibile che l'aumento della morte degli adipociti legata alla loro limitata capacità di espansione possa indurre segnali mediati da chemochine con reclutamento di monociti e sviluppo di flogosi locale. Numerosi sono gli effetti metabolici di questa citochina (70). Il TNF- α stimola la lipolisi, riduce la secrezione di adiponectina, riduce l'espressione di GLUT-4, altera il segnale insulinico attivando la serino-chinasi. Altri effetti del TNF- α sono la alterazione della composizione lipidica di membrana, e l'aumento della disponibilità di diacilglicerolo e ceramide, con conseguenze riduzione della attività biologica della insulina (71). Il TNF- α è inoltre coinvolto nello stress ossidativo e nella disfunzione mitocondriale. Stimola l'espressione del PAI-I negli adipociti contribuendo allo sviluppo delle complicanze cardiovascolari della sindrome metabolica (72-74).

Interleuchina-6. L' interleuchina-6 (IL-6) è un'altra citochina con attività pleiotropa associata alla obesità ed alla insulino-resistenza. Analogamente al TNF- α , la IL-6 è sovraespressa nel tessuto adiposo dove è prodotta principalmente dalla componente stromale (75,76). Il grasso viscerale produce una quantità della citochina tre volte maggiore rispetto a quella del sottocutaneo: le concentrazioni circolanti di IL-6 sono correlate positivamente con la obesità, intolleranza glicidica ed insulino-resistenza. La IL-6 fa aumentare i NEFA

circolanti e riduce la produzione di adiponectina. Stimola la produzione epatica delle proteine di fase acuta contribuendo allo stato pro-infiammatorio presente nella sindrome metabolica.

Il tessuto adiposo esprime, nella sua componente stromale, numerose attività enzimatiche coinvolte nella interconversione ed inattivazione di ormoni steroidei. La 17β -idrossisteroidodeidrogenasi (17β -HSD) converte androgeni ed estrogeni deboli nei composti più potenti (testosterone ed estradiolo). Il tessuto adiposo è inoltre coinvolto nella regolazione del metabolismo del cortisolo. La componente stromale del tessuto adiposo viscerale esprime maggiormente la 11β -idrossisteroidodeidrogenasi-1 (11β -HSD-1): questo enzima rigenera il cortisolo dal composto inattivo cortisone contribuendo, ad una maggiore sintesi locale dell'ormone glicoattivo (77,78). Questo processo determina una maggiore espansione della massa adiposa cortisolo-indotta, e la disregolazione del sistema adipo-citochinico

Endocannabinoidi. Gli endocannabinoidi rappresentano una componente addizionale nella funzione e disregolazione del tessuto adiposo nella obesità. Quando gli adipociti vengono stimolati da agonisti del recettore CB1 dei cannabinoidi, si osserva un aumento della differenziazione dei pre-adipociti e della attività della LPL con conseguente aumento della sintesi dei trigliceridi (79,80). Gli endocannabinoidi inoltre modulano la produzione delle adipochine da parte degli adipociti. In particolare riducono la produzione della adiponectina e forse della leptina. La sovraespressione degli endocannabinoidi e dei loro recettori, in definitive, oltre a stimolare l'adipogenesi, costituiscono una componente addizionale coinvolta nell'aumento della massa e nella disregolazione endocrina del tessuto adiposo e nelle complicanze metaboliche legate a questi fenomeni.

Queste componenti del tessuto adiposo ed altre evidenze clinico-sperimentali hanno rivoluzionato la funzione fisiologica dell'adipocita. Il tessuto adiposo, oltre all'adipocita, è costituito da una matrice connettivale, terminali nervosi, cellule stromali e cellule coinvolte nei processi immunitari con attività funzionale altamente integrata. Oltre alla funzione di

deposito, il tessuto adiposo esprime e secerne una varietà di molecole necessarie per il segnale di comunicazione intracellulare e produce una grande varietà di molecole proteiche, le adipochine, le quali oltre ad agire localmente agiscono come molecole ormonali in tutti i tessuti ed organi del corpo (30).

Nella obesità, con la espansione della massa adiposa, il tessuto diventa incontrollato e disfunzionale, liberando localmente e nella circolazione sistemica molti dei suoi prodotti molti dei quali costituiscono importanti componenti patogenetiche della condizione clinica che lega la obesità alla insulino-resistenza. Questi prodotti derivati dal tessuto adiposo modulano anche il sistema immunitario e la funzione endoteliale, componenti entrambe coinvolte nella morbilità e mortalità cardiovascolare oltre che nella fisiopatologia della obesità.

Inoltre, alcune di queste molecole coinvolte nella patogenesi della sindrome metabolica svolgono un ruolo importante nel controllo dell'appetito e nel metabolismo degli adipociti. La leptina è un classico esempio di queste sostanze che interagiscono con la funzione del sistema endocrino, la regolazione della sazietà ed i processi metabolici. Altro esempio di più recente scoperta è rappresentato dal sistema degli endocannabinoidi e dai loro recettori.

La espansione della massa adiposa, oltre alla iperespressione di numerose molecole, si associa, per disregolazione dei meccanismi omeostatici locali, a riduzione di altre sostanze ormonali protettive per il metabolismo e per la insulino-sensibilità. Di queste, la riduzione della adiponectina rappresenta l'aspetto più importante nella patogenesi della insulino-resistenza e nelle complicanze metaboliche associate alla obesità.

Fisiopatologia e classificazione del diabete mellito

Il diabete mellito (DM) è una alterazione cronica del metabolismo glucidico caratterizzata da iperglicemia dovuta a difetti della secrezione e/o dell'azione fisiologica dell'insulina. È una malattia eterogenea alla cui patogenesi partecipano diversi meccanismi che vanno dalla

distruzione autoimmune delle cellule β del pancreas, con conseguente deficit assoluto di insulina, ad una serie di meccanismi che determinano una resistenza dei tessuti bersaglio all'azione insulinica (81-83).

Attualmente I criteri biochimici necessari per una diagnosi sicura di DM sono i seguenti:

1. Sintomi di diabete (poliuria, polidipsia, calo ponderale) + riscontro casuale di glicemia > 200 mg /dl.

Oppure

2. Glicemia a digiuno > 126 mg/dl riscontrata in due determinazioni distinte.

Oppure

3. Glicemia > 200 mg/dl 2 ore dopo una carico orale di glucosio (g. 75).

Nell'ambito della variabilità clinica del quadro metabolico viene attualmente riconosciuto un gruppo intermedio di soggetti i cui livelli glicemici, benché non soddisfino i criteri diagnostici del diabete, sono comunque elevati ed intermedi tra i parametri normali e quelli propri dei soggetti diabetici. Questa popolazione è definita come avente un'*alterata glicemia a digiuno* con livelli di glucosio plasmatici ≥ 100 mg/dl e < 126 mg/dl oppure come avente un'*alterata tolleranza ai carboidrati* se i livelli glicemici sono compresi tra 140 e 199 mg/dl due ore dopo curva da carico orale di glucosio (OGTT).

Un altro parametro introdotto di recente nella diagnostica biochimica del DM è rappresentata dalla concentrazione della emoglobina glicata (HbA1c), che **se > 6.4%** è suggestiva di DM. (84).

La grande maggioranza dei casi di diabete rientra in due ampie categorie differenti dal punto di vista eziopatogenetico: il diabete mellito di tipo 1 (DM1) e il DM2.

Il DM1 è una malattia immunomediata a patogenesi multifattoriale e poligenica e riguarda circa il 5-10% di casi di diabete. Si presenta più comunemente durante l'infanzia o l'adolescenza anche se possono essere colpite tutte le età. L'incidenza nella popolazione

italiana è compresa tra i 6 e 10 casi/100.000/anno nella fascia di età da 0 a 14 anni, mentre è stimata in 6, 72 casi/100.000/anno dai 15 ai 29 anni. La Sardegna, insieme ai paesi Scandinavi, ha un'incidenza tra le più alte al mondo, pari a 34 casi/100.000/anno nella fascia di età tra 0 e 14 anni (85). Il meccanismo patogenetico è rappresentato dalla distruzione immunomediata delle cellule β del pancreas i cui principali marcatori sono autoanticorpi anti cellule β (ICA), autoanticorpi anti insula, autoanticorpi anti insulina (IAA), autoanticorpi anti decarbossilasi dell'acido glutammico (GAD) e autoanticorpi anti tiroxina-fosfatasi (IA-2 e IA-2 β) (86). Il DM1 presenta una forte associazione con il complesso di istocompatibilità (HLA) in particolare con il HLA-DR3, DR4 e DQ2 e sono stati individuati almeno diciassette loci genici che possono contribuire alla suscettibilità per tale malattia; tra questi, i polimorfismi della regione promoter del gene dell'insulina (IDDM1 sul cromosoma [6](#)). In individui geneticamente predisposti, il processo autoimmune sarebbe innescato da fattori ambientali ancora scarsamente definiti. Tra i fattori scatenanti sono stati proposti soprattutto i virus (in particolare i virus Coxsackie e il virus della Rosolia).

Il DM1 può associarsi ad altre patologie autoimmuni quali la malattia di Graves, la tiroidite di Hashimoto, la malattia di Addison, l'artrite reumatoide, la vitiligine, la celiachia, l'epatite autoimmune, la *miastenia gravis* e l'anemia perniciosa.

Il DM2 è la forma più frequente e rappresenta il 90% dei casi di diabete. In Italia la percentuale di individui affetti da tale patologia è mediamente del 4, 5% (nelle fasce di età inferiori ai 35 anni è dello 0, 5%, al di sopra dei 65 supera il 10%), ma la reale prevalenza è certamente sottostimata per le caratteristiche delle manifestazioni cliniche della malattia. Le basi genetiche del DM2 rimangono ancora sconosciute ma si presume rivestano un ruolo cruciale le interazione tra geni che controllano l'attività insulinica, la funzione delle cellule β , fattori ambientali e mutazioni in altri geni background. Il rischio di sviluppare questa forma di diabete aumenta con l'età, il sovrappeso e con la sedentarietà (87). Il DM2 è più comune in

soggetti con ipertensione, dislipidemie, ridotta tolleranza al glucosio, alterata glicemia a digiuno, con anamnesi positiva per questa patologia e in alcuni gruppi etnici. Il DM2 può inoltre associarsi nelle donne affette da sindrome dell'ovaio policistico, particolarmente se associata a sovrappeso e/o obesità (88,89).

Nella patogenesi del DM2 un ruolo importante è svolto dalla insulino-resistenza spesso causata da un eccesso di tessuto adiposo, in particolare nella sua componente viscerale, spesso associato ad un aumento dei trigliceridi. Un aumento eccessivo di NEFA nella circolazione sistemica, l'accumulo di trigliceridi in vari organi, in particolare nei muscoli scheletrici, sembrerebbe interferire, infatti, con la cascata dei segnali dell'insulina, interrompendola in più punti. L'accumulo dei lipidi nei muscoli scheletrici sarebbe dovuto, anche, allo stato di scarsa adattabilità metabolica e alla ridotta densità mitocondriale che caratterizza i pazienti con DM2. L'insulino-resistenza riguarderebbe anche il fegato con aumento della glicogenolisi e conseguente iperglicemia a digiuno (89).

Il Diabete Latente Autoimmune dell'Adulto

Il diabete latente autoimmune dell'adulto è un'entità nosologica individuata e caratterizzata di recente. Irvine et al (90), circa 30 anni fa, dimostrarono per la prima volta l'esistenza di autoanticorpi anti cellule β in pazienti con DM2. Nel 1993 tale forma di diabete, caratterizzata dalla presenza di autoanticorpi anti cellule β , fu denominata da Tuomi et al. "Diabete Autoimmune Latente dell'Adulto" (Latent Autoimmune Diabetes in Adult, LADA) (91). Qualche anno più tardi tale acronimo è stato utilizzato da Zimmet per descrivere un sottogruppo di pazienti con insorgenza del diabete dopo i 35 anni, non obesi, privi di chetoacidosi o calo ponderale e positività per ICA e/o autoanticorpi anti-GAD65. Questa entità clinica, classificata come sottogruppo del DM tipo 1, presenta molti degli aspetti fenotipici del DM tipo 2 compresa la lenta progressione verso la insulino-dipendenza (92).

Il LADA rappresenterebbe circa il 10-12% della popolazione affetta di DM2. La reale prevalenza del LADA, oltre che da differenze etniche, è certamente inficiata dalla non routinaria determinazione degli anticorpi anti GAD nei pazienti con fenotipo DM2. Questo aspetto potrebbe condurre ad una reale sottostima di questa popolazione diabetica nel soggetto adulto. In effetti, la determinazione degli autoanticorpi contro gli antigeni insulari permette di distinguere chiaramente il DM2 dal diabete autoimmune (93,94).

Studi epidemiologici e clinici hanno evidenziato che questa particolare forma di diabete non è omogenea ma presenta eterogeneità sia a livello immunologico (titolo anticorpale variabile, presenza di singolo o multipli anticorpi) che clinico. In particolare, esisterebbero differenze marcate nei parametri antropometrici (BMI, rapporto vita-fianchi), nella presenza o meno della sindrome metabolica, nella prevalenza di ipertensione arteriosa e dislipidemie (95,96). Va inoltre sottolineato che la prevalenza tutti questi parametri clinici, inclusa la sindrome metabolica, è significativamente inferiore nei pazienti con LADA rispetto alla popolazione di pazienti con DM2. La composizione corporea, in definitiva, potrebbe rappresentare una componente clinica aggiuntiva capace di modificare la evoluzione clinica della malattia anche nei pazienti con LADA. In effetti, precedenti ricerche effettuate in una coorte di pazienti sardi hanno dimostrato che un valore di BMI superiore a 28 è predittivo di insulino-dipendenza entro 4 anni (97).

Il ruolo esercitato dal tessuto adiposo, in particolare quello viscerale, nelle alterazioni metaboliche della sindrome metabolica e nella patogenesi ed evoluzione clinica del diabete tipo 2 è acquisizione nota e ben documentata. L'entità della espansione adipocitaria viscerale e la disregolazione locale della produzione e secrezione delle adipochine sono infatti predittive del deterioramento funzionale pancreatico (32).

Tra le numerose sostanze prodotte dall'adipocita, la adiponectina è certamente una delle più importanti per il ruolo protettivo svolto in ambito cardiometabolico. Le concentrazioni

ematiche e tessutali di questa molecola tendono a ridursi con la obesità di prevalente tipo viscerale per la disregolazione del network citochinico ed iperespressione di molecole che ne ridurrebbero la produzione (IL-6?).

Le modificazioni patologiche del network citochinico associate alla obesità ed alla espansione degli adipociti viscerali contribuiscono in maniera significativa al deficit di GH presente nel soggetto obeso. La ridotta secrezione ipofisaria dell'ormone sarebbe legata alla riduzione della sua secrezione pulsatile mediata a livello ipotalamico dall'azione di alcune citochine (IL-6, TNF- α , leptina?) sui neuroni produttori GHRH e/o somatostatina.

Recenti studi in vitro hanno dimostrato un effetto di stimolo indotto dal GH sulla espressione genica della adiponectina e sulla secrezione dell'ormone in adipociti (98,99). Precedenti ricerche in vivo, nell'uomo, hanno evidenziato bassi livelli di adiponectina in bambini e in soggetti adulti con deficit di GH (100,101). Il trattamento con GH ricombinante fa aumentare I livelli di adiponectina in questi pazienti e in bambini con sindrome di Prader-Willi (102), verosimilmente legata all'effetto lipolitico del GH e alla conseguente riduzione degli adipociti viscerali. Recettori per la adiponectina (Adipo R1 e R2) sono stati dimostrati nelle cellule ipofisarie comprese le cellule somatotropiche (103) ed il trattamento con adiponectina determina un aumento della secrezione di GH in vitro (104). Studi recenti nell'uomo hanno dimostrato una associazione significativa dei livelli di adiponectina con la secrezione basale, la produzione giornaliera ed i picchi secretori di GH in soggetti normali (105).

I pochi dati della letteratura disponibili sembrerebbero dimostrare, nel complesso, una relazione positiva tra la adiponectina e la secrezione di GH anche in campo umano. Il significato fisiopatologico di questa relazione, soprattutto nella obesità, non è, tuttavia, chiaro ed altri fattori, inclusa la stessa obesità, potrebbero mediare questa associazione.

Scopo del lavoro

Non esistono in letteratura ricerche cliniche e sperimentali relativi alla possibile relazione tra secrezione di GH ed adiponectina in pazienti con LADA. Questi pazienti con fenotipo clinico simile al DM2 ma con autoimmunità pancreatica simile al DM1 possono, a differenza di quest'ultimo, rimanere insulino-indipendenti per molti anni. Un ruolo protettivo importante sulla insulino-dipendenza di questi pazienti potrebbe essere svolto dalla adiponectina e dalla sua azione insulino-sensibilizzante. Ridotti livelli circolanti dell'ormone contribuiscono infatti in maniera significativa alla insulino-resistenza ed alle complicanze metaboliche della storia naturale del DM2. La secrezione del GH è marcatamente ridotta nella obesità viscerale ed esiste una correlazione negativa tra i livelli circolanti di GH e quelli di adiponectina. La ridotta secrezione tonica e pulsatile di GH osservata nella obesità contribuisce inoltre alla espansione adipocitaria viscerale venendo a mancare l'effetto lipolitico dell'ormone sul grasso sottocutaneo e soprattutto su quello viscerale. Si instaurerebbe pertanto un circolo vizioso tra deficit di GH, aumento del grasso viscerale, ridotta secrezione di adiponectina: la riduzione di questa adipochina e del suo ancora ipotetico effetto di stimolo sull'ormone della crescita potrebbe, in definitiva, contribuire al difetto secretorio del GH in questi pazienti.

Lo scopo della ricerca è stato quello di valutare le possibili interrelazioni tra IGF-1 e IGF-1BP (marcatori della secrezione di GH) e livelli circolanti di adiponectina e di leptina (marcatore della espansione adipocitaria, in pazienti con LADA, in pazienti con DM2 ed in soggetti normali.

Materiali e metodi

I pazienti reclutati per questo lavoro provengono in parte dall' unità operativa di Diabetologia dell' Azienda Ospedaliero-Universitaria di Sassari e in parte dal CNR, sezione staccata di Lanusei nell' ambito del progetto "SardiNIA". Sono stati inizialmente inclusi tutti i pazienti con una diagnosi iniziale di DM2 e successivamente screenati per la ricerca degli anticorpi

anti GAD. Sono stati definiti LADA tutti i pazienti che rispettavano le seguenti caratteristiche:

- 1) Esordio del diabete ad almeno 35 anni di età
- 2) Assenza di chetoacidosi e storia di calo ponderale al momento della diagnosi
- 3) Assenza di terapia insulinica per almeno 6 mesi dalla diagnosi.
- 4) Presenza di positività per gli anticorpi anti GAD65.

I pazienti arruolati nel gruppo DM2 presentavano diagnosi di diabete mellito ma non mostravano positività anticorpale anti GAD65.

Lo studio comprende 3 distinti gruppi (LADA, DM2 e controlli sani), ciascuno costituito da 100 soggetti (50 maschi e 50 femmine, ciascuno), con età sovrapponibile. I tre gruppi avevano una età media sovrapponibile.

Tra i pazienti diabetici (LADA e DM2) sono stati esclusi coloro che al momento del prelievo praticavano terapia insulinica. Nel gruppo di controllo nessuno aveva il diabete, e in nessun gruppo erano presenti soggetti con marcata alterazione della funzione renale e/o epatica. Ulteriore criterio di esclusione era la presenza di una alterazione marcata della glicemia a digiuno.

In considerazione del fatto che il GH ha una secrezione pulsatile ed episodica, si sono dosate le IGF-1 come parametro di funzionalità dell' asse ipotalamo-GH. I prelievi sono stati effettuati dopo un digiuno di almeno 12 ore alle ore 8:00 del mattino. I campioni sono stati congelati a -20°C fino al momento dell' uso.

Il BMI è stato calcolato come il rapporto tra il peso (kg) e il quadrato dell' altezza (metri).

Le IGF-1 sono state dosate con un metodo radioimmunometrico (RIA, Diasource, Belgium).

L' adiponectina e la leptina sono state dosate con una metodica ELISA (Mediagnost, Germany).

Tutti i pazienti hanno firmato il loro consenso informato prima di essere arruolati per lo studio.

Analisi statistica

La normalità dei dati è stata testata con il test Shapiro-Wilk. Poiché la leptina e HbA1c avevano una distribuzione asimmetrica, sono stati trasformati matematicamente. Età, BMI, IGF-1 e adiponectina sono espressi come media \pm deviazione standard, mentre la leptina e l' HbA1c sono indicati come mediana (range). Le differenze tra i gruppi sono state testate con l' analisi della varianza (ANOVA). L' analisi di regressione multipla è stata usata per spiegare le possibili variabili che influenzano le concentrazioni sieriche delle IGF-1. Per tutte le analisi è stato utilizzato il programma STATA 12 per Macintosh. $P < 0.05$ è stato considerato come valore statisticamente significativo.

Risultati

Le caratteristiche basali dei 3 gruppi sono riportate nella Tabella 1. I controlli sani avevano un BMI inferiore rispetto ai diabetici (LADA e DM2), livelli ridotti di HbA1c e leptina, e concentrazioni sieriche aumentate di IGF-1 e adiponectina. Tra i soggetti diabetici, i DM2 avevano un valore di BMI più elevato, insieme con livelli sierici più alti di leptina e di HbA1c. I LADA mostravano invece livelli più elevati di IGF-1 e adiponectina, rispetto ai DM2.

Nell' analisi univariata le IGF-1 mostravano una correlazione inversa e statisticamente significativa con l' età, il BMI e con la leptina e una relazione diretta con l' adiponectina (Tabella 2 e figura 3). Dopo aver corretto per i fattori confondenti, le IGF-1 si confermavano inversamente proporzionali all' età e al BMI e direttamente proporzionali ai livelli di adiponectina. La leptina non risultava invece associata (Tabella 3).

Discussione

I risultati del nostro studio effettuato su un totale di 300 soggetti, 100 pazienti con LADA, 100 pazienti con DM2 e 100 controlli sani, popolazioni omogenee per età e sesso, hanno dimostrato che le concentrazioni plasmatiche di adiponectina e di leptina sono significativamente associate con il valore di BMI. I soggetti con elevato BMI hanno livelli di adiponectina inferiori e livelli di leptina maggiori quando paragonati ai soggetti con valori di BMI minori. In particolare, i pazienti con LADA presentavano un valore BMI inferiore a quello osservato nei pazienti con DM2 con livelli di adiponectina significativamente maggiori. I dati, nel complesso, dimostrano la presenza di sostanziali differenze morfologiche e funzionali in questi due tipi di diabete. Precedenti ricerche hanno infatti dimostrato, attraverso l'utilizzo di parametri metabolici ed antropometrici, che la prevalenza di sindrome metabolica è mediamente più bassa nei pazienti con LADA rispetto al DM2. Ancora più recenti ricerche effettuate in differenti popolazioni europee hanno ulteriormente confermato una ridotta prevalenza di sindrome metabolica nel LADA quando paragonata al DM2 (95,96). In particolare i pazienti LADA presentavano valori di circonferenza della vita nettamente inferiori ai valori dei DM2. La misura della circonferenza della vita, come è noto, è un indice antropometrico il quale correla in maniera lineare con la entità della espansione del tessuto adiposo viscerale. Nella pratica clinica sostituisce ampiamente il dato morfologico ottenibile con la diagnostica per immagini ed è universalmente accettato come parametro essenziale per la definizione di sindrome metabolica. I dati disponibili, nell'insieme, dimostrerebbero la presenza di una maggiore rappresentazione del grasso viscerale nel DM2 rispetto al LADA. Questa evidenza contribuirebbe, in definitiva, alla differente storia naturale di questi due tipi di diabete.

La obesità viscerale è infatti una componente importante del complesso fenotipo clinico che include insulino-resistenza, DM2, aterosclerosi, ipertensione, infiammazione subclinica e contribuisce in maniera significativa alla patogenesi delle malattie correlate alla obesità ed in

particolare alla disfunzione metabolica (30,32). Questi meccanismi sono mediati dalle numerose sostanze bioattive prodotte dal tessuto adiposo (adipociti, matrice connettivale, cellule stromavascolari e cellule immunitarie), e dalla alterata espressione tissutale di questi fattori. La produzione di molte adipochine è up-regolata nella obesità: tali modifiche non hanno solo effetti locali paracrini, ma si accompagnano a un aumento delle loro concentrazioni sieriche con effetti metabolici sistemici.

I risultati della nostra ricerca hanno dimostrato differenze nelle concentrazioni plasmatiche di leptina e di adiponectina nelle due popolazioni diabetiche studiate. La leptina, prodotta dal gene *ob*, e secreta prevalentemente dagli adipociti del sottocutaneo, regola il comportamento alimentare a livello del sistema nervoso centrale e agisce come molecola proinfiammatoria. I livelli circolanti dell'ormone correlano positivamente con la massa adiposa indicando la presenza di una leptino-resistenza a livello centrale. Individui obesi hanno infatti alti livelli circolanti dell'ormone senza che si manifesti, in questi pazienti, l'effetto anoressante della molecola. Nel nostro studio i livelli circolanti di questo ormone, correlando con il BMI, confermano la presenza di una maggiore componente adiposa nel DM2 rispetto al LADA.

I livelli della adiponectina, viceversa, sono risultati più elevati nel LADA. Questi dati sono in relazione inversa con il BMI e con il ridotto grado di obesità trovato in questi pazienti. L'adiponectina, prodotta pressoché esclusivamente dagli adipociti, è ridotta nella sindrome metabolica e viene attualmente considerato come un fattore di rischio indipendente per lo sviluppo di DM2, e per le complicanze cardiovascolari della sindrome. I meccanismi di questa correlazione inversa tra entità del tessuto adiposo viscerale e le concentrazioni sieriche dell'ormone non sono state completamente chiarite. E' possibile che la produzione di adiponectina da parte degli adipociti sia inibita dalle citochine pro-infiammatorie, come il TNF- α e la IL-6, sovraesprese nella disfunzione dell'adipocita. Altri possibili meccanismi possono essere rappresentati dallo stress ossidativo e dalla ipossia che si verrebbe a sviluppare

nel tessuto adiposo secondario alla espansione della massa adipocitaria. La downregulation della sua espressione da parte degli adipociti disfunzionali che è associata alla obesità concorrerebbe in maniera significativa alla patogenesi della disfunzione metabolica presente in questa condizione clinica.

La relazione tra l'asse GH-IGF-1 e le adipochine non è chiara ed i risultati appaiono non univoci. I livelli di adiponectina sono risultati normali o ridotti in corso di acromegalia nonostante la presenza, in questa malattia, di insulino-resistenza. Il trattamento con GH in soggetti con carenza dell'ormone determina un aumento della adiponectina. Queste evidenze sarebbero legate all'effetto lipolitico del GH con conseguente riduzione della massa adipocitaria viscerale. I risultati della presente ricerca indicano chiaramente una relazione positiva tra i livelli di IGF-1 ed adiponectina nel LADA e nel DM2. Tuttavia, i livelli di IGF-1 e di adiponectina sono risultati significativamente maggiori nel LADA rispetto al DM2. Poiché le concentrazioni ematiche della IGF-1 sono correlate positivamente con la secrezione ipofisaria di GH e con la produzione giornaliera dell'ormone, i dati, nel loro complesso, suggeriscono una differente attività dell'asse GH-IGF-1 nelle due popolazioni diabetiche studiate. Questi risultati, d'altra parte, sono in accordo con il differente valore di BMI e di leptina circolante (marcatore della massa adiposa) riscontrati nei due tipi di diabete. Entrambi questi parametri presentano una correlazione inversa con i valori di IGF-1. La maggiore concentrazione plasmatica di adiponectina presente nei pazienti con LADA è verosimilmente secondaria alla ridotta massa viscerale presente in questi pazienti. Dati preliminari sulla composizione corporea studiata mediante metodica DEXA hanno infatti dimostrato una differente composizione distrettuale del grasso nel LADA rispetto al DM2.

I meccanismi coinvolti nella ridotta attività dell'asse GH-IGF-1 nella obesità viscerale non sono chiari. E' possibile che anche nella specie umana questa alterazione sia mediata a livello

centrale, forse attraverso una attivazione dei neuroni somatostatinerfici, dalle citochine proinfiammatorie (p.e., IL-6, TNF α) prodotte e secrete in eccesso dagli adipociti.

La correlazione positiva tra concentrazioni plasmatiche di IGF-1 e di adiponectina dimostrata nel presente studio possono rappresentare un altro meccanismo verosimilmente neuroendocrino coinvolto nella regolazione dell'asse GH-IGF-1.

In effetti recenti ricerche sperimentali hanno dimostrato che la adiponectina regola la secrezione ormonale e la espressione genica in due linee cellulari ipofisarie: le somatotrope e le gonadotrope. Sempre a livello ipofisario, nel ratto e nell'uomo, sono espressi sia la adiponectina che i suoi recettori AdipoR1 e AdipoR2, indicando la esistenza di un sistema regolatorio locale per questa adipochina nella ipofisi. L'adiponectina inoltre stimola la espressione a livello della ipofisi del recettore per il GHRH e per la Ghrelina. Queste evidenze, nel loro complesso, suggeriscono che la ipofisi costituisce un rilevante target di azione della adiponectina conferendo a questa adipochina un ruolo di mediazione nella regolazione fisiologica del metabolismo e della crescita.

La associazione positiva tra i livelli IGF-1 e di adiponectina dimostrata nel presente studio suggeriscono un ruolo di questa adiponectina nel controllo fisiologico dell'asse GH-IGF-1. In particolare, la secrezione della adiponectina da parte degli adipociti viscerali potrebbe anche avere un ruolo protettivo sulla espansione incontrollata della massa adiposa. Questo ruolo potrebbe essere mediato da una secrezione non alterata del GH. Nel DM2, viceversa, i ridotti livelli di adiponectina e di IGF-1 testimoniano una secrezione alterata di GH: Questo fenomeno, associato ad un ridotto effetto lipolitico dell'ormone, tenderebbe ad automantenersi potrebbe contribuire alla espansione del tessuto adiposo ed alla disregolazione dello stesso.

In conclusione i nostri dati dimostrano la esistenza di una correlazione negativa tra i livelli circolanti di IGF-1 e BMI nel LADA e nel DM2. Viceversa, la esistenza di una correlazione

positiva tra adiponectina circolante e IGF-1 plasmatica suggerisce la partecipazione della adipochina nel controllo secretorio del GH e, contestualmente, conferirebbe un ruolo protettivo, GH-mediato, della adiponectina sulla disregolazione della massa adiposa viscerale.

Voci Bibliografiche

- 1) Frohman LA, Burek L, Stachura MA. Characterization of growth hormone of different molecular weights in rat, dog and human pituitaries. *Endocrinology*. 1972 Jul;91(1):262-9.
- 2) Miller WL, Eberhardt NL. Structure and evolution of the growth hormone gene family. *Endocr Rev*. 1983 Spring;4(2):97-130.
- 3) Frankenne F, Closset J, Gomez F, Scippo ML, Smal J, Hennen G. The physiology of growth hormones (GHs) in pregnant women and partial characterization of the placental GH variant. *J Clin Endocrinol Metab*. 1988 Jun;66(6):1171-80.
- 4) Cunningham BC, Ultsch M, De Vos AM, Mulkerrin MG, Clauser KR, Wells JA. Dimerization of the extracellular domain of the human growth hormone receptor by a single hormone molecule. *Science*. 1991 Nov 8;254(5033):821-5.
- 5) Müller EE, Locatelli V, Cocchi D. Neuroendocrine control of growth hormone secretion. *Physiol Rev*. 1999 Apr;79(2):511-607.
- 6) Brazeau P, Vale W, Burgus R, Ling N, Butcher M, Rivier J, Guillemin R. Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. *Science*. 1973 Jan 5;179(4068):77-9.
- 7) Shen LP, Rutter WJ. Sequence of the human somatostatin I gene. *Science*. 1984 Apr 13;224(4645):168-71.
- 8) Patel YC. Somatostatin and its receptor family. *Front Neuroendocrinol*. 1999 Jul;20(3):157-98.
- 9) Badway AC, Strowski MZ. Delineating somatostatin's neuronal actions. Blake AD, *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord*. 2004 Apr;3(2):153-60.
- 10) Rivier J, Spiess J, Thorner M, Vale W. Characterization of a growth hormone-releasing factor from a human pancreatic islet tumour. *Nature*. 1982 Nov 18;300(5889):276-8.
- 11) Frohman LA, Downs TR, Chomeczynski P, Frohman MA. Growth hormone-releasing

hormone: structure, gene expression and molecular heterogeneity. *Acta Paediatr Scand Suppl.* 1990;367:81-6.

12) Gaylinn BD, Harrison JK, Zysk JR, Lyons CE, Lynch KR, Thorner MO. Molecular cloning and expression of a human anterior pituitary receptor for growth hormone-releasing hormone. *Mol Endocrinol.* 1993 Jan;7(1):77-84.

13) Howard AD, Feighner SD, Cully DF, Arena JP, Liberators PA, Rosenblum CI, Hamelin M, Hreniuk DL, Palyha OC, Anderson J, Paress PS, Diaz C, Chou M, Liu KK, McKee KK, Pong SS, Chaung LY, Elbrecht A, Dashkevich M, Heavens R, Rigby M, Sirinathsinghji DJ, Dean DC, Melillo DG, Patchett AA, Nargund R, Griffin PR, DeMartino JA, Gupta SK, Schaeffer JM, Smith RG, Van der Ploeg LH. A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science.* 1996 Aug 16;273(5277):974-7.

14) Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature.* 1999 Dec 9;402(6762):656-60.

15) Müller EE. Cholinergic function and neural control of GH secretion. A critical re-appraisal. *Eur J Endocrinol.* 1997 Oct;137(4):338-42.

16) Stubbs WA, Delitala G, Jones A, Jeffcoate WJ, Edwards CR, Ratter SJ, Besser GM, Bloom SR, Alberti KG. Hormonal and metabolic responses to an enkephalin analogue in normal man. *Lancet.* 1978 Dec 9;2(8102):1225-7.

17) Delitala G, Grossman A, Besser GM. Opiate peptides control growth hormone through a cholinergic mechanism in man. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1983 Apr;18(4):401-5.

18) Shoshana Y, Martin LA Insulin-like growth factor 1 physiology: lessons from mouse models. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2012 Jun;41(2):231-47.

19) Adamo ML, Neuenschwander S, LeRoith D, Roberts CT Jr. Structure, expression, and

- regulation of the IGF-I gene. *Adv Exp Med Biol.* 1993;343:1-11.
- 20) Frystyk J, Skjaerbaek C, Dinesen B, Orskov H. Free insulin-like growth factors (IGF-I and IGF-II) in human serum. *FEBS Lett.* 1994 Jul 11;348(2):185-91.
- 21) Werner H, Bruchim I. The insulin-like growth factor-I receptor as an oncogene. *Arch Physiol Biochem.* 2009 May;115(2):58-71.
- 22) Werner H, Weinstein D, Bentov I. Similarities and differences between insulin and IGF-I: structures, receptors, and signalling pathways. *Arch Physiol Biochem.* 2008 Feb;114(1):17-22.
- 23) Baxter RC. Insulin-like growth factor (IGF)-binding proteins: interactions with IGFs and intrinsic bioactivities. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2000 Jun;278(6):E967-76.
- 24) Mohan S, Baylink DJ. IGF-binding proteins are multifunctional and act via IGF-dependent and -independent mechanisms. *J Endocrinol.* 2002 Oct;175(1):19-31.
- 25) Holly JM, Perks CM. Insulin-like growth factor physiology: what we have learned from human studies. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2012 Jun;41(2):249-63.
- 26) Cinti S. Adipocyte differentiation and transdifferentiation: plasticity of the adipose organ. *J Endocrinol Invest.* 2002 Nov;25(10):823-35.
- 27) Wells JC. Sexual dimorphism of body composition. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2007 Sep;21(3):415-30.
- 28) Wajchenberg BL. Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocr Rev.* 2000 Dec;21(6):697-738.
- 29) Björntorp P. Hormonal control of regional fat distribution. *Hum Reprod.* 1997 Oct;12 Suppl 1:21-5.
- 30) Tchernof A, Després JP. Pathophysiology of human visceral obesity: an update.

Physiol Rev. 2013 Jan;93(1):359-404.

- 31) Duvnjak L, Duvnjak M. The metabolic syndrome - an ongoing story. *J Physiol Pharmacol.* 2009 Dec;60 Suppl 7:19-24.
- 32) Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol.* 2011 Feb;11(2):85-97.
- 33) Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med.* 1998 Jul;15(7):539-53.
- 34) Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). *Circulation.* 2002 Dec 17;106(25):3143-421.
- 35) Alberti KG, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JI, Donato KA, Fruchart JC, James WP, Loria CM, Smith SC Jr; International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; International Association for the Study of Obesity. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation.* 2009 Oct 20;120(16):1640-5.
- 36) Glass AR. Endocrine aspects of obesity. *Med Clin North Am.* 1989 Jan;73(1):139-60.

- 37) Clasey JL, Weltman A, Patrie J, Weltman JY, Pezzoli S, Bouchard C, Thorner MO, Hartman ML. Abdominal visceral fat and fasting insulin are important predictors of 24-hour GH release independent of age, gender, and other physiological factors. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001 Aug;86(8):3845-52.
- 38) Weltman A, Despres JP, Clasey JL, Weltman JY, Wideman L, Kanaley J, Patrie J, Bergeron J, Thorner MO, Bouchard C, Hartman ML. Impact of abdominal visceral fat, growth hormone, fitness, and insulin on lipids and lipoproteins in older adults. *Metabolism.* 2003 Jan;52(1):73-80.
- 39) Makimura H, Stanley T, Mun D, You SM, Grinspoon S. The effects of central adiposity on growth hormone (GH) response to GH-releasing hormone-arginine stimulation testing in men. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008 Nov;93(11):4254-60.
- 40) Muoio DM, Lynis Dohm G. Peripheral metabolic actions of leptin. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2002 Dec;16(4):653-66.
- 41) Friedman JM, Halaas JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature.* 1998 Oct 22;395(6704):763-70.
- 42) Tartaglia LA. The leptin receptor. *J Biol Chem.* 1997 Mar 7;272(10):6093-6.
- 43) Bjørbaek C, Kahn BB. Leptin signaling in the central nervous system and the periphery. *Recent Prog Horm Res.* 2004;59:305-31.
- 44) Liu YL, Emilsson V, Cawthorne MA. Leptin inhibits glycogen synthesis in the isolated soleus muscle of obese (ob/ob) mice. *FEBS Lett.* 1997 Jul 14;411(2-3):351-5.
- 45) Wang Y, Kuropatwinski KK, White DW, Hawley TS, Hawley RG, Tartaglia LA, Baumann H. Leptin receptor action in hepatic cells. *J Biol Chem.* 1997 Jun 27;272(26):16216-23.

- 46) Kielar D, Clark JS, Ciechanowicz A, Kurzawski G, Sulikowski T, Naruszewicz M. Leptin receptor isoforms expressed in human adipose tissue. *Metabolism*. 1998 Jul;47(7):844-7.
- 47) Yildiz BO, Haznedaroglu IC. Rethinking leptin and insulin action: therapeutic opportunities for diabetes. *Int J Biochem Cell Biol*. 2006;38(5-6):820-30.
- 48) Nakano Y, Tobe T, Choi-Miura NH, Mazda T, Tomita M. Isolation and characterization of GBP28, a novel gelatin-binding protein purified from human plasma. *J Biochem*. 1996 Oct;120(4):803-12.
- 49) Hu E, Liang P, Spiegelman BM. AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *J Biol Chem*. 1996 May 3;271(18):10697-703.
- 50) Maeda K, Okubo K, Shimomura I, Funahashi T, Matsuzawa Y, Matsubara K. cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1). *Biochem Biophys Res Commun*. 1996 Apr 16;221(2):286-9.
- 51) Scherer PE, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Lodish HF. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem*. 1995 Nov 10;270(45):26746-9.
- 52) Koerner A, Kratzsch J, Kiess W. Adipocytokines: leptin--the classical, resistin--the controversial, adiponectin--the promising, and more to come. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2005 Dec;19(4):525-46.
- 53) Kadowaki T, Yamauchi T. Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocr Rev*. 2005 May;26(3):439-51.
- 54) Matsuzawa Y, Funahashi T, Kihara S, Shimomura I. Adiponectin and metabolic syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004 Jan;24(1):29-33.

- 55) Trujillo ME, Scherer PE. Adipose tissue-derived factors: impact on health and disease. *Endocr Rev.* 2006 Dec;27(7):762-78.
- 56) Lago F, Dieguez C, Gómez-Reino J, Gualillo O. The emerging role of adipokines as mediators of inflammation and immune responses. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2007 Jun-Aug;18(3-4):313-25.
- 57) Ouchi N, Shibata R, Walsh K. Cardioprotection by adiponectin. *Trends Cardiovasc Med.* 2006 Jul;16(5):141-6.
- 58) Fasshauer M, Paschke R. Regulation of adipocytokines and insulin resistance. *Diabetologia.* 2003 Dec;46(12):1594-603.
- 59) Nilsson L, Binart N, Bohlooly-Y M, Bramnert M, Egecioglu E, Kindblom J, Kelly PA, Kopchick JJ, Ormandy CJ, Ling C, Billig H. Prolactin and growth hormone regulate adiponectin secretion and receptor expression in adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005 Jun 17;331(4):1120-6.
- 60) Xu A, Chan KW, Hoo RL, Wang Y, Tan KC, Zhang J, Chen B, Lam MC, Tse C, Cooper GJ, Lam KS. Testosterone selectively reduces the high molecular weight form of adiponectin by inhibiting its secretion from adipocytes. *J Biol Chem.* 2005 May 6;280(18):18073-80.
- 61) Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, Patel HR, Ahima RS, Lazar MA. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature.* 2001 Jan 18;409(6818):307-12.
- 62) Jung HS, Park KH, Cho YM, Chung SS, Cho HJ, Cho SY, Kim SJ, Kim SY, Lee HK, Park KS. Resistin is secreted from macrophages in atheromas and promotes atherosclerosis. *Cardiovasc Res.* 2006 Jan;69(1):76-85.
- 63) Fukuhara A, Matsuda M, Nishizawa M, Segawa K, Tanaka M, Kishimoto K, Matsuki

Y, Murakami M, Ichisaka T, Murakami H, Watanabe E, Takagi T, Akiyoshi M, Ohtsubo T, Kihara S, Yamashita S, Makishima M, Funahashi T, Yamanaka S, Hiramatsu R, Matsuzawa Y, Shimomura I. Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin. *Science*. 2005 Jan 21;307(5708):426-30.

64) Sarzani R, Salvi F, Dessì-Fulgheri P, Rappelli A. Renin-angiotensin system, natriuretic peptides, obesity, metabolic syndrome, and hypertension: an integrated view in humans. *J Hypertens*. 2008 May;26(5):831-43.

65) Bomback AS, Klemmer PJ. Interaction of aldosterone and extracellular volume in the pathogenesis of obesity-associated kidney disease: a narrative review. *Am J Nephrol*. 2009;30(2):140-6.

66) Aso Y. Plasminogen activator inhibitor (PAI)-1 in vascular inflammation and thrombosis. *Front Biosci*. 2007 May 1;12:2957-66.

67) Hivert MF, Sullivan LM, Fox CS, Nathan DM, D'Agostino RB Sr, Wilson PW, Meigs JB. Associations of adiponectin, resistin, and tumor necrosis factor-alpha with insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008 Aug;93(8):3165-72.

68) Kern PA, Saghizadeh M, Ong JM, Bosch RJ, Deem R, Simsolo RB. The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue. Regulation by obesity, weight loss, and relationship to lipoprotein lipase. *J Clin Invest*. 1995 May;95(5):2111-9.

69) Cawthorn WP, Sethi JK. TNF-alpha and adipocyte biology. *FEBS Lett*. 2008 Jan 9;582(1):117-31.

70) Teruel T, Hernandez R, Lorenzo M. Ceramide mediates insulin resistance by tumor necrosis factor-alpha in brown adipocytes by maintaining Akt in an inactive dephosphorylated state. *Diabetes*. 2001 Nov;50(11):2563-71.

71) Fernández-Veledo S, Hernandez R, Teruel T, Mas JA, Ros M, Lorenzo M. Ceramide

mediates TNF-alpha-induced insulin resistance on GLUT4 gene expression in brown adipocytes. *Arch Physiol Biochem.* 2006 Feb;112(1):13-22.

72) Kern PA, Di Gregorio GB, Lu T, Rassouli N, Ranganathan G. Adiponectin expression from human adipose tissue: relation to obesity, insulin resistance, and tumor necrosis factor-alpha expression. *Diabetes.* 2003 Jul;52(7):1779-85.

73) Degawa-Yamauchi M, Moss KA, Bovenkerk JE, Shankar SS, Morrison CL, Lelliott CJ, Vidal-Puig A, Jones R, Considine RV. Regulation of adiponectin expression in human adipocytes: effects of adiposity, glucocorticoids, and tumor necrosis factor alpha. *Obes Res.* 2005 Apr;13(4):662-9.

74) Park HS, Park JY, Yu R. Relationship of obesity and visceral adiposity with serum concentrations of CRP, TNF-alpha and IL-6. *Diabetes Res Clin Pract.* 2005 Jul;69(1):29-35.

75) Fontana L, Eagon JC, Trujillo ME, Scherer PE, Klein S. Visceral fat adipokine secretion is associated with systemic inflammation in obese humans. *Diabetes.* 2007 Apr;56(4):1010-3.

76) Kotelevtsev Y, Holmes MC, Burchell A, Houston PM, Schmol D, Jamieson P, Best R, Brown R, Edwards CR, Seckl JR, Mullins JJ. 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 knockout mice show attenuated glucocorticoid-inducible responses and resist hyperglycemia on obesity or stress. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Dec 23;94(26):14924-9.

77) Masuzaki H, Flier JS. Tissue-specific glucocorticoid reactivating enzyme, 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (11 beta-HSD1)--a promising drug target for the treatment of metabolic syndrome. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord.* 2003 Dec;3(4):255-62.

- 78) Côté M, Matias I, Lemieux I, Petrosino S, Alméras N, Després JP, Di Marzo V. Circulating endocannabinoid levels, abdominal adiposity and related cardiometabolic risk factors in obese men. *Int J Obes (Lond)*. 2007 Apr;31(4):692-9.
- 79) Scheen AJ. The endocannabinoid system: a promising target for the management of type 2 diabetes. *Curr Protein Pept Sci*. 2009 Feb;10(1):56-74.
- 80) Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. 1997 Jul;20(7):1183-97.
- 81) Genuth S, Alberti KG, Bennett P, Buse J, Defronzo R, Kahn R, Kitzmiller J, Knowler WC, Lebovitz H, Lernmark A, Nathan D, Palmer J, Rizza R, Saudek C, Shaw J, Steffes M, Stern M, Tuomilehto J, Zimmet P; Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Follow-up report on the diagnosis of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2003 Nov;26(11):3160-7.
- 82) Diagnosis and classification of diabetes mellitus. American Diabetes Association. *Diabetes Care*. 2011 Jan;34 Suppl 1:S62-9.
- 83) La Loggia A. Organization of paediatric diabetes units in Italy. *Acta Biomed*. 2005;76 Suppl 3:70-4.
- 84) Martino GV, Tappaz ML, Braghi S, Dozio N, Canal N, Pozza G, Bottazzo GF, Grimaldi LM, Bosi E. Autoantibodies to glutamic acid decarboxylase (GAD) detected by an immuno-trapping enzyme activity assay: relation to insulin-dependent diabetes mellitus and islet cell antibodies. *J Autoimmun*. 1991 Dec;4(6):915-23.
- 85) Kahn CR. Banting Lecture. Insulin action, diabetogenesis, and the cause of type II diabetes. *Diabetes*. 1994 Aug;43(8):1066-84.
- 86) Reaven GM. Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*. 1988 Dec;37(12):1595-607.

- 87) Irvine WJ, McCallum CJ, Gray RS, Campbell CJ, Duncan LJ, Farquhar JW, Vaughan H, Morris PJ. Pancreatic islet-cell antibodies in diabetes mellitus correlated with the duration and type of diabetes, coexistent autoimmune disease, and HLA type. *Diabetes*. 1977 Feb;26(2):138-47.
- 88) Tuomi T, Groop LC, Zimmet PZ, Rowley MJ, Knowles W, Mackay IR. Antibodies to glutamic acid decarboxylase reveal latent autoimmune diabetes mellitus in adults with a non-insulin-dependent onset of disease. *Diabetes*. 1993 Feb;42(2):359-62.
- 89) Zimmet PZ, Tuomi T, Mackay IR, Rowley MJ, Knowles W, Cohen M, Lang DA. Latent autoimmune diabetes mellitus in adults (LADA): the role of antibodies to glutamic acid decarboxylase in diagnosis and prediction of insulin dependency. *Diabet Med*. 1994 Apr;11(3):299-303.
- 90) Pozzilli P, Di Mario U. Autoimmune diabetes not requiring insulin at diagnosis (latent autoimmune diabetes of the adult): definition, characterization, and potential prevention. *Diabetes Care*. 2001 Aug;24(8):1460-7.
- 91) Hosszúfalusi N, Vatay A, Rajczy K, Prohászka Z, Pozsonyi E, Horváth L, Grosz A, Gerő L, Madácsy L, Romics L, Karádi I, Füst G, Pánczél P. Similar genetic features and different islet cell autoantibody pattern of latent autoimmune diabetes in adults (LADA) compared with adult-onset type 1 diabetes with rapid progression. *Diabetes Care*. 2003 Feb;26(2):452-7.
- 92) Isomaa B, Almgren P, Henricsson M, Taskinen MR, Tuomi T, Groop L, Sarelin L. Chronic complications in patients with slowly progressing autoimmune type 1 diabetes (LADA). *Diabetes Care*. 1999 Aug;22(8):1347-53.
- 93) Lohmann T, Kellner K, Verlohren HJ, Krug J, Steindorf J, Scherbaum WA, Seissler J. Titre and combination of ICA and autoantibodies to glutamic acid decarboxylase

discriminate two clinically distinct types of latent autoimmune diabetes in adults (LADA). *Diabetologia*. 2001 Aug;44(8):1005-10.

- 94) Maioli M, Pes GM, Delitala G, Puddu L, Falorni A, Tolu F, Lampis R, Orrù V, Secchi G, Cicalò AM, Floris R, Madau GF, Pilosu RM, Whalen M, Cucca F. Number of autoantibodies and HLA genotype, more than high titers of glutamic acid decarboxylase autoantibodies, predict insulin dependence in latent autoimmune diabetes of adults. *Eur J Endocrinol*. 2010 Oct;163(4):541-9.
- 95) Xu A, Wong LC, Wang Y, Xu JY, Cooper GJ, Lam KS. Chronic treatment with growth hormone stimulates adiponectin gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *FEBS Lett*. 2004 Aug 13;572(1-3):129-34.
- 96) Wölfling B, Neumeier M, Buechler C, Aslanidis C, Schölmerich J, Schäffler A. Interfering effects of insulin, growth hormone and glucose on adipokine secretion. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2008 Jan;116(1):47-52.
- 97) Lanes R, Soros A, Gunczler P, Paoli M, Carrillo E, Villaroel O, Palacios A. Growth hormone deficiency, low levels of adiponectin, and unfavorable plasma lipid and lipoproteins. *J Pediatr*. 2006 Sep;149(3):324-9.
- 98) Svensson J, Herlitz H, Lundberg PA, Johannsson G. Adiponectin, leptin, and erythrocyte sodium/lithium countertransport activity, but not resistin, are related to glucose metabolism in growth hormone-deficient adults. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005 Apr;90(4):2290-6.
- 99) Festen DA, van Toorenenbergen A, Duivenvoorden HJ, Hokken-Koelega AC. Adiponectin levels in prepubertal children with Prader-Willi syndrome before and during growth hormone therapy. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007 Apr;92(4):1549-54.
- 100) Psilopanagiotti A, Papadaki H, Kranioti EF, Alexandrides TK, Varakis JN.

Expression of adiponectin and adiponectin receptors in human pituitary gland and brain. *Neuroendocrinology*. 2009;89(1):38-47.

- 101) Steyn FJ, Boehme F, Vargas E, Wang K, Parkington HC, Rao JR, Chen C. Adiponectin regulate growth hormone secretion via adiponectin receptor mediated Ca(2+) signalling in rat somatotrophs in vitro. *J Neuroendocrinol*. 2009 Aug;21(8):698-704.
- 102) Makimura H, Stanley TL, Chen CY, Branch KL, Grinspoon SK. Relationship of adiponectin to endogenous GH pulse secretion parameters in response to stimulation with a growth hormone releasing factor. *Growth Horm IGF Res*. 2011 Jun;21(3):155-9.

Figura 1. Neuroregolazione dell' asse GH-IGF-1

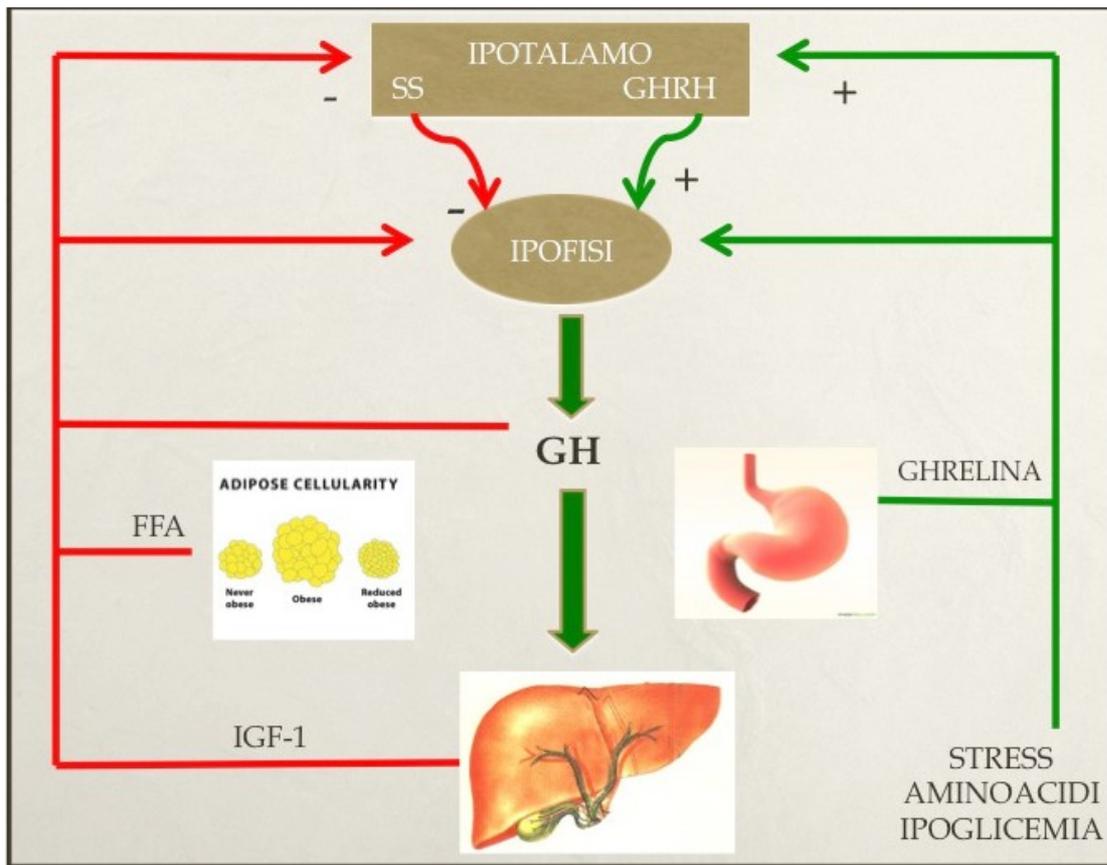


Figura 2. Ruolo dell' adiposità intra-addominale e degli acidi grassi liberi nell' insulino-resistenza.

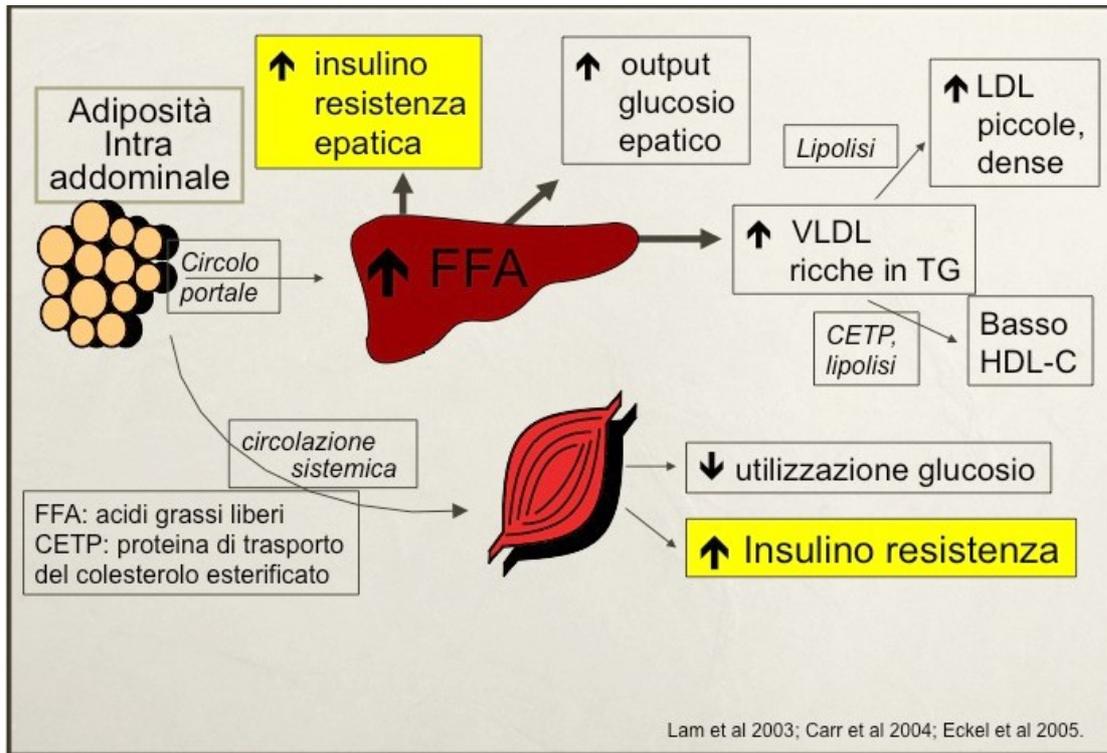


Tabella 1. Caratteristiche basali dei gruppi.

Variabile	LADA	DM2	Controlli sani	P value
Età (anni)	55.7 ± 9.5	57.1 ± 8.6	56.2 ± 11.2	P= 0.62 (ns)
Sesso (M/F)	50/50	50/50	50/50	
BMI (Kg/m ²)	27.6 ± 4.0	31.4 ± 3.7	25.6 ± 4.2	P <0.001
HbA1c* (%)	6.3 (4.3 - 12)	7.1 (5.1 - 10)	5.2 (4.3 - 6.3)	P <0.001
Adiponectina (ug/ml)	13.7 ± 5.3	10.3 ± 3.8	16.1 ± 5.7	P <0.001
Leptina* (ng/ml)	19.2 (2.15 - 86.7)	28.3 (11.3 - 88.4)	16.9 (3.7 - 49.2)	P <0.001
IGF-1 (ng/ml)	133 ± 38	115 ± 28	140 ± 35	P <0.001

BMI= indice di massa corporea. HbA1c = emogloblina glicata. IGF-1= insulin-like growth factor-1

Tabella 2. Correlazione tra i livelli di IGF-1 con le variabili indipendenti.

Variabile	LADA		DM2		Controlli	
	r	P value	r	P value	r	P value
Età	- 0.84	<0.001	- 0.83	<0.001	- 0.82	<0.001
Leptina	- 0.29	0.004	0.03	0.76	- 0.27	0.005
Adiponectina	0.36	<0.001	0.69	<0.001	0.44	<0.001
BMI	- 0.49	<0.001	- 0.36	<0.001	- 0.54	<0.001
HbA1c	0.10	0.35	- 0.04	0.68	- 0.06	0.57

Figura 3. Correlazione tra i livelli di adiponectina e i livelli di IGF-1 nei tre gruppi.

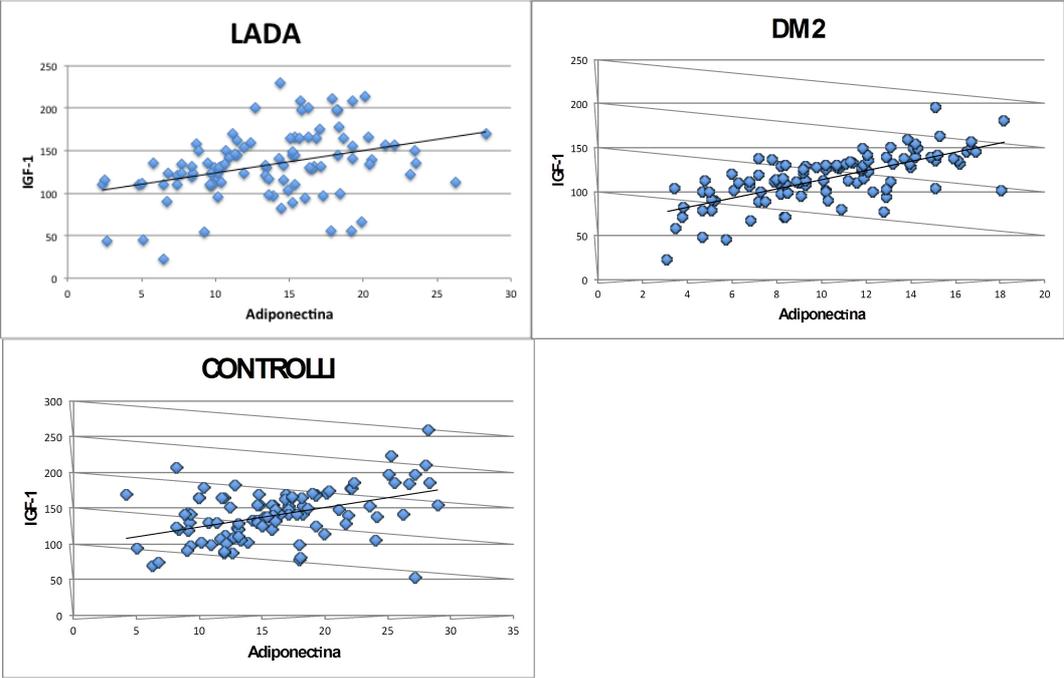


Tabella 3. Analisi di regressione lineare tra IGF-1 e le altre variabili indipendenti.

Varabile	LADA		DM2		Controlli	
	β coefficient	P value	β coefficient	P value	β coefficient	P value
Età	- 3.12	<0.001	- 2.16	<0.001	- 2.18	<0.001
Leptina	0.10	NS	0.008	NS	0.20	NS
Adiponectina	1.27	<0.01	1.63	<0.01	1.00	<0.01
BMI	- 1.77	<0.01	- 1.3	<0.01	- 1.36	<0.05