

Il potenziale di membrana mitocondriale leucocitario nelle famiglie di pazienti con diabete mellito tipo 1



E. Matteucci¹, M. Ghimenti², O. Giampietro¹

elena.matteucci@med.unipi.it

¹ Dipartimento di Medicina Interna, Università di Pisa; ² Dipartimento di Patologia Sperimentale, Biotecnologie Mediche, Infettivologia ed Epidemiologia, Università di Pisa.

Parole chiave: diabete tipo 1; potenziale di membrana mitocondriale; JC-1; respiratory burst activity; leucociti
Key words: type 1 diabetes; mitochondrial membrane potential; JC-1; respiratory burst activity; leukocytes

Il Giornale di AMD, 2011;14:169-171

Riassunto

Il corretto funzionamento cellulare richiede il mantenimento del potenziale di membrana mitocondriale (MMP) che dipende dall'attività della catena di trasporto degli elettroni. La disfunzione mitocondriale è ritenuta d'importanza patogenetica nello sviluppo della malattia diabetica e delle sue complicanze. Abbiamo pertanto misurato il valore del MMP leucocitario mediante il fluorocromo mitocondriale 5,5',6,6'-tetra chloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolyl-carbocyanine iodide (JC-1) e la citometria a flusso in 20 pazienti con diabete mellito tipo 1, 20 loro fratelli non diabetici e 25 soggetti sani di controllo senza parentela di primo grado per diabete tipo 1. Abbiamo anche misurato sugli stessi campioni i livelli intracellulari di reactive oxygen species e la risposta ossidativa (respiratory burst activity) al phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA).

I pazienti con diabete mellito tipo 1 avevano livelli superiori alla norma di glicemia e HbA1c. I loro fratelli differivano dai controlli per BMI e glicemia a digiuno lievemente maggiori, HbA1c e homeostasis model assessment of insulin sensitivity (HOMA-IS) minori. Il valore del MMP leucocitario nei pazienti con diabete mellito tipo 1 e nei loro fratelli non diabetici era elevato in confronto a quello riscontrato nei soggetti di controllo; la glicemia a digiuno era l'unica variabile biologica correlata.

Le implicazioni funzionali dell'iperpolarizzazione mitocondriale (glucosio-dipendente) osservata, probabilmente diverse nei diversi tipi cellulari, richiedono di essere investigate approfonditamente.

Summary

Proper cellular function requires the maintenance of mitochondrial membrane potential (MMP) sustained by the electron transport chain. Mitochondrial dysfunction is believed to play a role in the development of diabetes and diabetic complications. We have used the mitochondrial indicator 5,5',6,6'-tetra chloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolyl-carbocyanine iodide (JC-1) in conjunction with flow cytometry to measure the MMP in peripheral blood granulocytes from 20 patients with type 1 diabetes, their 20 non-diabetic sibs, and 25 healthy subjects without family history of type 1 diabetes. The intracellular levels of reactive oxy-

gen species and the respiratory burst activity (in the presence of phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA) were also measured.

Leukocyte MMP was elevated in type 1 diabetes patients and their non-diabetic sibs (who had higher BMI and fasting plasma glucose, whereas lower and HbA1c levels and homeostasis model assessment of insulin sensitivity, HOMA-IS) compared with healthy subjects; fasting plasma glucose was the only correlate of MMP.

The functional implications of this (glucose-dependent) mitochondrial hyperpolarisation, probably different among different cells, will require extensive investigation.

Introduzione

Il corretto funzionamento cellulare richiede il mantenimento del potenziale di membrana mitocondriale (MMP) che dipende dall'attività della catena di trasporto degli elettroni¹. La disfunzione mitocondriale presente nel diabete mellito è ritenuta d'importanza patogenetica nello sviluppo della malattia e delle sue complicanze (in parte forse mediata dall'aumentata produzione di radicali liberi dell'ossigeno, ROS)². Da quando è stato possibile misurare il MMP in ambito clinico mediante l'uso di fluorocromi e cellule ematiche³, sue alterazioni sono state riscontrate in numerose patologie croniche, incluso il diabete tipo 2⁴. Abbiamo misurato il valore del MMP dei granulociti circolanti nelle famiglie di pazienti con diabete mellito tipo 1.

Metodi

Sono stati reclutati 20 pazienti con diabete mellito tipo 1 (durata di malattia 23±15 anni, 0.6±0.2 IU/kg), 20 loro fratelli non diabetici e 25 soggetti sani di controllo senza parentela di primo grado per diabete tipo 1. Nessuno dei fratelli o dei controlli presentava segni clinici di malattia o assumeva farmaci. La visita medica prevedeva: anamnesi personale e familiare, esame obiettivo. Erano calcolati sia l'indice di massa corporea

(BMI, kg/m²) che la pressione arteriosa media (MBP). Le analisi chimico-fisiche di routine includevano: emocromo, glicemia a digiuno (FPG), insulinemia a digiuno e calcolo del homeostasis model assessment of insulin sensitivity (HOMA-IS), HbA1c, creatinemia, lipidi, bilirubina, enzimi epatici, e rapporto albumina/creatinina nelle urine.

Abbiamo usato il fluorocromo mitocondriale 5,5',6,6'-tetra chloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolyl-carbocyanine iodide (JC-1) e la citometria a flusso (FACScalibur, BD Biosciences, Milano) per misurare il MMP nei neutrofilii di campioni di sangue venoso⁵. Abbiamo anche misurato sugli stessi campioni i livelli intracellulari di ROS mediante il fluorocromo dihydorhodamine 123 (DHR) e la risposta ossidativa (respiratory burst activity) al phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)⁵.

Risultati

Dal punto di vista clinico, i tre gruppi di soggetti non differivano per età, sesso, e pressione arteriosa media. I fratelli dei diabetici tipo 1 avevano un BMI lievemente superiore rispetto ai controlli (Tabella 1). Dal punto di vista biochimico, i pazienti con diabete tipo 1 avevano livelli superiori alla norma di glicemia e HbA1c; i loro fratelli differivano dai controlli per glicemia a digiuno lievemente maggiore ($p < 0.05$, Figura 1), HbA1c ($p < 0.01$) e HOMA-IS (0.48 ± 0.20 vs 0.70 ± 0.43 , $p < 0.05$) minori. Il valore del MMP leucocitario nei 20 pazienti con diabete tipo 1 ($p < 0.01$) e nei loro 20 fratelli non diabetici ($p < 0.05$) era elevato in confronto a quello riscontrato nei 25 soggetti di controllo (Tabella 1 e Figura 2). La glicemia a digiuno era l'unica variabile biologica che correlava con il MMP (r 0.30, coefficiente 1.35, errore standard 0.55, $p = 0.017$, Figura 3). L'intensità della

Tabella 1. Caratteristiche cliniche e biochimiche dei soggetti reclutati.

Caratteristica	Controlli	Diabetici tipo 1	Fratelli
F/M	16/9	12/8	12/8
Età (anni)	46±12	45±11	45±11
BMI (kg/m ²)	24±3	25±4	26±5*
MBP (mmHg)	92±5	95±10	94±14
FPG (mmol/L)	4.9±0.4	10.6±3.7¶	5.2±0.5*#
HbA1c (%)	5.3±0.3	8.7±1.3¶	5.1±0.3*#
MMP (%)	54.9±13.3	68.1±15.4•	64.8±14.0*
MFI basale	6.2±1.4	7.0±1.8	7.2±2.3
MFI dopo PMA	872±378	888±472	617±303*†

I dati sono espressi come media±SD. * $P < 0.05$, • $P < 0.01$, ¶ $P < 0.001$ nel confronto di diabetici tipo 1 o loro fratelli vs. controlli; † $P < 0.05$, # $P < 0.01$, # $P < 0.001$ nel confronto di fratelli vs. diabetici tipo 1.

BMI, indice di massa corporea; MBP, pressione arteriosa media; FPG, glicemia a digiuno; MMP, potenziale di membrana mitocondriale; MFI, indice medio di fluorescenza che esprime la produzione di ROS in condizioni basali o dopo stimolazione con PMA.

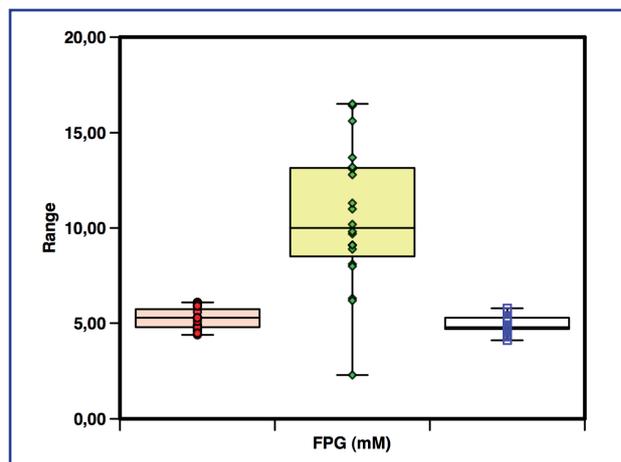


Figura 1. Box-plot che rappresenta mediana, 50% centrale dei dati (box) e la distribuzione dei valori di glicemia media a digiuno (FPG) espressi in mmol/l nei 3 gruppi: diabetici tipo 1 (rombo verde), fratelli (cerchio rosso), controlli (quadrato blu).

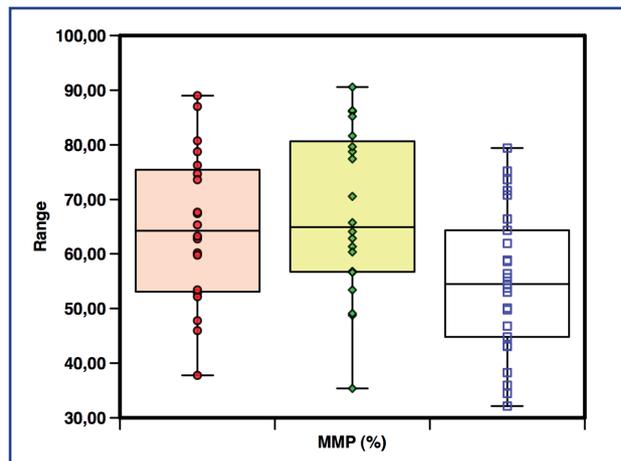


Figura 2. Box-plot che rappresenta mediana, 50% centrale dei dati (box) e la distribuzione dei valori del potenziale leucocitario di membrana mitocondriale (MMP%) nei 3 gruppi: diabetici tipo 1 (rombo verde), fratelli (cerchio rosso), controlli (quadrato blu).

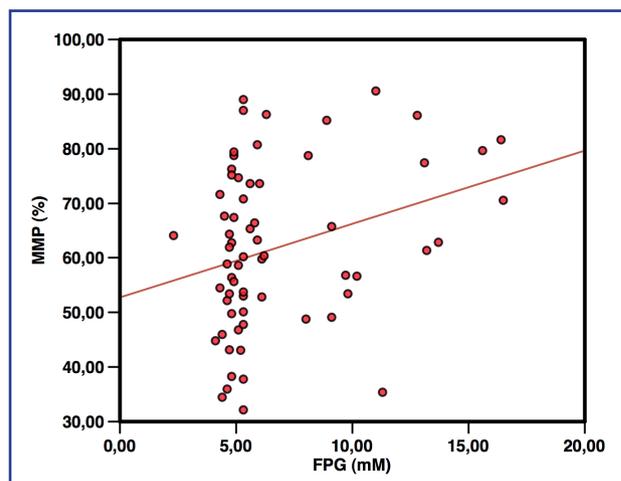


Figura 3. Regressione lineare della glicemia a digiuno (FPG) vs. il potenziale leucocitario di membrana mitocondriale (MMP%).

fluorescenza emessa dalla DHR (substrato lipofilo sensibile all'ossidazione) nei leucociti in condizioni basali era sovrapponibile nei tre gruppi di soggetti studiati; al contrario, i fratelli dei diabetici tipo 1 avevano una minore risposta ossidativa al PMA (Tabella 1).

Conclusioni

Questo è il primo studio che evidenzia la presenza d'iperpolarizzazione mitocondriale nei leucociti circolanti dei diabetici tipo 1 e dei loro fratelli che, seppure non diabetici, presentano una ridotta sensibilità insulinica. La combinazione di BMI borderline, glicemia media a digiuno superiore ai controlli, minore indice HOMA-IS e minori livelli di HbA1c, suggerisce che nei fratelli dei diabetici tipo 1 coesistono una ridotta velocità basale di utilizzazione del glucosio (alterata glicemia a digiuno) con un'accelerata utilizzazione postprandiale insulinomediata ⁵. Il riscontro citofluorimetrico dell'iperpolarizzazione mitocondriale suggerisce inoltre una sincronizzazione delle oscillazioni spontanee dei flussi metabolici e del MMP, che sono state osservate nella rete mitocondriale cellulare ⁶. Nelle cellule endoteliali sottoposte a stimolo iperglicemico, l'iperproduzione di radicali è associata ad accelerazione del ciclo di Krebs e a iperpolarizzazione della membrana mitocondriale ⁷. Un aumento della produzione di radicali in condizioni di stress metabolico, già ampiamente documentato nelle famiglie di diabetici tipo 1 ⁸, potrebbe quindi contribuire a tale risultato.

Il riscontro nei fratelli di una ridotta risposta ossidativa al PMA è di difficile interpretazione, ma potrebbe essere messo in relazione con la presunta (sulla base dei valori di HbA1c) presenza di livelli di glicemia postprandiale inferiori alla norma. Infatti, il respiratory burst activity leucocitaria è soppresso dall'ipoglicemia e questo fenomeno è maggiormente pronunciato nei soggetti non diabetici ⁹.

Riteniamo che le implicazioni funzionali dell'iperpolarizzazione mitocondriale (glucosio-dipendente) osservata, probabilmente diverse nei diversi tipi cellulari, richiedano di essere investigate approfonditamente ⁵.

BIBLIOGRAFIA

1. Koopman WJ, Nijtmans LG, Dieteren CE, Roestenberg P, Valsecchi F, Smeitink JA, et al. Mammalian mitochondrial complex I: Biogenesis, Regulation and Reactive Oxygen Species generation. *Antioxid Redox Signal*, 12: 1431-1470, 2010.
2. Maiese K, Morhan SD, Chong ZZ. Oxidative stress biology and cell injury during type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Curr Neurovasc Res*, 4: 63-71, 2007.
3. Matteucci E, Giampietro O. Flow cytometry study of leukocyte function: analytical comparison of methods and their applicability to clinical research. *Curr. Med. Chem.* 15: 596-603, 2008.
4. Widlansky ME, Wang J, Shenouda SM, Hagen TM, Smith AR, Kizhakekuttu TJ, et al. Altered mitochondrial membrane potential, mass, and morphology in the mononuclear cells of humans with type 2 diabetes. *et al., Transl Res*, 156: 15-25, 2010.
5. Matteucci E, Ghimenti M, Consani C, Masoni MC, Giampietro O. Exploring leukocyte mitochondrial membrane potential in type 1 diabetes families. *Cell Biochem Biophys*, 59: 121-126, 2011.
6. Aon MA, Cortassa S, O'Rourke B. Mitochondrial oscillations in physiology and pathophysiology. *Adv Exp Med Biol*, 641: 98-117, 2008.
7. Quijano C, Castro L, Peluffo G, Valez V, Radi R. Enhanced mitochondrial superoxide in hyperglycemic endothelial cells: direct measurements and formation of hydrogen peroxide and peroxynitrite. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 293: H3404-3414, 2007.
8. Matteucci E, Giampietro O. Building a bridge between clinical and basic research: the phenotypic elements of familial predisposition to type 1 diabetes. *Curr Med Chem*, 14: 544-567, 2007.
9. Thomson GA, Fisher BM, Gemmell CG, MacCuish AC, Gallacher SJ. Attenuated neutrophil respiratory burst following acute hypoglycaemia in diabetic patients and normal subjects. *Acta Diabetol*, 34, 253-256, 1997.

