



ARTICOLO ORIGINALE

ORIGINAL ARTICLE

Sezione biogerontologica

Implicazione del polimorfismo +647 A/C del gene MT1A nel diabete mellito di tipo 2

Implications of +647 A/C MT1A polymorphism in type 2 diabetes

R. GIACCONI*, A.R. BONFIGLI**, R. TESTA**, C. SIROLLA***, C. CIPRIANO*,
M. MARRA**, M. MALAVOLTA*, F. LATTANZIO****, E. MOCCHEGIANI*

*Centro di Nutrigenomica e Immunosenescenza, Polo Scientifico e Tecnologico INRCA, Ancona;

Unità di Diabetologia Polo Scientifico e Tecnologico INRCA Ancona; *Centro di Statistica Polo

Scientifico e Tecnologico INRCA Ancona; ****Direzione Scientifica, INRCA, Ancona

Objectives. Metallothioneins (MT) are zinc-binding proteins which, by means of their antioxidant properties, might prevent the development of diabetic cardiovascular complications. A recent investigation shows that A/C +647 MT1A polymorphism affects the intracellular zinc ion release (iZnR) from MT and is associated with longevity. The aim of the present study is to assess the role of +647 A/C MT1A polymorphism with the susceptibility to type 2 diabetes (DM2).

Materials and methods. The case-control association study included 242 old healthy controls and 235 diabetic patients with a diagnosis of CVD (age > 60 yrs).

Results. C allele was more prevalent in patients than in controls (OR = 1.54; p = 0.002). C+ carriers showed higher blood glucose levels and glycosylated hemoglobin. A modulation of MT levels and iZnR were observed in relation to +647A/C MT1A polymorphism.

Conclusions. An association between +647 A/C MT1A polymorphism and DM2 was found. Moreover, C+ carriers presented a worse glycemic control and an altered zinc homeostasis, suggesting a possible role of MT in the progression of DM2.

Key words: Type 2 diabetes • Zinc • Metallothionein polymorphism

Introduzione

Il diabete mellito di tipo2 (DM2) è caratterizzato da una marcata disfunzione endoteliale e stress ossidativo indotti da una condizione di iperglicemia che possono portare allo sviluppo di complicanze cardiovascolari (CVD) ¹.

Un ruolo antiossidante è esercitato dalle metallotionine (MT), proteine che regolano la biodisponibilità di zinco intracellulare e proteggono il miocardio dal danno indotto dai radicali liberi dell'ossigeno (ROS) ². La modulazione

■ Ringraziamenti: il lavoro è stato supportato dall'INRCA, e dalla Commissione Europea (progetto ZINCAGE n. FOOD-CT-2003-506850; coordinato dal dott. Eugenio Mocchegiani).

■ Corrispondenza: dott.ssa Robertina Giacconi, Centro di Nutrigenomica e Immunosenescenza, Polo Scientifico e Tecnologico INRCA, via Birarelli 8, 60121 Ancona - Tel. +39 071 8004214 - Fax +39 071 206791 - E-mail r.giacconi@inrca.it

dell'omeostasi intracellulare di zinco da parte delle MT nelle cellule endoteliali e mononucleate del sangue (PBMC) può avere un ruolo rilevante nello sviluppo del diabete e delle sue complicanze CVD. Infatti un alterato stato zincale è stato suggerito come un fattore di rischio per questa patologia³. Lo zinco inoltre stimola l'azione dell'insulina e l'attività tirosin-chinasica del suo recettore⁴. È stato dimostrato che le MT prevengono lo sviluppo della cardiomiopatia in topi diabetici che overesprimono la MT riducendo la produzione di ROS⁵. Comunque durante l'invecchiamento gli alti livelli di MT sono associati con una ridotta biodisponibilità di ioni zinco, aumentata infiammazione e aumentato stress ossidativo⁶. Un fenomeno simile è stato osservato anche in pazienti DM2⁴. Recentemente è stata dimostrata un'associazione tra il polimorfismo -209 A/G del gene MT2A, la presenza di iperglicemia e la prevalenza di cardiopatia ischemica⁷. Un altro studio ha evidenziato un aumento dei livelli di MT e dello stato infiammatorio in soggetti anziani portatori dell'allele C per il polimorfismo +647 A/C del gene MT1A⁸. Pertanto, lo scopo del presente lavoro è quello di esaminare il possibile coinvolgimento del polimorfismo +647 A/C del gene MT1A nella suscettibilità al DM2.

Materiali e metodi

SOGGETTI

Lo studio include 242 controlli in salute (età media $63,9 \pm 6,5$) e 235 pazienti con diabete mellito di tipo 2 (DCVD) (età media $69,1 \pm 6,0$) e diagnosi di cardiopatia ischemica valutata mediante elettrocardiogramma e storia clinica. I pazienti sono stati reclutati dall'Unità di Diabetologia (Ospedale geriatrico INRCA di Ancona). La diagnosi di DM2 era effettuata in accordo ai criteri ADA (*American Diabetes Association*). Il gruppo dei controlli era selezionato in base ai criteri del "Senieur Protocol" per gli studi immunogerontologici. Il prelievo di sangue venoso era effettuato a digiuno in condizione di riposo. Il protocollo era approvato dal comitato etico dell'ospedale INRCA e un consenso informato era ottenuto da ogni soggetto partecipante allo studio.

MISURE DI LABORATORIO

I livelli sierici di colesterolo totale e HDL, dei trigliceridi erano misurati con metodi enzimatici

automatizzati e con reagenti Boehringer-Mannheim (Germania). La glicemia e la concentrazione di emoglobina glicata (HbA1c), erano misurati con metodiche standard di laboratorio.

DETERMINAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE DI ZINCO PLASMATICO

Lo zinco nel plasma era misurato attraverso un analizzatore di massa Thermo XII Series ICP-MS (Thermo Electron Corporation, Waltham, MA, USA), secondo le procedure standard fornite dalla ditta.

ANALISI AL CITOFLUORIMETRO DELLA BIODISPONIBILITÀ E DEL RILASCIO DI IONI ZINCO DALLE MT A LIVELLO INTRACELLULARE E DEI LIVELLI DI MT

La biodisponibilità di zinco intracellulare (iZnL), il rilascio di Zinco dalle MT (iZnR) indotto da donatori di ossido nitrico, e i livelli di MT erano testati nelle cellule mononucleate del sangue (PBMC) come riportato in precedenza da Cipriano et al.⁸.

ANALISI DEL POLIMORFISMO +647 A/C DEL GENE MT1A

Lo studio del polimorfismo è stato eseguito su campioni di DNA, mediante un'analisi di lunghezza dei frammenti di restrizione (PCR-RFLP) riportata in precedenza⁸.

ANALISI STATISTICA

I dati erano analizzati con programma SPSS/Win (versione 14.0; Spss Inc., Chicago, IL). Le differenze tra i gruppi erano confrontate con un'analisi univariata per variabili continue e test Chi-quadrato per variabili categoriche. Il calcolo dell'Odds Ratio (OR) e dell'intervallo del 95% dei livelli confidenza era calcolato mediante test esatto di Fisher. Valori di probabilità $< 0,05$ erano considerati statisticamente significativi.

Risultati

CARATTERISTICHE CLINICHE E PARAMETRI BIOCHIMICI

Le caratteristiche cliniche della popolazione studiata sono riassunte nella Tabella I. La prevalenza dei soggetti ipertesi, ma non dei fumatori, era più alta nei pazienti rispetto ai controlli ($p < 0,001$).

Ridotti valori di colesterolo totale e HDL, più elevati livelli sierici di trigliceridi e un aumentato indice di massa corporea erano osservati nel gruppo di pazienti rispetto a quello dei

controlli ($p < 0,001$, $p < 0,05$). Le concentrazioni di glucosio plasmatico e di HbA1c erano significativamente più alte nei pazienti quando paragonati ai controlli ($p < 0,05$). Nessuna differenza era riscontrata nella concentrazione di zinco plasmatico.

FREQUENZE GENOTIPICHE E ALLELICHE DEL POLIMORFISMO +647 A/C DEL GENE MT1A

La distribuzione del polimorfismo seguiva l'equilibrio di Hardy-Weinberg ($p > 0,05$). Una differente distribuzione genotipica del polimorfismo in esame era stata trovata tra i pazienti diabetici e i controlli ($p < 0,05$) (Tab. II). Un significativo incremento della frequenza dell'allele C era presente nei pazienti [$p = 0,002$, OR = 1.54 (CI = 1,17-2,04) mediante test esatto di Fisher].

MISURE FENOTIPICHE IN RELAZIONE AL POLIMORFISMO +647 A/C MT1A

I portatori del genotipo C+ nei pazienti DM2 mostravano più elevata glicemia e HbA1c ($p < 0,001$) rispetto ai portatori C- (III). In un sottogruppo di 30 pazienti DM2 divisi in 15C- e 15 C+ erano misurati i livelli di MT, iZnL e iZnR. I portatori C+ mostravano più alti livelli di MT e ridotti di iZnR ($p < 0,001$; $p = 0,003$) quando paragonati ai portatori C- (Tab. III). Nessuna differenza era trovata per il parametro iZnL.

Discussione

Il Diabete è una patologia caratterizzata da stress ossidativo, iperglicemia e dislipidemia ⁹, condizioni che possono guidare allo sviluppo di complicanze cardiovascolari. Le MT sono dei ROS "scavengers" in grado di regolare l'omeostasi degli ioni zinco ² e di prevenire lo sviluppo della cardiomiopatia diabetica ⁵. La quantità di zinco libero intracellulare è cruciale per regolare la funzione di molti processi cellulari inclusa la risposta allo stress ossidativo e l'attività di enzimi zinco dipendenti ⁶. Il pool di zinco può essere modulato dalla capacità di rilascio da parte delle MT che lo legano ² e nel presente lavoro è stato misurato nei PBMC attraverso il

Tab. I. Caratteristiche dei soggetti.

	Controlli (n. 242)	Pazienti DM2 (n. 235)
Età (anni media ± D. S)	63,9 ± 6,5	69,1 ± 6,0**
Maschi	38% (91/242)	48% (59/235)
Ipertensione	33,5% (81/242)	70,9% (88/235)**
Fumatori	15,7% (38/242)	11,3% (26/235)
Indice di massa corporea (IMC) (kg/m ²)	27,9 ± 4,3	28,9 ± 4,1*
Colesterolo totale (mg/dl)	220,57 ± 37,45	198,30 ± 41,26**
Colesterolo HDL (mg/dl)	60,39 ± 14,80	49,76 ± 13,90**
Trigliceridi (mg/dl)	94,38 x/÷5,41	127,74 x/÷5,99**
Glicemia (mg/dl)	93,5 ± 7,6	175,4 ± 54,7**
HbA1c (%)	5,7 ± 0,34	7,7 ± 1,4**
Livelli plasmatici di zinco (µM)	11,5 ± 1,4	11,6 ± 1,9

** p < 0,001 paragonato ai controlli

° p < 0,05 paragonato ai controlli

Tab. II. Distribuzione genotipica e allelica del polimorfismo +647 A/C del gene MT1A.

Genotypes	Controls (n. 242)	DM2 patients (n. 235)
AA	138 (57,0%)	103 (43,8%)
AC	85 (35,1%)	102 (43,4%)
CC	19 (7,9%) a	30 (12,8%) b
Alleles		
A allele	0,75	0,66
C allele	0,25 c	0,34 d

a vs b $\chi^2 = 8,99$ df = 2 $p = 0,01$;

c vs d $p = 0,002$ odds ratio = 1,54 (C.I. = 1,17-2,04) con test Esatto di Fisher

Tab. III. Livelli di MT, biodisponibilità zincale e rilascio di zinco indotto da NO nei pazienti DM2.

	Genotipo C-	Genotipo C+
Glicemia (mg/dl)	166,4 ± 25,1	186,7 ± 21,6*
HbA1c (%)	7,4 ± 0,8	7,9 ± 1,2*
MT (MFI)	69,8 ± 8,6	92,2 ± 14,6*
iZnL	1,20 ± 0,04	1,22 ± 0,02
iZnR	0,21 ± 0,03	0,18 ± 0,02**

* p < 0,001 paragonato al genotipo C-

** p = 0,01 paragonato al genotipo C-

HbA1c = emoglobina glicata; MFI = intensità media di fluorescenza; iZnL = biodisponibilità di ioni zinco intracellulare; iZnR = rilascio di ioni zinco indotto da NO

parametro iZnR. Un recente studio mostra che il polimorfismo +647 A/C MT1A è associato con la longevità nella popolazione marchigiana. In particolare, il genotipo C+ è meno prevalente

nei nonagenari e mostra un ridotto rilascio di zinco dalle MT, aumentati livelli di MT e IL-6 nel plasma ⁸, suggerendo una condizione sfavorevole per raggiungere un invecchiamento di successo. Nel presente studio, abbiamo trovato un'associazione tra il polimorfismo +647 A/C del gene MT1A e lo sviluppo di DM2 in presenza di complicanze CVD. L'analisi fenotipica mostrava che i portatori dell'allele C avevano valori più elevati di glicemia e di emoglobina glicata. Sebbene il diabete sembra associato ad un alterato turnover di zinco (iperzincuria e basse concentrazioni di zinco plasmatico) ¹⁰, in accordo ad altri autori ¹¹, non abbiamo trovato differenze nella concentrazione di zinco nel plasma tra pazienti e controlli. Poiché la misura dello zinco nei linfociti riflette maggiormente lo stato zincale del soggetto, rispetto alle concentrazioni plasmatiche, la misura dei parametri iZnL e iZnR nei PBMCs, potrebbe essere più indicata ⁸. La scoperta di ridotti valori di iZnR nei pazienti C+, suggerisce la presenza di un aumento della

quota di MT ossidate (tioneine) ² dovuto ad una maggiore iperglicemia. Inoltre, poiché una più alta espressione di MT e ridotta biodisponibilità zincale sono associati allo sviluppo di stenosi carotidea ⁶, valori ridotti di iZnR potrebbero favorire la progressione delle complicanze CVD in pazienti diabetici. Infatti, lo zinco è rilevante nella prevenzione dello sviluppo di DM2 e CVD in quanto cofattore di enzimi antiossidanti e protegge dalla perossidazione lipidica ⁵⁻¹⁰. Lo zinco inoltre migliora l'omeostasi del glucosio ed è coinvolto nella sintesi e secrezione dell'insulina modulando il segnale ormonale ⁴. Pertanto, una disomeostasi zincale potrebbe essere coinvolta nella patogenesi del DM2 e delle sue complicanze. D'altra parte è stato riportato un effetto benefico di una supplementazione zincale in pazienti con DM2 ¹¹. In conclusione questo studio mostra un'implicazione del polimorfismo +647 A/C MT1A con il DM2, attraverso una modulazione del metabolismo del glucosio e dell'omeostasi zincale.

Obiettivi. Le metallotioneine (MT) sono proteine che legano lo zinco e attraverso la propria funzione antiossidante possono prevenire lo sviluppo di complicanze cardiovascolari nel diabete.

Un recente studio mostra che il polimorfismo +647 A/C del gene MT1A influenza il rilascio di zinco dalle MT ed è associato alla longevità.

Lo scopo del presente lavoro è quello di dimostrare il possibile ruolo del polimorfismo +647 A/C del gene MT1A nella suscettibilità al diabete di tipo 2 (DM2).

Materiali e metodi. Lo studio di associazione caso-controllo include 242 soggetti anziani in salute e 235 pazienti affetti da DM2 e con complicanze cardiovascolari di età superiore ai 60 anni.

Risultati. L'allele C era più prevalente nei casi rispetto ai controlli (OR = 1,54; p = 0,002). I portatori C+ mostravano valori più elevati di glicemia e di emoglobina glicata. È stata inoltre evidenziata una modulazione dei livelli di MT e del rilascio di zinco dalle MT (iZnR) in relazione al polimorfismo +647A/C del gene MT1A.

Conclusioni. Esiste una significativa associazione tra il polimorfismo +647A/C del gene MT1A e lo sviluppo di DM2. I portatori dell'allele C (C+) mostravano un peggior controllo glicemico e un'alterata omeostasi zincale suggerendo un potenziale ruolo delle MT nella progressione della patologia diabetica.

Parole chiave: Diabete di tipo 2 • Zinco • Polimorfismi metallotioneine

BIBLIOGRAFIA

- Stirban A, Negrean M, Stratmann B, Gawlowski T, Horstmann T, Götting C, et al. *Benfotiamine prevents macro- and microvascular endothelial dysfunction and oxidative stress following a meal rich in advanced glycation end products in individuals with type 2 diabetes*. *Diabetes Care* 2006;29:2064-71.
- Maret W, Krezel A. *Cellular Zinc and Redox Buffering Capacity of Metallothionein/Thionein in Health and Disease*. *Mol Med* 2007;13:371-5.
- Reunanen A, Knekt P, Marniemi J, Mäki J, Maatela J, Aromaa A. *Serum calcium, magnesium, copper and zinc and risk of cardiovascular death*. *Eur J Clin Nutr* 1996;50:431-7.
- Beletate V, El Dib R, Atallah A. *Zinc supplementation for the prevention of type 2 diabetes mellitus*. *Cochrane Database Syst Rev* 2007;24:CD005525.
- Cai L, Wang Y, Zhou G, Chen T, Song Y, Li X, et al. *Attenuation by metallothionein of early cardiac cell death via suppression of mitochondrial oxidative stress results in a prevention of diabetic cardiomyopathy*. *J Am Coll Cardiol* 2006;48:1688-97.
- Giacconi R, Caruso C, Malavolta M, Lio D, Balistreri CR, Scola L, et al. *Pro-inflammatory genetic background and zinc status in old atherosclerotic subjects*. *Ageing Res Rev* 2008;7:306-18.

- ⁷ Giacconi R, Cipriano C, Muti E, Costarelli L, Maurizio C, Saba V, et al. *Novel -209A/G MT2A polymorphism in old patients with type 2 diabetes and atherosclerosis: relationship with inflammation (IL-6) and zinc*. Biogerontology 2005;6:407-13.
- ⁸ Cipriano C, Malavolta M, Costarelli L, Giacconi R, Muti E, Gasparini N, et al. *Polymorphisms in MT1a gene coding region are associated with longevity in Italian Central female population*. Biogerontology 2006;7:357-65.
- ⁹ West IC. *Radicals and oxidative stress in diabetes*. Diabet Med 2000;17:171-80.
- ¹⁰ Al-Marouf RA, Al-Sharbatti SS. *Serum zinc levels in diabetic patients and effect of zinc supplementation on glycemic control of type 2 diabetics*. Saudi Med J 2006;27:344-350.
- ¹¹ Gunduz G, Gunduz F, Yucel I, Senturk UK. *Levels of zinc and magnesium in senile and diabetic senile cataractous lenses*. Biol Trace Elem Res 2003;95:107-11.