

Glucosio e senescenza

Recenti studi hanno permesso di scoprire che il glucosio, ritenuto un tempo biologicamente inerte, altera invece in maniera irreversibile alcune proteine contribuendo al declino funzionale delle cellule legato all'età

di Anthony Cerami, Helen Vlassara e Michael Brownlee

Quando l'organismo invecchia, le sue cellule e i suoi tessuti si modificano in maniera tale che finiscono per condurlo al declino e alla morte: le cellule diventano sempre meno efficienti nello svolgere i loro compiti e nel sostituire le parti danneggiate, i tessuti si induriscono. Per esempio, i polmoni e il muscolo cardiaco si distendono meno bene, i vasi sanguigni diventano gradatamente meno elastici e i legamenti e i tendini si fanno più rigidi. Con l'avanzare dell'età, l'organismo è colpito più facilmente dalla cataratta, dall'arteriosclerosi, dal cancro e da numerose altre gravi malattie.

Solo pochi ricercatori attribuirebbero effetti così diversi a una singola causa. Eppure, il nostro gruppo di ricerca ha scoperto che un processo, noto da tempo perché altera il colore dei cibi e li rende più duri, contribuisce anche al declino, connesso con l'età, delle cellule e dei tessuti. In questo processo, il glucosio si lega alle proteine (abbiamo dimostrato che può legarsi anche agli acidi nucleici), senza l'intervento di enzimi. Il legame catalizzato dagli enzimi del glucosio con le proteine si forma in un punto specifico di una ben determinata molecola, per uno scopo preciso. Al contrario, il processo non enzimatico attacca il glucosio a caso, in un sito qualunque lungo la prima catena peptidica disponibile.

Sulla base di recenti studi, effettuati sia *in vivo*, sia *in vitro* nel nostro laboratorio presso la Rockefeller University, abbiamo proposto che questa glicosilazione non enzimatica di certe proteine dell'organismo inneschi una serie di reazioni chimiche che portano alla formazione e, alla fine, all'accumulo di legami trasversali irreversibili tra molecole proteiche adiacenti. Se questa ipotesi fosse giusta, contribuirebbe a spiegare perché varie proteine, particolarmente quelle che sono responsabili della struttura dei tessuti e degli organi, formano sempre più legami trasversali a mano a mano che l'organismo invecchia. Nessuno ha fino-

ra descritto in modo soddisfacente l'origine di tutti questi legami; tuttavia, molti ricercatori sono d'accordo sul fatto che l'estesa formazione di legami trasversali nelle proteine contribuisca all'irrigidimento e alla perdita di elasticità, che sono caratteristici dei tessuti senescenti. Secondo noi, inoltre, l'attacco non enzimatico del glucosio agli acidi nucleici può finire con il danneggiare il DNA.

Le varie fasi attraverso le quali il glucosio altera le proteine sono note da decenni a chi si occupa di biochimica degli alimenti, mentre solo di recente alcuni biologi hanno riconosciuto che quelle stesse fasi potrebbero svolgersi all'interno dell'organismo. Le reazioni non enzimatiche tra glucosio e proteine, note collettivamente come reazione di Maillard o di imbrunimento, possono sembrare complicate, ma in effetti sono molto più lineari in confronto a numerose reazioni biochimiche.

Esse hanno inizio quando un gruppo aldeidico (CHO) del glucosio e un gruppo amminico (NH₂) di una proteina si attraggono reciprocamente. Le due molecole si combinano formando una base di Schiff (*si veda l'illustrazione a pagina 73*). Questo intermedio è però instabile e il prodotto si riarrangia in una forma più stabile, ma ancora reversibile, nota come prodotto di Amadori.

Se una proteina permane nell'organismo per mesi o anni, alcuni dei prodotti di Amadori che da essa si formano si disidratano lentamente e si riarrangiano in nuove strutture. Queste possono combinarsi con vari tipi di molecole e formano le strutture irreversibili che abbiamo denominato «prodotti terminali di una glicosilazione spinta» (o prodotti AGE, dall'inglese *advanced glycosylation end products*). La maggior parte di questi prodotti ha un colore bruno giallastro, è fluorescente e presenta proprietà spettroscopiche specifiche. Ma la cosa più importante per l'organismo è che molti di essi sono in grado di formare legami trasversali con le proteine adiacenti.

L'esatta struttura chimica dei prodotti AGE e della maggior parte dei loro derivati per formazione di legami trasversali non è ancora nota. Cionondimeno, alcuni dati suggeriscono che tali prodotti si formino spesso in seguito al legame di un prodotto di Amadori con il glucosio o con un altro zucchero. A loro volta, poi, essi formerebbero legami con altre proteine, unendosi ai gruppi amminici liberi. In alcuni casi, invece, due prodotti di Amadori si uniscono, formando un prodotto AGE che presenta anch'esso legami trasversali. L'unico prodotto con legami trasversali derivato dal glucosio, la cui struttura chimica sia nota, risulta essere proprio una combinazione di questo tipo. Esso è il 2-furanil-4(5)-(2-furanil)-1H-imidazolo, o FFI. Dapprima isolato in laboratorio da un miscuglio di lisina (un amminoacido), albumina (una proteina) e glucosio, l'FFI è stato trovato in seguito nell'organismo.

Ci si è resi conto che la reazione di Maillard poteva avvenire anche nell'organismo, e potenzialmente danneggiarlo, nel corso di studi sul diabete, una malattia caratterizzata da elevati livelli di glucosio nel sangue. Alla metà degli anni settanta, uno di noi (Cerami) e Ronald J. Koenig hanno preso in esame un lavoro in cui si sosteneva che il sangue dei diabetici contiene tassi di emoglobina A_{1c} più elevati del normale (l'emoglobina è il pigmento dei globuli rossi che serve al trasporto dell'ossigeno). I due ricercatori, incuriositi da questi tassi anomali, cercarono di determinare la struttura della molecola.

L'emoglobina A_{1c} è un prodotto di Amadori. Inoltre, come accade per la quantità di prodotto di Amadori che si forma nei cibi, il tasso di emoglobina A_{1c} presente nel sangue è influenzato dal livello del glucosio: quando questo è elevato, lo è anche quello di emoglobina A_{1c}. (Ricercatori del nostro e di altri laboratori hanno identificato in seguito più di 20 proteine di Amadori nell'orga-

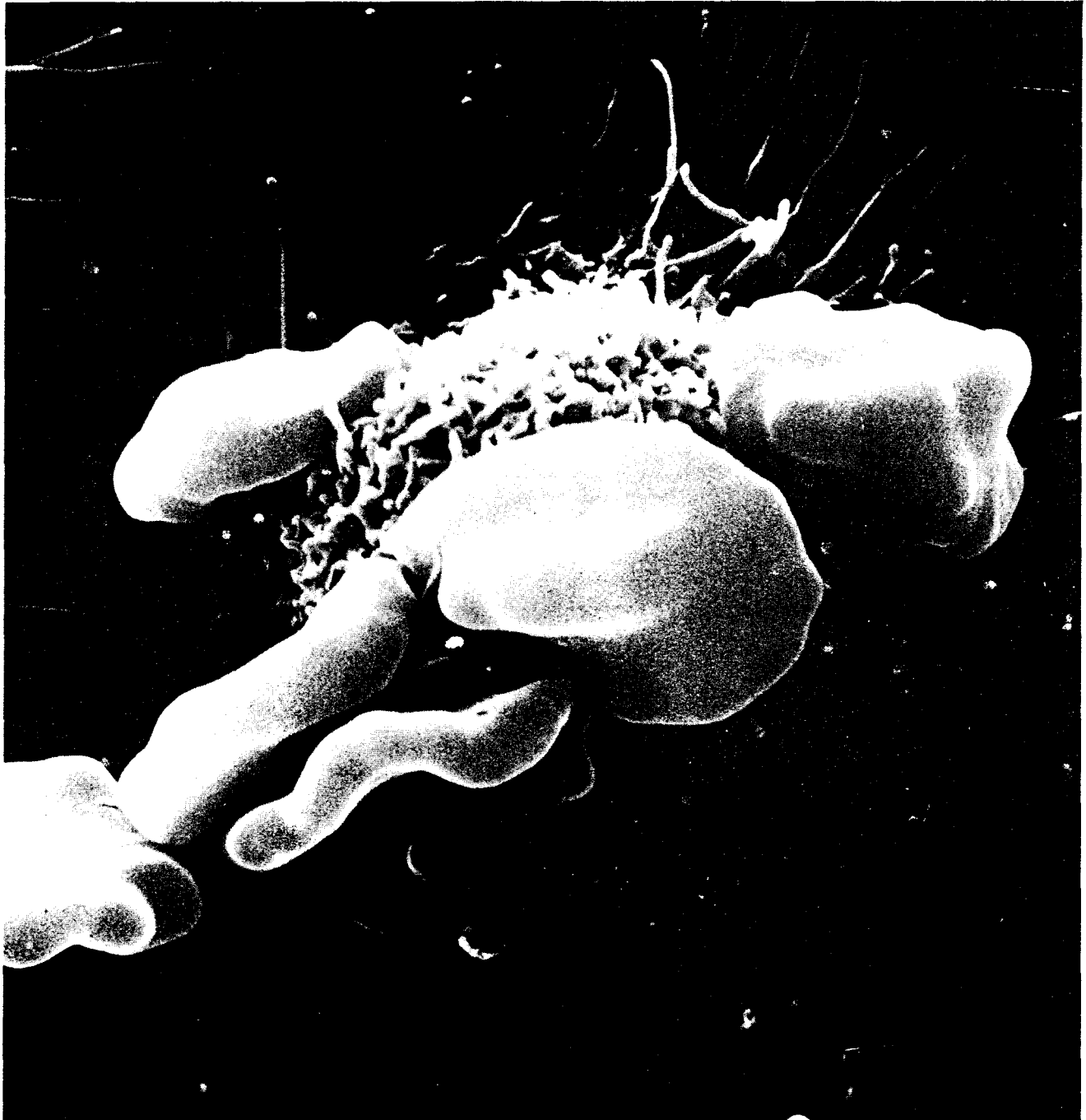
nismo umano e hanno costantemente trovato che nei diabetici la loro quantità era due-tre volte maggiore rispetto ai soggetti normali.)

I dati sull'emoglobina rivelano che il glucosio, che giunge a tutte le cellule e a tutti i tessuti dell'organismo, non è una molecola inerte, come riteneva la maggior parte dei biologi. Il glucosio non reagisce fintantoché si trova nella strut-

tura ad anello, ma questa struttura si apre abbastanza spesso da permettere ai prodotti di Amadori e ad altre sostanze di formarsi. Il glucosio è certamente lo zucchero meno reattivo nell'organismo, ma ha il massimo effetto potenziale sulle proteine, dato che è di gran lunga il tipo di zucchero più abbondante.

La reattività del glucosio aveva indotto Cerami a pensare che l'iperglicemia

riscontrata nei diabetici potesse essere qualcosa di più di un semplice segnale della malattia. Dal momento che il glucosio è in grado di legarsi alle proteine dell'organismo senza l'intervento degli enzimi, le quantità in eccesso di questo zucchero, secondo Cerami, potrebbero essere responsabili delle complicazioni del diabete, una vasta gamma di disturbi che vanno da alterazioni nervose di ori-



Un macrofago (al centro), la cellula «spazzina» che rimuove i frammenti di cellule dai tessuti, sta qui ingerendo alcuni globuli rossi del sangue (cellule a superficie liscia) a cui sono stati attaccati prodotti terminali di una glicosilazione spinta (o prodotti AGE, dall'inglese *advanced glycosylation end products*). Si tratta di molecole derivate dalla combinazione del glucosio con una proteina, senza intervento enzimatico. Gli

autori del presente articolo postulano che tali prodotti si accumulino su proteine a lento ricambio e su cellule, formando legami trasversali che finiscono per danneggiare i tessuti. I macrofagi tentano di rimuovere le proteine su cui si sono formati i prodotti AGE, ma l'invecchiamento li rende meno efficienti. In questa microfotografia di David M. Phillips del Population Council, le cellule appaiono ingrandite 10 000 volte.

gine vascolare a un'insufficienza renale cronica e che spesso debilitano i diabetici e ne accorciano la vita. In particolare, sembrava verosimile che gli alti tassi di glucosio potessero portare a un notevole accumulo di prodotti AGE nelle proteine a lento ricambio. Tale accumulo potrebbe a sua volta danneggiare i tessuti in tutto il corpo.

Questi ragionamenti hanno portato a supporre, a un certo punto, che il glucosio potesse essere responsabile anche dei cambiamenti osservati nei tessuti in associazione con il normale processo d'invecchiamento. L'effetto del diabete su molti organi e tessuti viene descritto spesso come un fenomeno di senescenza accelerata in quanto diverse complicazioni che colpiscono i diabetici, tra cui la cataratta senile, la rigidità delle articolazioni e l'aterosclerosi, differiscono da quelle che si manifestano negli anziani soltanto perché si sviluppano più precocemente. Se il glucosio in eccesso accelera, di fatto, la comparsa di queste malattie nei diabetici, quantità normali di glucosio potrebbero presumibilmente svolgere un ruolo analogo nella più lenta comparsa dei disturbi che accompagnano la vecchiaia.

Gli studi compiuti nel nostro laboratorio sulla senescenza (che fanno da complemento agli studi sul diabete, tuttora in corso) hanno avuto inizio con il tentativo di determinare se i prodotti AGE si accumulano, di fatto, sulle proteine a lento ricambio, tra le quali for-

mano legami trasversali. Le proteine del cristallino sono state i primi obiettivi del nostro studio perché, si riteneva che, una volta prodotte, persistessero per tutta la vita; pertanto esse avevano i requisiti per essere considerate proteine in grado di accumulare i prodotti AGE. Si è anche ipotizzato che un accumulo di questi prodotti AGE, e dei prodotti con legami trasversali da essi derivati, potesse contribuire a spiegare perché, con l'invecchiamento, il cristallino diventa bruno e opaco (cioè sviluppa una cataratta senile). A sostegno di questa ipotesi, ricercatori di altri laboratori avevano precedentemente trovato in pazienti affetti da cataratta senile due tipi di legami trasversali in aggregati di proteine del cristallino affetto da cataratta senile. Uno era un legame pigmentato, il che fa pensare che si tratti di un prodotto AGE. L'altro era un legame disolfuro che si era formato tra i gruppi solfidrilici (SH) dell'amminoacido cisteina.

Mediante esperimenti *in vitro*, Cerami, Victor J. Stevens e Vincent M. Monnier hanno dimostrato che il glucosio poteva produrre una trasformazione che ricorda la cataratta in una soluzione contenente proteine di cristallino. Si è constatato che, in assenza di glucosio, le soluzioni di proteine del cristallino di bovino rimanevano limpide, mentre quelle con glucosio formavano aggregati di proteine (flocchi), facendo così pensare che legami trasversali si fossero stabiliti tra le molecole. Gli aggregati diffrangevano la luce, rendendo opaca la soluzione.

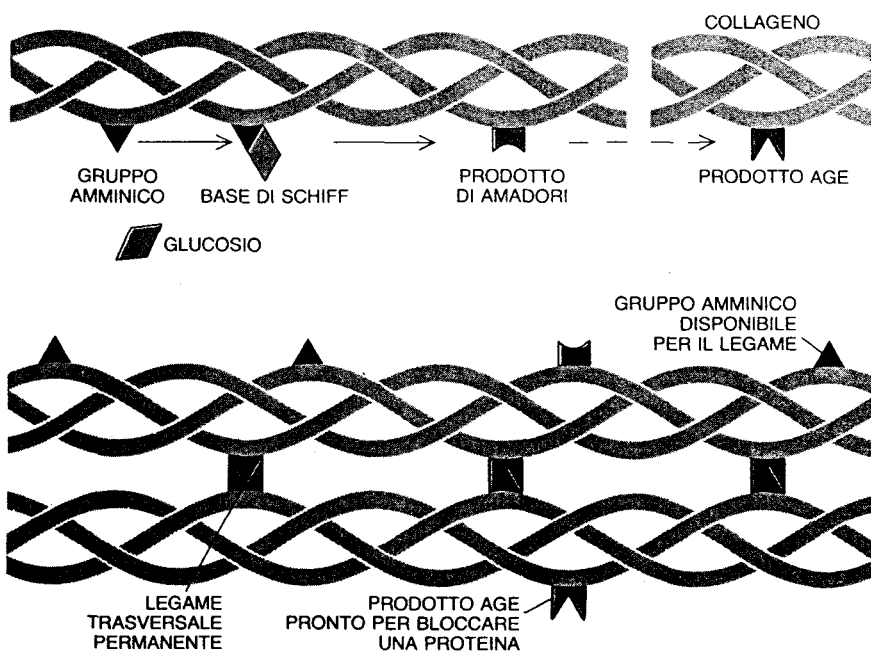
L'analisi dei legami ha confermato la presenza sia del legame disolfuro, sia del legame pigmentato. Il gruppo di Cerami ha anche scoperto che, in soggetti affetti da cataratta senile, i prodotti pigmentati con legami trasversali hanno un colore bruno e una fluorescenza caratteristici dei prodotti AGE. In effetti, alcuni di questi prodotti possono essere identificati chimicamente, come il già citato prodotto FFI.

I dati sopra menzionati, assieme ad altri, suggeriscono che la glicosilazione non enzimatica delle proteine del cristallino possa contribuire alla formazione della cataratta mediante un meccanismo che si svolge in due fasi. Il glucosio altera probabilmente la conformazione delle proteine in maniera tale che gruppi solfidrilici precedentemente non esposti possano combinarsi con i gruppi solfidrilici vicini. Si sviluppano così legami disolfuro che danno inizio all'aggregazione delle proteine. I prodotti di Amadori che si formano in seguito a questo processo si riarrangiano formando così sia l'FFI, sia altri prodotti pigmentati con legami trasversali che alterano il colore del cristallino e lo rendono opaco.

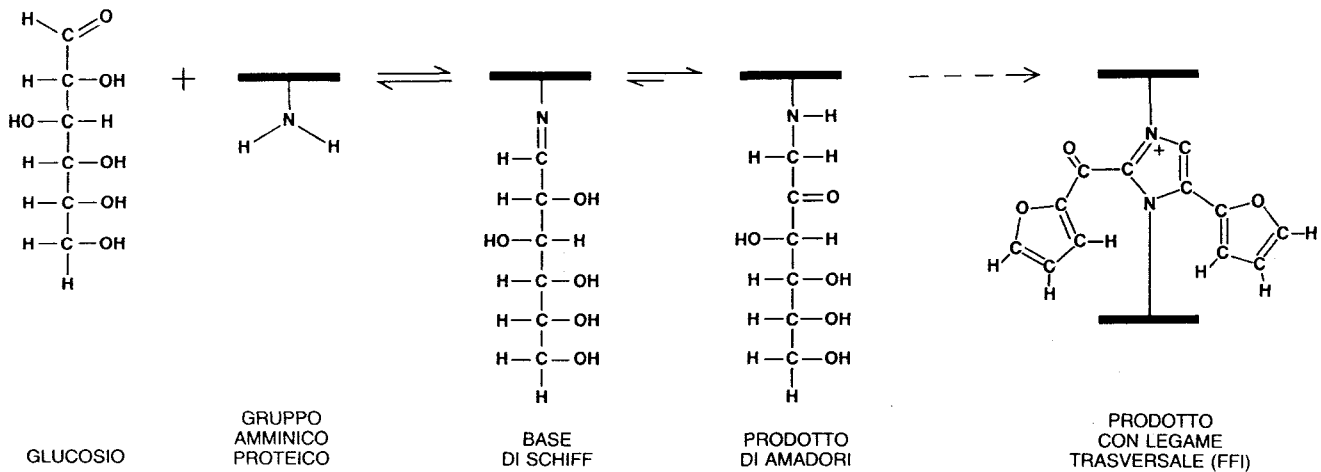
Convinti che almeno una classe di proteine subisca la reazione di Maillard e formi legami trasversali anomali, abbiamo pensato di rivolgere le nostre indagini alla proteina più abbondante nell'organismo, il collagene. Questa proteina extracellulare a ricambio lento funge da collante per le cellule di molti organi e contribuisce a formare una specie di impalcatura che dà forma e sostegno alle pareti dei vasi sanguigni. Essa è anche un importante costituente dei tendini, della cute, della cartilagine e di altri tessuti connettivi. Negli ultimi 25 anni vari ricercatori hanno dimostrato che sono molti i tessuti in cui si forma collagene, il quale, con l'invecchiamento, si arricchisce sempre più di legami trasversali e, di conseguenza, diviene sempre più rigido.

Studi effettuati sulla dura madre, l'involucro di collagene che separa il cervello dal cranio, hanno fornito le prime prove che prodotti AGE possono concentrarsi sul collagene. Monnier, Cerami e il compianto Robert R. Kohn della Case Western Reserve University hanno trovato che la dura madre di soggetti in età avanzata e di diabetici presenta una pigmentazione bruno-giallastra, la cui fluorescenza e le cui proprietà spettroscopiche sono analoghe a quelle dei prodotti AGE che si ottengono *in vitro*. Come era prevedibile, le proteine dei soggetti diabetici avevano accumulato più sostanze pigmentate di quelle dei soggetti di controllo. In questi ultimi la quantità di pigmento era direttamente proporzionale all'età.

Le prove a favore del fatto che il glucosio induca sul collagene la formazione non solo di prodotti AGE, ma anche di legami trasversali provengono da diversi



La formazione di legami trasversali per effetto del glucosio, qui illustrata in forma estremamente schematica, ha inizio quando il glucosio si attacca al gruppo amminico (NH_2) di una proteina (*in alto*) come il collagene. Il prodotto iniziale, noto come base di Schiff, si trasforma subito in un prodotto di Amadori, che può passare attraverso diverse fasi non ancora ben comprese (*freccia tratteggiata*) fino a diventare un prodotto AGE. In molti casi, i prodotti AGE funzionano come trappole (*simbolo in rosso*), pronte a chiudersi con un colpo secco (*in basso*) sui gruppi amminici liberi di una qualsiasi proteina vicina, formando in tal modo legami trasversali.



La struttura delle basi di Schiff e dei prodotti di Amadori formati da glucosio e una proteina è nota, al contrario della struttura della maggior

parte dei prodotti AGE e dei loro derivati con legami trasversali. Solo il 2-furanil-4(5)-(2-furanil)-1H-imidazolo, o FFI, è stato identificato.

studi. Alcuni autori hanno dimostrato da tempo che le fibre dei tendini della coda di ratti di età avanzata impiegano più tempo a rompersi, quando vengono sottoposte a stiramento, di quelle degli animali più giovani, il che indica che le fibre più vecchie hanno un maggior numero di legami trasversali e sono meno flessibili.

Monnier, Cerami e Kohn hanno tentato di imitare gli effetti della senescenza facendo incubare con vari zuccheri le fibre dei tendini di giovani ratti. Queste fibre hanno gradatamente accumulato prodotti AGE e hanno mostrato un concomitante allungamento del tempo di rottura.

Più di recente abbiamo valutato la formazione di legami trasversali in collagene sia purificato, sia non purificato ricavato dall'aorta. Nel primo caso il collagene è stato messo in incubazione in provetta assieme a glucosio; nel secondo, invece, esso è stato quasi sempre incubato nel corpo di animali diabetici, che presentavano quindi elevati livelli di glucosio nel sangue. In entrambe le situazioni, è stato dimostrato in modo inequivocabile che il glucosio determinava la formazione di un gran numero di legami trasversali.

Anche se abbiamo il sospetto che la formazione di legami trasversali dovuti al glucosio tra proteine a ricambio lento contribuisca a spiegare molti sintomi della senescenza e molte complicazioni del diabete, sappiamo che questi legami non sono i soli a poter danneggiare l'organismo. Abbiamo dimostrato che i prodotti AGE che si formano sul collagene delle pareti delle arterie e della membrana basale dei capillari possono in realtà rappresentare una trappola anche per proteine plasmatiche normalmente a ricambio rapido. Si è osservato che quando il collagene viene incubato con glucosio e quindi viene lavato in modo da eliminare dalla soluzione tutto il gluco-

sio libero, esso può ancora unirsi mediante legami covalenti a molecole come l'albumina, le immunoglobuline e le lipoproteine a bassa densità.

Questo tipo di legame può contribuire a spiegare perché tanto i diabetici, quanto le persone in età avanzata siano suscettibili alla formazione di placche sulle pareti delle arterie (aterosclerosi). Le placche aterosclerotiche sono costituite da cellule muscolari lisce, da collagene (che è prodotto da tali cellule) e da lipoproteine (proteine ricche di colesterolo, che sono la fonte primaria del grasso e del colesterolo presenti nelle lesioni aterosclerotiche).

Finora nessuno è ancora riuscito a capire gli esatti processi che conducono all'aterosclerosi. Si può pensare che il glucosio contribuisca alla formazione delle placche facendo accumulare progressivamente i prodotti AGE sul collagene presente nelle pareti dei vasi sanguigni. Una volta formatesi queste sostanze, il collagene può catturare dal sangue lipoproteine a bassa densità, le quali, a loro volta, possono diventare siti di attacco per altre lipoproteine.

In teoria, il collagene modificato dal glucosio potrebbe anche catturare il fattore di von Willebrand, una proteina che si ritiene promuova l'aggregazione delle piastrine (corpuscoli indispensabili per la coagulazione del sangue). Le piastrine possono liberare un fattore che stimola la proliferazione delle cellule della muscolatura liscia, le quali producono ulteriore collagene. Altri eventi collegati con la presenza di glucosio possono promuovere la formazione di placche aterosclerotiche (si veda l'illustrazione a pagina 75), ma questa interessante ipotesi richiede ulteriori approfondimenti, soprattutto per poterla collocare in maniera adeguata nel contesto di tutti i fattori invocati per spiegare la genesi dell'aterosclerosi.

La cattura di altre proteine da parte

del collagene della membrana basale dei capillari e la formazione di legami trasversali possono anche spiegare l'ispessimento di tale membrana nel corso dell'invecchiamento (e l'ispessimento più rapido che si osserva nei diabetici). In questi soggetti, l'ispessimento di una membrana basale specializzata nel rene, il mesangio, provoca una grave insufficienza renale. Nei non diabetici, le conseguenze di tale ispessimento sono meno evidenti, anche se abbiamo il sospetto che questo processo possa abbassare l'efficienza del rene nell'eliminare le scorie metaboliche trasportate dal sangue. In altre parti dell'organismo, i capillari dalle pareti ispessite tendono col tempo a diventare stretti o addirittura a occludersi soprattutto nelle estremità inferiori, dove la forza di gravità fa aumentare il tasso di cattura delle proteine da parte delle pareti vasali. Questo restringimento può contribuire a ridurre la sensibilità e a rallentare la circolazione sanguigna, due fenomeni che si riscontrano spesso negli arti inferiori dei diabetici e degli anziani anche non diabetici. Per poter funzionare bene, il sistema sensoriale richiede un'irrorazione sanguigna adeguata.

Dato che la senescenza è riscontrabile sia a livello delle cellule, sia dei tessuti, il nostro laboratorio ha cominciato a esaminare di recente gli effetti del glucosio sui geni, i segmenti di DNA che controllano l'attività cellulare. Almeno nelle cellule a riposo, il DNA, le cui basi azotate presentano gruppi amminici, ha vita lunga e, pertanto, può accumulare potenzialmente prodotti AGE. Questi potrebbero quindi essere in parte responsabili del ben noto incremento delle alterazioni cromosomiche correlato all'età oppure del declino della capacità di riparazione, replicazione e trascrizione del DNA. Si ritiene che questi cambiamenti genetici riducano la capacità del-



Le fibrille di collagene, la proteina più abbondante nel mondo animale, appaiono ingrandite di 26 000 volte in questa fotografia al microscopio elettronico a scansione di collagene di embrione di pollo, ottenuta da Christine McBride e David E. Birk della University of Medicine and Dentistry of New Jersey a Piscataway. A mano a mano che gli animali, uomo compreso, invecchiano, la formazione di legami trasversali tra le molecole proteiche di queste fibrille provoca un irrigidimento generale dei tessuti in tutto il corpo. L'esatta natura di tutti i legami trasversali non è nota, ma secondo alcuni dati molti di questi legami deriverebbero dai prodotti AGE.

l'organismo di rimpiazzare le proteine indispensabili per il normale funzionamento cellulare e la sopravvivenza. La formazione di prodotti AGE potrebbe anche provocare mutazioni che influiscono sull'attività del sistema immunitario o favoriscono lo sviluppo di alcuni tipi di tumore.

Richard Bucala, Peter Model e Cerami hanno notato che l'incubazione di DNA con glucosio causa, in effetti, la formazione di pigmenti fluorescenti. Questi, tuttavia, non si formano così rapidamente come con le proteine, dato che i gruppi amminici degli acidi nucleici sono molto meno reattivi dei gruppi amminici delle proteine.

Nessuno ha finora studiato gli effetti dei prodotti AGE sugli acidi nucleici delle cellule di mammifero, ma esperimenti effettuati sui batteri dal gruppo sopra menzionato suggeriscono che la glicosilazione non enzimatica possa interferire con il normale funzionamento dei geni umani. Si è riusciti a dimostrare che, quando un batteriofago con genoma a DNA veniva incubato con il glucosio e

quindi inserito nel batterio *Escherichia coli*, la sua capacità di infettare le cellule batteriche risultava ridotta. Il grado di riduzione dipendeva sia dal tempo di incubazione, sia dalla concentrazione dello zucchero.

Bucala e collaboratori hanno anche trovato che l'aggiunta dell'amminoacido lisina a un miscuglio di DNA e glucosio accelerava la riduzione dell'attività virale. Presumibilmente lo zucchero reagiva con l'amminoacido, formando una «lisina-AGE», che rapidamente si legava al DNA. Dato che sia le proteine sia il glucosio sono presenti nelle cellule di mammifero, sembra probabile che una reazione di questo genere possa essere responsabile del fatto che le proteine formino legami covalenti con il DNA di cellule senescenti. Non sono tuttavia noti gli effetti di questo tipo di legame sul materiale genetico.

Non è chiaro neppure come l'attacco del glucosio o di una proteina glicosilata al DNA abbia potuto interferire con la normale attività del batteriofago. In un altro studio, però, è stato dimostrato che

lo zucchero può provocare una mutazione nel DNA. Sono stati isolati i plasmidi (frammenti extracromosomici di DNA batterico), contenenti i geni che rendono *E. coli* resistente agli antibiotici ampicillina e tetraciclina; essi sono stati quindi incubati con glucosio-6-fosfato, uno zucchero che reagisce più prontamente del glucosio. Gli sperimentatori hanno poi reintegrato il DNA nelle cellule batteriche e hanno esposto queste cellule all'antibiotico. La maggior parte di esse non ha sopportato l'esposizione alla tetraciclina, mentre è sopravvissuta all'ampicillina. Era chiaro che alcuni dei plasmidi incubati avevano conservato solo il gene per la resistenza all'ampicillina, perdendo quello per la resistenza alla tetraciclina.

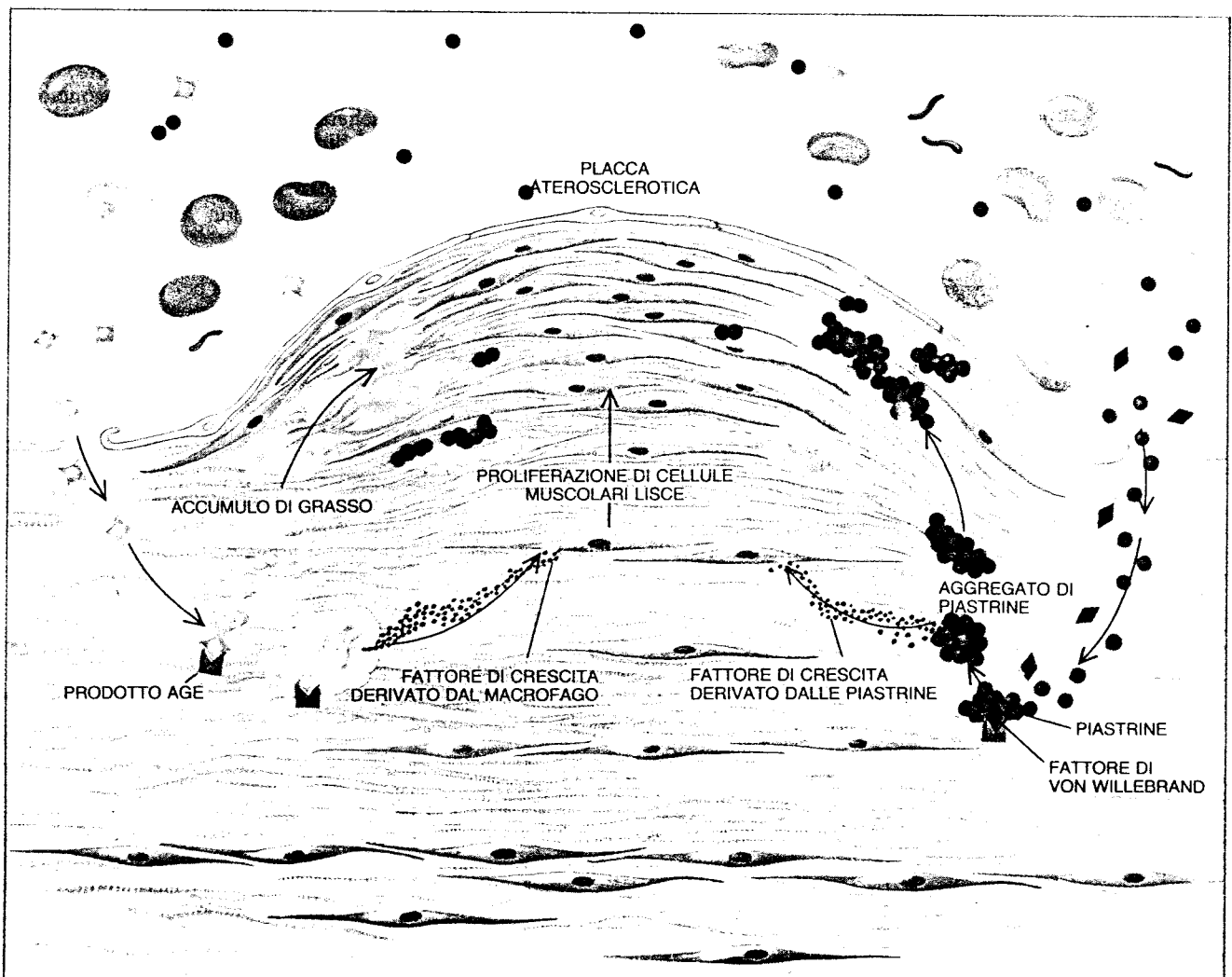
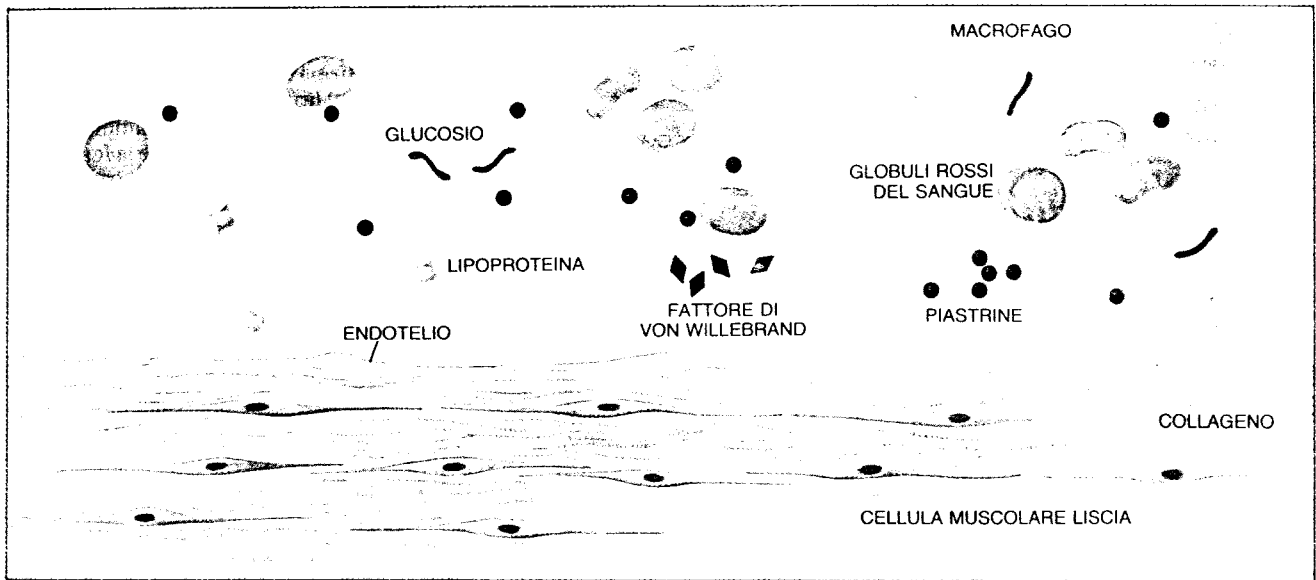
Un ulteriore studio ha dimostrato che la maggior parte dei geni per la resistenza alla tetraciclina erano stati alterati da soppressioni o inserzioni nel DNA. Secondo noi, quei geni avrebbero accumulato prodotti AGE e le mutazioni sarebbero quindi insorte quando i batteri avevano cercato di riparare il DNA modificato da tali prodotti. Questa conclusione è sostenuta dal fatto che le cellule batteriche che mancano di un enzima di riparazione del DNA non hanno presentato mutazioni nel genoma.

Per riuscire a determinare meglio gli effetti dei prodotti AGE sul DNA delle cellule umane, stiamo mettendo a punto nuovi metodi per misurare sia i prodotti AGE, sia le proteine glicosilate sul DNA. Inoltre, è necessario approfondire le nostre conoscenze sui meccanismi cellulari per la riparazione degli acidi nucleici glicosilati.

Il fine ultimo delle nostre ricerche su senescenza e diabete è quello di trovare il modo per impedire o ritardare gli effetti debilitanti dovuti a queste due condizioni. Se la nostra ipotesi sulla glicosilazione è esatta, tali effetti potrebbero essere attenuati o impedendo la formazione di prodotti derivati dal glucosio con legami trasversali o accelerando l'attività dei processi biologici che rimuovono i prodotti AGE.

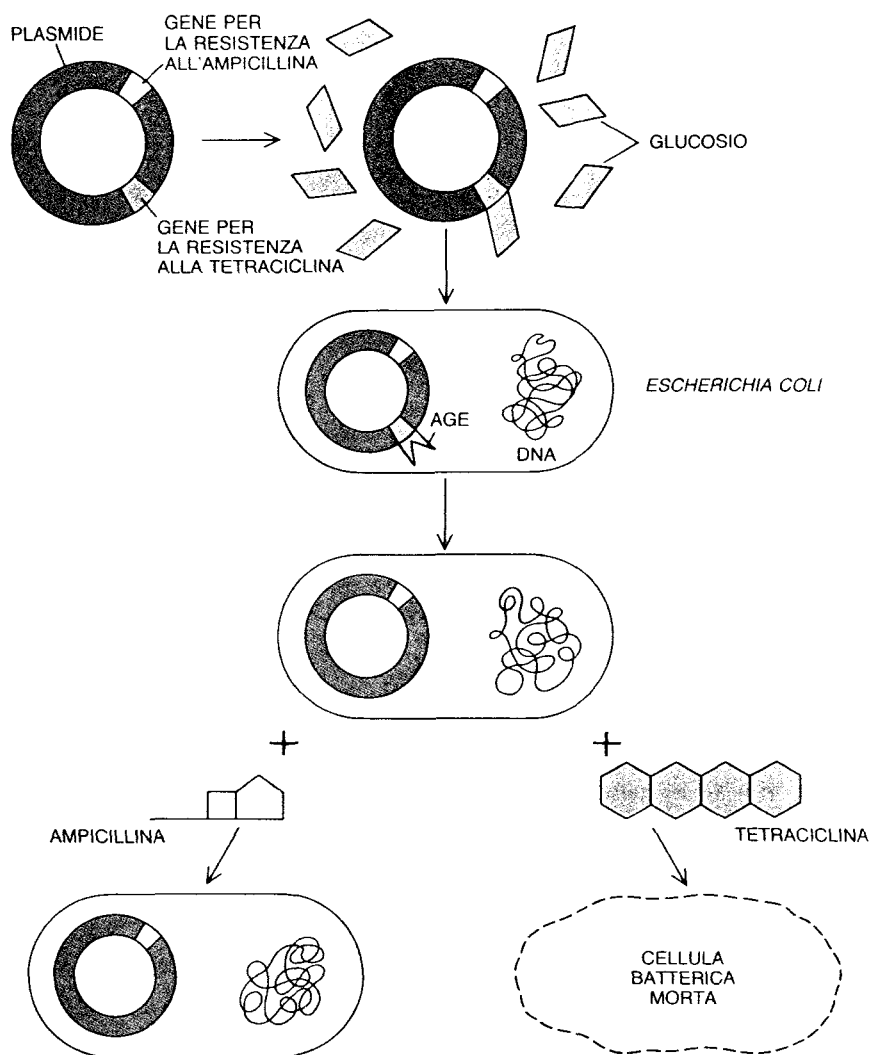
Sul primo fronte abbiamo ottenuto, in collaborazione con Peter C. Ulrich, che lavora nel nostro laboratorio, un farmaco promettente, l'amminoguanidina. Questa piccola molecola, che fa parte della classe di composti denominati idrazine, reagisce con i prodotti di Amadori, probabilmente legandosi con i loro gruppi carbonilici e impedendo così la loro trasformazione in prodotti AGE.

Negli studi *in vitro* sul farmaco abbiamo incubato l'albumina o con il solo glucosio o con glucosio e amminoguanidina. Nel primo caso i prodotti AGE si sono formati entro tre-quattro giorni e sono aumentati progressivamente nel tempo. In presenza di amminoguanidina, invece, si è ottenuta la consueta quantità di prodotto di Amadori, mentre si è notata una inibizione nella formazione di pro-

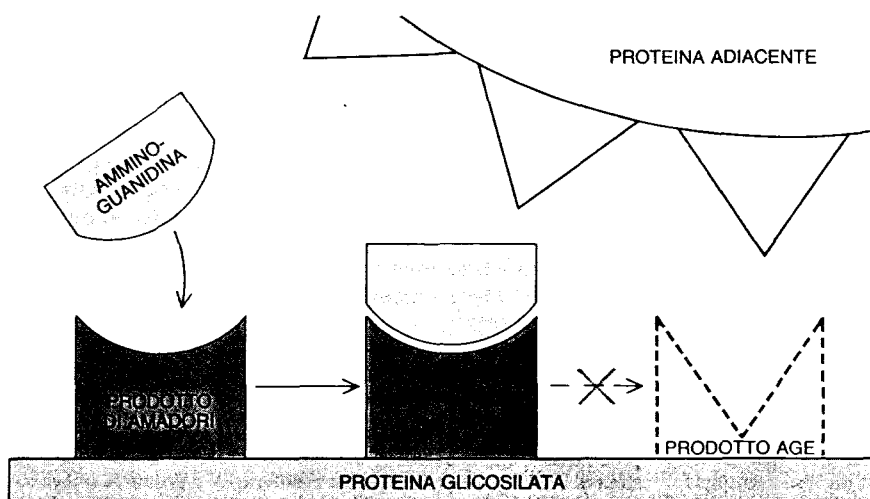


I prodotti terminali della glicosilazione spinta (prodotti AGE) potrebbero forse dar luogo all'aterosclerosi e, di conseguenza, a coronaropatie, per vie diverse. Quando il rivestimento interno di un vaso sanguigno sano (*in alto*) viene danneggiato, le proteine plasmatiche passano nella parete del vaso stesso (*in basso*). I prodotti AGE, formati sul collagene nello spessore della parete, catturano allora le lipoproteine a bassa densità (LDL), le quali si accumulano formando depositi di coleste-

rolo nelle placche aterosclerotiche. I macrofagi tentano di rimuovere le proteine così intrappolate e, nel processo, secernono un fattore che stimola le cellule muscolari lisce a proliferare e a produrre nuovo collagene. Infine, i prodotti AGE formati sul collagene possono catturare il fattore di von Willebrand, una proteina che fa aderire le piastrine alla parete del vaso. Come i macrofagi, anche le piastrine attivate secernono un fattore che favorisce la proliferazione delle cellule.



Questo plasmide (anello extracromosomico di DNA batterico) ha subito una mutazione dopo l'incubazione con glucosio, il che suggerisce che questo zucchero potrebbe contribuire ai danni genetici che si osservano nell'invecchiamento. Dopo l'incubazione, sono stati inseriti nel batterio *Escherichia coli* plasmidi che portano i geni per la resistenza agli antibiotici ampicillina e tetraciclina. In presenza di ampicillina le cellule batteriche si sono riprodotte normalmente, ma in presenza di tetraciclina quasi tutte sono morte. Sembra che gli enzimi batterici abbiano tentato di riparare i geni per la resistenza alla tetraciclina che avevano accumulato i prodotti AGE.



L'aminoguanidina, un farmaco sperimentale messo a punto nel laboratorio degli autori, interferisce con la capacità dei prodotti di Amadori di subire reazioni che portano alla formazione di legami trasversali. La sua sicurezza ed efficacia sugli esseri umani sono in corso di studio.

dotti AGE. Analogamente, quando abbiamo incubato il collagene con glucosio, si è formato un numero estremamente alto di legami trasversali, mentre l'aggiunta di aminoguanidina ha bloccato quasi completamente la formazione di legami intermolecolari.

Risultati analoghi sono stati ottenuti mediante studi su ratti diabetici. Gli animali trattati con aminoguanidina accumulavano nell'aorta un minor numero di prodotti AGE e di prodotti con legami trasversali rispetto agli animali non trattati. In un gruppo separato di ratti diabetici, abbiamo potuto dimostrare che l'aminoguanidina impedisce sia che l'immunoglobulina venga trattenuta nella membrana basale dei capillari renali, sia che le lipoproteine plasmatiche rimangano nella parete delle arterie.

Stiamo ora studiando la possibilità di effettuare prove con l'aminoguanidina in soggetti umani. Dopo aver dimostrato che il farmaco è innocuo, intendiamo condurre prove a lungo termine sulla sua capacità di prevenire le complicazioni diabetiche. Dato che il diabete, per alcuni aspetti, può essere paragonato alla senescenza, risultati positivi in questo tipo di indagini potrebbero incoraggiarci a studiare la capacità dell'aminoguanidina (o di analoghi composti) nel prevenire le alterazioni associate all'età nei non diabetici.

Sempre a questo scopo, stiamo cercando un sistema per accelerare il meccanismo di rimozione dei prodotti AGE nell'organismo. Anche se non fosse possibile impedire la formazione di questi prodotti, un efficace sistema di rimozione potrebbe contribuire a controbilanciare qualunque loro pericoloso accumulo sulle molecole proteiche. I macrofagi, che sono le cellule «spazzine» che rimuovono i detriti dai tessuti, costituiscono evidentemente uno di questi sistemi di rimozione.

Questa proprietà dei macrofagi è stata chiarita circa tre anni fa, quando abbiamo esaminato la mielina dei nervi periferici: quel complesso miscuglio di proteine a vita lunga, che forma una guaina isolante attorno alle fibre nervose. Abbiamo incubato mielina isolata con glucosio per otto settimane, allo scopo di simulare gli effetti dall'esposizione a lungo termine al glucosio, che ha luogo nell'organismo. La successiva aggiunta di macrofagi al miscuglio ha messo in evidenza che essi fagocitavano più mielina di quanto facessero quando questa non era stata messa in incubazione con lo zucchero. Essi hanno anche fagocitato più attivamente la mielina ricavata da animali diabetici che da quelli non diabetici, presumibilmente perché gli animali diabetici erano portatori di una maggior quantità di prodotti AGE.

Dati più recenti indicano che proprio il prodotto AGE è il segnale che indica l'assunzione di proteine da parte dei macrofagi. Per esempio, abbiamo trovato

che un macrofago di topo ha una quantità di recettori stimata intorno a 150.000 per i prodotti AGE che si formano sull'albumina. I macrofagi tentano di ingerire qualunque proteina che sia portatrice di FFI, un prodotto AGE a legami trasversali, ma i recettori che sono presenti su di essi non sembrano reagire con alcuna delle sostanze non AGE che si accumulano sulle proteine, compresi i prodotti di Amadori.

L'affinità dei macrofagi per l'FFI e, in generale, per i prodotti AGE è risultata molto evidente quando abbiamo fatto aderire sia FFI, sia altri prodotti AGE alle proteine della membrana di globuli rossi normali. I macrofagi di topo hanno ingerito le cellule alterate molto più avidamente di quanto avrebbero fatto con le cellule normali. (Oltre a sostenere l'ipotesi che i macrofagi siano un sistema di rimozione dei prodotti AGE, questa scoperta suggerisce che tali prodotti svolgano anche un ruolo utile nei confronti dell'organismo indicando che una cellula è senescente e che dovrebbe essere rimossa.)

Perché i prodotti AGE si accumulano sulle proteine se poi l'organismo ha un sistema per rimuoverli? Non abbiamo una risposta, ma alcune spiegazioni sembrano probabili. Tanto per cominciare, i prodotti AGE possono formarsi, in generale, in punti non facilmente accessibili ai macrofagi. Inoltre, le proteine dotate di un elevato numero di legami trasversali, che finiscono per accumularsi, sembrano essere sempre più difficili da rimuovere anche perché, quando l'organismo invecchia, i suoi macrofagi diventano meno efficienti come meccanismo di eliminazione. A sostegno di quest'ultima ipotesi, abbiamo scoperto molto di recente che il numero di recettori per i prodotti AGE sui macrofagi di topo diminuisce con l'invecchiamento.

Attualmente stiamo cercando farmaci che facciano aumentare la velocità di eliminazione dei prodotti AGE indesiderati, ma un trattamento valido dovrebbe riuscire a eliminare tali prodotti senza danneggiare eccessivamente le proteine che non sono sostituibili. Nel caso della mielina, per esempio, un'eccessiva rimozione di proteina vecchia o danneggiata stimolata dai prodotti AGE potrebbe erodere la guaina mielinica, che è essenziale per la funzione nervosa.

Ulteriori prove devono essere raccolte prima di poter dire con certezza che la glicosilazione non enzimatica delle proteine contribuisce a quei cambiamenti delle cellule e dei tessuti che sono caratteristici della senescenza. I dati finora raccolti indicano che la nostra ipotesi è promettente. Cosa più importante, i risultati ottenuti evidenziano la prospettiva, davvero stimolante, di mettere a punto, un giorno, cure che impediscano il realizzarsi di alcuni di quei cambiamenti che troppo spesso fanno della «senescenza» un sinonimo di «malattia».



franco
muzzio
editore

manuali scientifici

Reginaldo Danese Il calcolo ricorrente

Il calcolo ricorrente è uno strumento formidabile, capace di trasformare l'elaboratore in un simulatore di fenomeni fisici. Qui i fondamenti del calcolo ricorrente sono esplorati attraverso le applicazioni, con programmi (in Basic e in Pascal) di meccanica, idraulica, elettronica, termodinamica.
pp. 256, L. 30.000

Adrian Oldknow e Derek Smith Imparare la matematica con il microcomputer

Che genere di matematica, che non potreste fare facilmente in qualsiasi altro modo, potete fare con un microcomputer? Una guida per esplorare il potenziale del microcalcolatore per l'insegnamento e l'apprendimento della matematica, nelle aule scolastiche e fuori.
pp. 384, L. 28.000

altre novità recenti:

scienze naturali:

Michael Chinery Guida degli Insetti d'Europa

pp. 376 + 130, L. 30.000

K. Fiedler e J. Lieder Atlante Illustrato di Istologia

pp. 164, L. 20.000

scienze dell'artificiale:

Riccardo Callmani Energia e informazione

con contributi di G. O. Longo, S. Los, A. A. Semi
pp. 382, L. 30.000

strumenti della musica:

Andrea Bornstein Gli strumenti musicali del Rinascimento

pp. 316, L. 32.000

Nicolò Pintacuda Algoritmi elementari

Questo libro si propone di stimolare la comprensione delle procedure di elaborazione automatica, spiegando una varietà di procedimenti algoritmici, relativi a una vasta gamma di problemi di natura matematica.
pp. 176, L. 18.000

Andrea Sgarro Crittografia

La crittografia è una scienza antichissima: il suo campo d'azione oggi è vastissimo, con il numero enorme di messaggi che viaggia su ogni sorta di canali e la enorme quantità di informazioni che viene immagazzinata nelle memorie dei calcolatori e la cui riservatezza deve essere protetta.
pp. 126, L. 18.000

Manfred R. Schroeder La teoria dei numeri

Questo libro riempie le lacune della letteratura di base della teoria dei numeri, ponendo l'accento sull'intuizione, sulle interrelazioni fra i temi e sulle applicazioni alla fisica, alla biologia, all'informatica, alle comunicazioni digitali, al design artistico.
pp. 462, L. 35.000

Se siete interessati al catalogo o all'acquisto di alcuni libri potete ritagliare la cedola e inviarla a: franco muzzio editore, via makalé 73, 35138 padova (l'invio contrassegno sarà gravato da L. 2.000 di spese).

titolo

nome e cognome

indirizzo