

Valutazione di marker di stress ossidativo in gatti diabetici come possibile indice predittivo di remissione

Dr. Francescopio Incorvaia

Medico veterinario, Via Ipsas, 13/d, 92100 Agrigento (AG), Italia, francescopio.incorvaia@gmail.com

Dr.ssa Laura Da Dalt, PhD

Dipartimento Biomedicina Comparata e Alimentazione (BCA), Università degli Studi di Padova, via dell'Università, 16 – Agripolis, 35020 Legnaro (PD), Italia, laura.dadalt@unipd.it

Prof. Gianfranco Gabai, PhD

Professore di Fisiologia Veterinaria, Dipartimento Biomedicina Comparata e Alimentazione (BCA), Università degli Studi di Padova, via dell'Università, 16 – Agripolis, 35020 Legnaro (PD), Italia, gianfranco.gabai@unipd.it

Dr. Eric Zini, PhD

PD, Dipl. ECVIM-CA (Internal Medicine), Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute (MAPS), Università degli Studi di Padova, via dell'Università, 16 – Agripolis, 35020 Legnaro (PD), Italia, eric.zini@unipd.it

SUMMARY

The aim of the present study is to evaluate different markers of oxidative stress in the erythrocyte of diabetic cats, diagnosed ex-post in remission (R) or not in remission (NR). This is in order to identify predictive indicators of clinical remission in feline diabetes mellitus (DM). In the cytosol and erythrocyte membranes, different markers of oxidative stress have been evaluated over the proteins (carbonyls, AGE, pentosidine, AOPP) and lipids (MDA, 4HNE), as well as thiols, important antioxidant. Comparisons were made between the different markers, previously analysed during the diagnosis (T0), of the three groups of cats (non-diabetic, R and NR). Later, it has been analysed the trend of the markers of diabetic cats R and NR by reference to time (T0, T20-30, T90-120 days). The study was conducted on 27 diabetic cats (15R, 12NR) and 11 non-diabetic cats. In the diabetic cats it was observed a greater concentration of carbonyls in the membrane and a lower concentration of thiols in the cytosol of erythrocytes compared to non-diabetic cats. The TBARs were greater in the cytosol of erythrocytes of non-diabetic cats, probably because of a problem in the conservation of the samples. There were no relevant differences between cats R and NR; though the trend of AOPP in the erythrocyte membranes of the R group shows a variability across time. In conclusion, it was not possible to individuate a predictive indicator of clinical remission in feline diabetes mellitus. However, some relevant differences of oxidative stress markers were detected and analysed between non-diabetic and diabetic cats for the first time in veterinary medicine research.

KEY WORDS cat – diabetes mellitus – oxidative stress – clinical remission - marker

INTRODUZIONE

Il diabete mellito può essere considerato come un “gruppo di malattie metaboliche caratterizzate da un’iperglicemia derivante da difetti nella secrezione dell’insulina, nell’azione dell’insulina o di entrambi” (The Expert Committee, 2003). Nell’uomo le forme più frequenti sono il tipo I, dovuto ad una distruzione autoimmune delle cellule β delle isole di Langerhans, e il tipo II, dato da meccanismi di insulino-resistenza spesso associati ad una riduzione della funzionalità delle cellule β (Alberti and Zimmet, 1998; Kuzuya and Matzuda, 1997). Nonostante i pochi dati che lo confermano, si presume che circa l’80% dei gatti diabetici

soffre di un diabete mellito di tipo 2-simile, che è una patologia imputabile a una resistenza all’insulina in fegato, muscolo e tessuto adiposo, combinato ad una insufficienza delle cellule β del pancreas endocrino (Reusch, 2015), con una prevalenza che si attesta intorno all’1.2% ed un rischio maggiore nei gatti con età maggiore di 7 anni, maschi, sterilizzati e di razza Burmese (Prahl et al., 2007; McCann et al., 2007). Tuttavia, il più importante fattore di rischio è rappresentato dall’obesità (Osto et al., 2013), che aumenta di 3,9 volte la probabilità di sviluppare il DM (Scarlett et al., 1998). La diagnosi di DM viene effettuata in caso di: presenza dei segni clinici (poliuria, polidipsia, dimagrimento), iperglicemia

persistente a digiuno e glicosuria (Reusch, 2014). Bisogna, però, escludere sempre la presenza di un'iperglicemia da stress, che si manifesta con livelli di glucosio elevati ma mediamente molto più bassi rispetto ai gatti diabetici (Laluha et al., 2004), e che non provoca un rialzo della fruttosamina sierica, essendo questo un parametro che valuta il controllo glicemico delle 2-3 settimane precedenti e non risente, quindi, di variazioni glicemiche acute (Reusch, 2015). Nonostante la fisiopatologia del DM felino sia simile a quella del diabete di tipo 2 umano, la terapia insulinica è attualmente il trattamento più efficace per raggiungere un miglior controllo glicemico e per evitare complicazioni pericolose per la vita dei gatti diabetici (Osto et al., 2013).

Il comportamento del diabete nel gatto presenta, però, una particolare caratteristica: il gatto può andare incontro ad una remissione clinica della patologia in una buona percentuale di casi rispetto agli altri mammiferi. Il termine "remissione diabetica" o "diabete mellito transitorio" viene utilizzato quando la somministrazione di insulina può essere sospesa per almeno 4 settimane e quando, insieme al ripristino della normale concentrazione di glucosio ematico, si ha la scomparsa della sintomatologia clinica (Zini et al., 2010).

Nel gatto ci sono diversi fattori in grado di favorire la remissione clinica della malattia e tra questi vi è certamente uno stretto controllo glicemico raggiunto prima possibile attraverso la terapia insulinica. Inoltre, si è visto che i gatti più anziani vanno in remissione con maggiore frequenza rispetto ai più giovani e che alti livelli di colesterolo nel sangue risultano essere un fattore predittivo negativo, diminuendo del 65% le probabilità di remissione clinica (Zini et al., 2010). In alcuni studi è stato, inoltre, osservato che i gatti trattati con insulina Glargine avevano maggiori *chances* di ottenere la remissione clinica (Marshall et al., 2009) così come i gatti alimentati con una dieta povera o priva di carboidrati (Bennet et al., 2006; Lien and Huang, 2013).

Il termine "stress ossidativo" indica un eccesso di agenti ossidanti endogeni o esogeni che sono in grado di provocare delle importanti alterazioni a tessuti e cellule, soprattutto quando le difese antiossidanti prodotte dall'organismo non bastano a tamponare la loro azione (Corti et al., 2009). Nel corso

dei processi infiammatori i granulociti e i macrofagi secernono nei tessuti diverse sostanze ossidanti, tra cui alcune specie molecolari dotate di notevole reattività, derivate dall'ossigeno (ROS) e dall'azoto (RNS) (Corti et al., 2009). L'analisi diretta di ROS/RNS è, però, estremamente difficile a causa delle loro elevate reattività e breve emivita, quindi, per lo studio dello stress ossidativo ci si avvale principalmente di metodi in grado di rilevare le alterazioni indotte su proteine (carbonili, AGE, pentosidine, AOPP), lipidi (MDA, 4-HNE) e DNA, oltre che alla valutazione delle sostanze antiossidanti (Franzini et al., 2009).

Nel diabete di tipo 2 umano l'iperglicemia, spesso associata a iperlipidemia, si traduce in un'aumentata produzione mitocondriale del radicale superossido con conseguente aumentata esposizione delle cellule ai ROS. L'iperglicemia sembra, inoltre, aumentare l'espressione e l'attività della NOS a livello vascolare con aumentati livelli di NO, tanto da far parlare di un vero e proprio "stress nitrosativo" nel diabete (Corti et al., 2009) che può svolgere un importante ruolo nello sviluppo e nella progressione di malattie cardiovascolari (Stevens, 2005).

In letteratura esistono solo due pubblicazioni che trattano il tema dello stress ossidativo nei gatti affetti da DM di tipo 2. Nel 1995, Christopher et al. hanno osservato un aumento della percentuale di eritrociti contenenti corpi di Heinz nei gatti diabetici rispetto ai sani. Nel 2009, invece, Webb et al. hanno visto che i gatti diabetici avevano dei livelli di superossido dismutasi (SOD), un importante enzima antiossidante, più bassi dei gatti sani.

Con questo studio sperimentale siamo andati, quindi, a selezionare e quantificare alcuni tra i principali *marker* di stress ossidativo in due gruppi di gatti diabetici, uno che andrà incontro a remissione e l'altro che continuerà a presentare i sintomi tipici della malattia, confrontandoli anche con un gruppo di gatti sani, e partendo dall'ipotesi che la formazione di radicali liberi possa giocare un ruolo importante nella possibilità o meno di remissione clinica del DM felino.

MATERIALI E METODI

Animali

In questo studio hanno partecipato 27 gatti con diabete mellito diagnosticato tra luglio 2008 e gennaio 2011 e con un'età media di

11 alla diagnosi. Oltre a questi, lo studio ha incluso anche 11 gatti sani, come gruppo di controllo, con un'età media di 6,1 anni. I gatti iscritti allo studio sono stati ospedalizzati per 7 giorni consecutivi dopo la diagnosi.

A tutti i gatti diabetici è stata eseguita una valutazione approfondita, tra cui: esame fisico, esame emocromocitometrico, profilo biochimico sierico, misurazione delle fruttosamine e della concentrazione di T4 totale, analisi delle urine, inclusa coltura batterica e rapporto tra proteine urinarie e creatinina, misurazione della pressione sanguigna, radiografia toracica e addominale e ecografia addominale. I gatti diabetici con chetoacidosi sono stati inclusi nello studio solo se l'acidemia si risolveva e se le loro condizioni generali miglioravano entro 48 ore dalla terapia insulinica. I gatti con patologie concomitanti alla diagnosi (come ad esempio insufficienza renale, disordini gastroenterici, patologie cardiache, altre endocrinopatie o neoplasie) non hanno partecipato allo studio. Tutti i gatti sono stati trattati con insulina Glargine e sono stati, inoltre, alimentati con una dieta ad alto contenuto proteico e basso contenuto di carboidrati.

Dei 27 gatti diabetici, 15 sono andati incontro a remissione clinica della patologia e 12 hanno continuato a manifestare la malattia. Per ogni gatto diabetico sono stati effettuati dai 3 ai 5 prelievi ematici a distanza di diversi giorni o mesi l'uno dall'altro. I gatti diabetici inclusi nello studio sono stati rivalutati clinicamente 1, 2-3, 6-8, 12-16, e 24 settimane dopo la dimissione dalla clinica.

Il dosaggio insulinico è stato regolato sulla base dei segni clinici, del risultato dell'esame fisico, della curva di glucosio ematico e del livello di fruttosamine; l'obiettivo era di risolvere i segni clinici di DM, di mantenere la curva glicemica tra 90 e 270 mg/dL e di ottenere una concentrazione di fruttosamine sotto i 400 $\mu\text{mol/L}$.

Per escludere lo sviluppo di patologie concomitanti in ogni rivalutazione sono stati effettuati dei test diagnostici, tra cui: emocromocitometrico, profilo biochimico sierico, concentrazione di fruttosamine, analisi delle urine, rapporto proteine urinarie/creatinina e misurazione della pressione sanguigna. La remissione è stata definita come l'assenza di segni clinici di DM (poliuria/polidipsia, polifagia, ecc.) con una normale glicemia (72-162 mg/dL) e normale

concentrazione di fruttosamine ($< 340 \mu\text{mol/L}$) per almeno 4 settimane dopo la sospensione delle iniezioni di insulina.

Estrazione delle membrane eritrocitarie

Il campione di sangue è stato prelevato con l'utilizzo di provette con anticoagulante EDTA e centrifugate per separare il plasma dalla componente cellulare. Successivamente la porzione cellulare è stata conservata a -80°C fino al momento dell'analisi.

Le membrane cellulari sono state separate mediante lisi con 500 μl di tampone pH8 con 1mM EDTA in presenza di inibitori e centrifugate con ultracentrifuga a 25.000g per 20 min. a 4°C (Kottahachchi et al., 2015). Il citosol è stato raccolto e conservato a -80°C fino al momento dell'analisi. Le membrane sono state lavate 3 volte, a 25.000g per 15 min. a 4°C , con 5 ml di PBS 5mM e risospese in 200 μl di TRIS 10mM pH8.8 con inibitori e conservato a -80°C fino al momento dell'analisi.

Quantificazione dei marker di stress ossidativo

Le AOPP sono misurate utilizzando il metodo spettrofotometrico di Witko-Sarsat con alcune modifiche (Witko-Sarsat et al., 1996; Witko-Sarsat et al., 1998), su lettore di micropiastre (Packard Instrument, Meriden, CT, USA) utilizzando una curva di calibrazione con clorammina-T diluita in PBS. I carbonili proteici sono stati misurati in seguito alla loro derivatizzazione con DNPH (2,4-dinitrofenilidrazina; Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO). Questa tecnica è stata intrapresa da Levine ed è divenuta la metodica più utilizzata per la determinazione delle proteine ossidate (Levine et al., 1990; Reznick et al., 1994; Dalle-Donne et al., 2003), successivamente sono stati letti allo spettrofotometro con un'assorbanza di 380nm.

I gruppi tiolici sono stati determinati in seguito alla loro reazione con il reagente di Ellman che reagendo con i gruppi solfidrilici liberi produce una soluzione di colore giallo misurabile mediante lettura allo spettrofotometro (Hu, 1994).

Le aldeidi prodotte dalla lipoperossidazione lipidica sono state misurate tramite il saggio con l'acido tiobarbiturico (TBA) (Yoshida et al., 2005; Vignagre et al., 2012). In condizioni acide e ad elevata temperatura la malondialdeide (MDA) reagisce con il TBA in rapporto di 1 a 2. La concentrazione

dell'addotto che si forma è determinata con una lettura spettrofotometrica a 532 nm.

La quantificazione degli addotti è stata eseguita sul pellet di membrana (Ferretti et al., 2007; Yamamoto et al., 2002). I campioni sono stati diluiti 1:50 e trasferiti su micro piastra da 96 pozzetti (100 µl/well). La lettura è stata eseguita su lettore di micropiastre VICTOR X100 (Perkin-Elmer Life and Analytical Sciences, Shelton, CT, USA) utilizzando filtri ad eccitazione ed emissione. L'indice della presenza di addotti è stata determinata dal rapporto delle AUF (*arbitrary units of fluorescence*) rispetto al bianco e moltiplicate per il fattore di moltiplicazione, e poi espresse per mg di proteina.

Analisi dei risultati

Tutti i test statistici sono stati eseguiti utilizzando il pacchetto SPSS 24.0. Sono state valutate le seguenti ipotesi:

- È stato valutato se i parametri considerati fossero in grado di discriminare i soggetti diabetici da animali di controllo, clinicamente sani, al giorno 0 (test di Mann-Whitney).
- Si è studiato se ci fossero differenze nella distribuzione dei risultati tra gli animali di controllo, i soggetti in remissione ed i soggetti non in remissione al giorno 0 (test di Kruskal-Wallis).

Infine, non disponendo di misure ripetute per i soggetti sani, si è proceduto ad eseguire una analisi della varianza, utilizzando un modello MIXED, per valutare eventuali differenze tra i soggetti con remissione e quelli senza remissione presenti nel corso del follow-up. Il modello ha incluso la variabile animale come effetto casuale, e le variabili Diagnosi ex post (D; Remissione vs Non-Remissione), Prelievo (P; T0, T20-30, T90-120 giorni), D*P e la covariata Fruttosamine (F; variabile continua) come effetti fissi. Prima dello svolgimento dell'analisi della varianza, le variabili sono state sottoposte al test di Kolmogorov-Smirnov per valutare se la distribuzione del campione fosse normale. Le variabili che non si distribuivano normalmente, sono state trasformate nel logaritmo naturale prima di essere sottoposte all'analisi della varianza.

RISULTATI

Confronti alla diagnosi

Con il test di Kruskal-Wallis sono stati confrontati i tre gruppi (gatti sani, R e NR) al momento della diagnosi (T0). Sono

state trovate differenze statisticamente significative ($p < 0.05$) tra il gruppo di controllo e i diabetici, ma non si sono evidenziate grosse differenze tra i gatti R e NR.

Nella figura 1 si nota che il livello di TBARs nel citosol degli eritrociti al T0 è più elevato nei gatti di controllo rispetto ai diabetici (sia R che NR).

I tioli presenti nel citosol dei globuli rossi (Figura 2) risultano essere più elevati nel gruppo dei gatti sani rispetto ai diabetici, sia con che senza remissione.

In figura 3 possiamo evidenziare una quantità di carbonili totali nelle membrane eritrocitarie decisamente maggiore nei gatti diabetici, sia R che NR, rispetto ai gatti di controllo.

Gli altri parametri presi in considerazione nella presente tesi non presentavano differenze statisticamente significative al momento della diagnosi (T0). Nella tabella 1 sono indicate le medie reali con gli errori standard dei vari marker non significativi alla diagnosi.

Confronti nel follow-up

Nei soggetti diabetici classificati ex post in soggetti in remissione (R) e soggetti in non remissione (NR) è stato studiato il profilo dei parametri considerati in base al tempo (T0, T20-30, T 90-120 giorni) tramite un modello MIXED ANOVA (SPSS 24.0). In questa analisi dei risultati, non sono stati inclusi i gatti sani, poiché nel gruppo di controllo non sono state eseguite misure ripetute nello stesso soggetto, bensì è stato eseguito un solo prelievo di sangue al tempo 0. I risultati mostrati nelle figure sono espressi come medie stimate. Inoltre, nelle figure è stata inserita la media aritmetica reale dei parametri misurati nei soggetti di controllo al T0.

Le AOPP (prodotti proteici di ossidazione

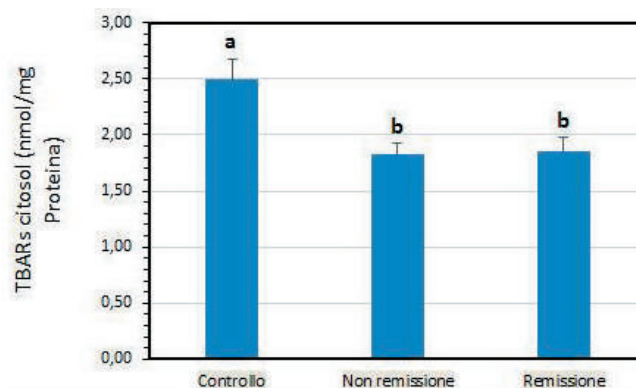


Figura 1. Livelli di TBARs nel citosol degli eritrociti al T0 (diagnosi) nei tre gruppi. Lettere diverse indicano variazioni statisticamente differenti ($p < 0.05$); test di Kruskal-Wallis.

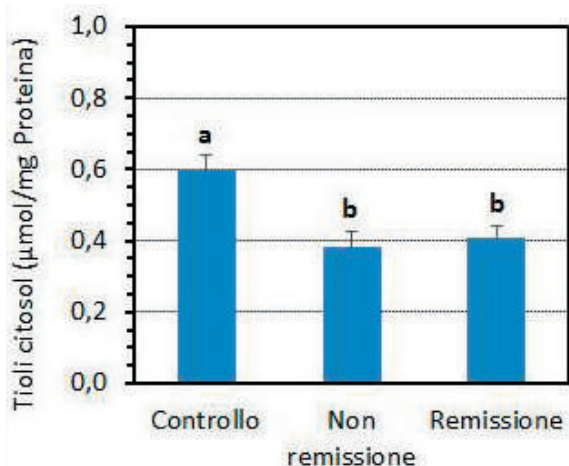


Figura 2. Livelli di tioli nel citosol degli eritrociti al T0 (diagnosi) nei tre gruppi. Lettere diverse indicano variazioni statisticamente differenti (a, b $p < 0.05$); test di Kruskal-Wallis.

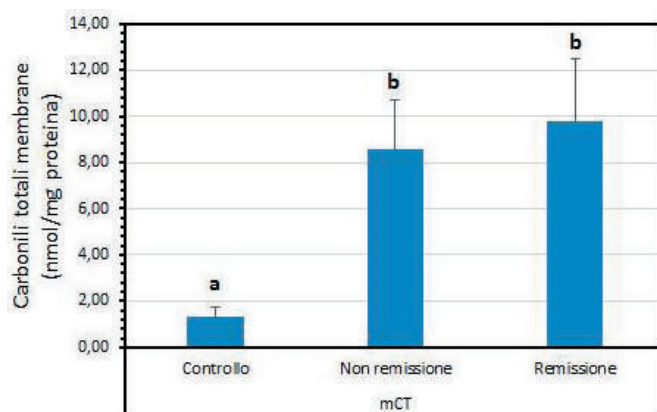


Figura 3. Livelli di carbonili totali nelle membrane eritrocitarie al T0 (diagnosi) nei tre gruppi di diagnosi. Lettere diverse indicano variazioni statisticamente differenti (a, b $p < 0.05$); test di Kruskal-Wallis.

avanzata) misurate a livello delle membrane dei globuli rossi sono il dato che forse più di tutti gli altri ha mostrato delle variazioni significative nel tempo all'interno di un gruppo di diagnosi. Osservando i risultati riportati in figura 4, si nota, infatti, una significativa riduzione delle AOPP tra T0 e T20-30 nel gruppo dei gatti R. Inoltre, si osserva che le AOPP sono tendenzialmente più elevate nei soggetti del gruppo R già al momento della diagnosi (T0).

Nella figura 5 è messo in evidenza dai contrasti lineari un significativo ($P < 0.05$) calo degli AGE nelle membrane degli eritrociti nel gruppo dei gatti R dal giorno della diagnosi fino al prelievo effettuato a 90-120 giorni. Tuttavia, si può osservare che le medie stimate non sono realistiche a T90-120, e la riduzione di questo parametro deve essere considerata con estrema cautela.

	CT	NR	R
addotti 4HNE (UAF/mg)	53,70 ± 13,55	69,35 ± 18,92	87,77 ± 32,37
addotti MDA (UAF/mg)	19,05 ± 2,69	19,34 ± 1,71	17,78 ± 2,76
addotti AGE (UAF/mg)	35,49 ± 11,19	30,29 ± 5,94	44,61 ± 20,10
Pentosidine membrane (UAF/mg)	23,86 ± 5,80	35,02 ± 7,71	46,54 ± 17,67
Tioli membrane (umol/mg)	0,16 ± 0,03	0,16 ± 0,03	0,13 ± 0,03
AOPP membrane (ng/mg)	55,08 ± 8,23	39,82 ± 6,81	58,05 ± 6,47

Tabella 1. Marker di stress ossidativo che hanno dato risultati statisticamente non significativi al T0 nei tre gruppi di gatti (controllo, NR e R). Nella tabella sono indicate le medie reali ± errore standard.

Sebbene l'analisi della varianza non abbia messo in evidenza alcun effetto significativo delle variabili indipendenti sulla concentrazione dei TBARS nel citosol degli eritrociti, nella figura 6 viene riportato un calo significativo ($P < 0.05$; contrasti lineari) di questo parametro tra T0 e T20-30 nel gruppo di gatti diabetici in remissione (R). Anche questo dato, però, deve essere considerato con cautela, in quanto i TBARS citoplasmatici sono significativamente maggiori nei soggetti di controllo già al primo prelievo (T0). Sebbene l'analisi della varianza non abbia evidenziato effetti significativi delle variabili

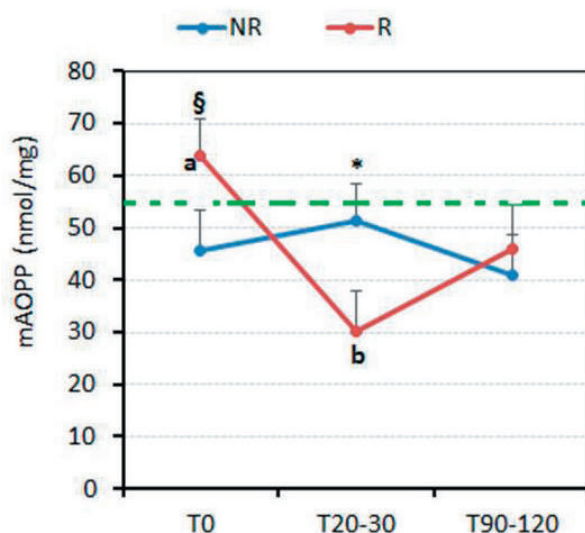


Figura 4. Variazione delle AOPP nelle membrane eritrocitarie in base al tempo (T0, T20-30, T90-120 giorni) all'interno dei due gruppi (NR: non remissione; R: remissione). La linea tratteggiata verde rappresenta la media reale del gruppo di controllo al T0. Simboli diversi nello stesso tempo indicano medie statisticamente significative (§ $P < 0.10$; * $P < 0.05$). Lettere diverse nello stesso gruppo "diagnosi" (R o NR) indicano variazioni statisticamente differenti (a, b $P < 0.05$); nel grafico vengono riportate medie ed errore standard stimati mediante MIXED ANOVA.

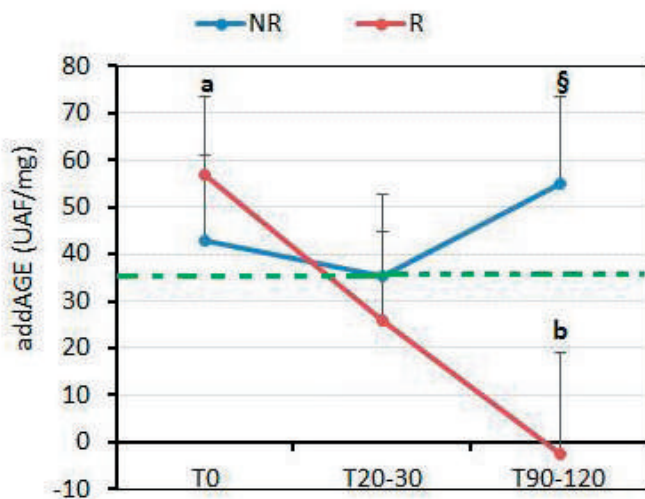


Figura 5. Variazione degli addotti AGE (prodotti di glicosilazione avanzata) nelle membrane eritrocitarie in base al tempo (T0, T20-30, T90-120 giorni) all'interno dei due gruppi (NR: non remissione; R: remissione). La linea tratteggiata verde rappresenta la media reale del gruppo di controllo al T0. Simboli diversi nello stesso tempo indicano medie statisticamente significative ($P < 0.10$; $*P < 0.05$). Lettere diverse nello stesso gruppo "diagnosi" (R o NR) indicano variazioni statisticamente differenti (a, b $P < 0.05$); nel grafico vengono riportate medie ed errore standard stimati mediante MIXED ANOVA.

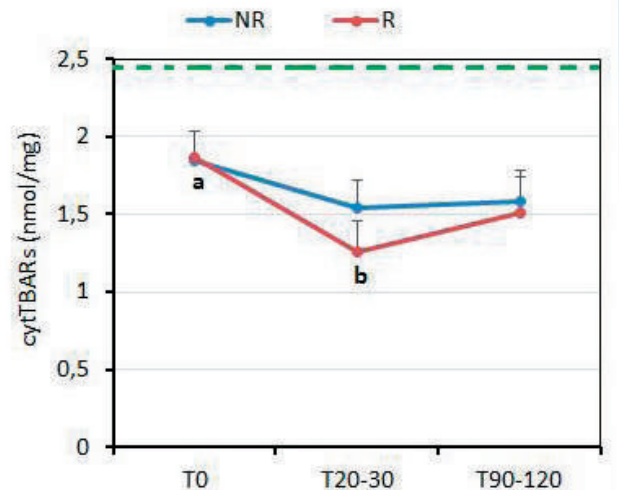


Figura 6. Variazione dei TBARS nel citosol degli eritrociti in base al tempo (T0, T20-30, T90-120 giorni) all'interno dei due gruppi (NR: non remissione; R: remissione). La linea tratteggiata verde rappresenta la media reale del gruppo di controllo al T0. Simboli diversi nello stesso tempo indicano medie statisticamente significative ($P < 0.10$; $*P < 0.05$). Lettere diverse nello stesso gruppo "diagnosi" (R o NR) indicano variazioni statisticamente differenti (a, b $P < 0.05$); nel grafico vengono riportate medie ed errore standard stimati mediante MIXED ANOVA.

indipendenti considerate (Diagnosi, Prelievo, Diagnosi*Prelievo, Fruttosamina) sugli altri biomarcatori, nella tabella 2 vengono indicate le medie reali con gli errori standard dei vari marker da noi analizzati a T0, T20-30 e T90-120 giorni, in quanto non risulta che siano mai stati descritti nella specie felina.

Discussione

Questo lavoro rappresenta, a conoscenza dello scrivente, il primo studio in cui si prova a comprendere se la presenza dello stress ossidativo può essere o meno correlata alla remissione clinica del DM felino. Sono stati misurati dei marker di stress ossidativo nelle membrane e nel citosol dei globuli rossi di gatti diabetici e sani. Nel gatto esistono pochissimi dati in letteratura che possano offrire dei termini di paragone con i risultati da noi ottenuti.

Da questo lavoro possiamo dedurre che nel gatto diabetico si ha una forte presenza di stress ossidativo a carico degli eritrociti. La maggiore concentrazione di carbonili totali nelle membrane (Figura 3), così come la bassa quantità di tioli nel citosol degli eritrociti dei gatti diabetici (Figura 2) rispetto ai sani, ci conferma il fatto che vi è una elevata ossidazione delle proteine e una diminuzione delle difese antiossidanti nei gatti con DM, cosa che non era mai stata osservata. I tioli sono, infatti, degli antiossidanti specifici per l'ossido nitrico, che reagendo con essi produce cGMP, ed è quindi opportuno che mantengano la loro integrità, ovvero la conservazione dei gruppi SH (Masha et al., 2012). In presenza di iperglicemia vengono generate grandi quantità di ROS

	Carbonili totali membrane			Tioli citosol			Tioli membrane		
	C	NR	R	C	NR	R	C	NR	R
T0	1,33 ± 0,41	8,57 ± 2,16	9,79 ± 2,69	0,60 ± 0,04	0,38 ± 0,05	0,41 ± 0,03	0,16 ± 0,03	0,16 ± 0,03	0,13 ± 0,03
T20-30	-	7,35 ± 2,02	10,21 ± 5,04	-	0,42 ± 0,04	0,48 ± 0,04	-	0,17 ± 0,04	0,12 ± 0,02
T90-120	-	4,23 ± 1,33	8,43 ± 1,95	-	0,45 ± 0,04	0,47 ± 0,04	-	0,11 ± 0,02	0,13 ± 0,02

Tabella 2. Marker di stress ossidativo (addotti MDA, addotti 4-idrossinonenale e pentosidine) che hanno dato risultati statisticamente non significativi con l'analisi MIXED ANOVA. Nella tabella sono indicate le medie reali ± errore standard nei tre gruppi di gatti (controllo, NR e R) al T0, T20-30 e T90-120 giorni.

	Addotti MDA			Addotti 4HNE			Pentosidine membrane		
	C	NR	R	C	NR	R	C	NR	R
T0	19,05 ± 2,69	19,34 ± 1,71	17,78 ± 2,76	53,70 ± 13,55	69,35 ± 18,92	87,77 ± 32,37	23,86 ± 5,80	35,02 ± 7,71	46,54 ± 17,67
T20-30	-	23,39 ± 4,44	25,25 ± 13,59	-	86,26 ± 29,97	117,41 ± 89,18	-	44,33 ± 14,98	44,71 ± 31,68
T90-120	-	28,75 ± 11,91	12,49 ± 2,89	-	132,72 ± 97,60	26,34 ± 4,54	-	88,96 ± 68,05	14,74 ± 2,72

Tabella 3. Marker di stress ossidativo (Carbonili totali, tioli citosol e tioli membrane) che hanno dato risultati statisticamente non significativi con l'analisi MIXED ANOVA. Nella tabella sono indicate le medie reali ± errore standard nei tre gruppi di gatti (controllo, NR e R) al T0, T20-30 e T90-120 giorni.

che ossidano i tioli, facendo diminuire la loro presenza a livello intracellulare (Masha et al., 2012), ed è, quindi, un dato interessante che ci sia un livello di tioli nel citosol più basso nei gatti diabetici, similmente a quanto avviene nell'uomo, anche se si è visto che negli uomini con DM di tipo 2, senza complicazioni secondarie, il livello di tioli non era diverso rispetto al gruppo di controllo (Telci et al., 2000).

I gruppi carbonilici sono, invece, un prodotto di ossidazione delle proteine, la cui formazione rappresenta un marcatore di stress ossidativo severo e generalizzato (Franzini et al., 2009), considerato più vantaggioso rispetto ai marker di perossidazione lipidica, perché l'ossidazione proteica è generalmente più stabile (Dalle Donne et al., 2003). In diversi studi è stato osservato un aumento dei carbonili totali negli esseri umani con DM di tipo 2. Telci et al. (2000), ad esempio, hanno osservato un aumento dei carbonili totali nel plasma di pazienti diabetici rispetto ai sani. Questo aumento dei carbonili era presente sia nei diabetici con complicazioni secondarie che in quelli che non presentavano complicazioni. Non ci sono dati in letteratura, però, sul livello di carbonili nei gatti sia diabetici che sani; questo potrebbe, quindi, confermare nel gatto diabetico, similmente a quanto si è visto nell'uomo, una importante presenza di danno ossidativo a carico delle proteine delle membrane eritrocitarie. Il dato che mostra, invece, il livello di TBARs al momento della diagnosi più alto nel citosol dei globuli rossi dei gatti sani rispetto ai gatti diabetici (Figura 1) è in contrasto con i dati presenti in letteratura, i quali affermano che la presenza di TBARs è maggiore nei pazienti umani affetti

da diabete mellito di tipo 2 rispetto ai sani (Hernández-Muñoz et al., 2013). I TBARs (*thiobarbituric acid reactive substances*) servono a misurare la malondialdeide (MDA), che è un importante indice di perossidazione lipidica, proprio perché, quest'ultima, reagisce con l'acido tiobarbiturico (TBA) (Franzini et al., 2009). In uno

studio si è osservato che il livello di TBARs nel siero è più alto negli uomini con un diabete mellito scarsamente controllato rispetto ai diabetici con un buon controllo glicemico (Komosinska-Vassev et al., 2005). Nell'uomo, inoltre, è stata misurata l'MDA nelle membrane eritrocitarie dei soggetti diabetici e si è osservato, anche in questo caso, un aumento dell'MDA nei pazienti diabetici, soprattutto se affetti da complicazioni secondarie (Ankush et al., 2009). Solamente Christopher et al. (1995) hanno provato a misurare i TBARs nei gatti diabetici, confrontandoli con dei gatti sani, ed essi, testati però nelle membrane dei globuli rossi, sono risultati leggermente superiori nei diabetici, anche se queste differenze non erano statisticamente significative. La mancata concordanza dei nostri risultati con i dati trovati in letteratura potrebbe essere dovuta al fatto che i globuli rossi dei gatti diabetici che hanno partecipato a questo studio sono stati conservati in congelatore a -80° per molto tempo, addirittura anni, prima di essere analizzati; a differenza dei campioni dei gatti sani che sono stati analizzati poco tempo dopo il prelievo. Secondo Wasowicz et al. (1993), infatti, l'MDA nel siero subisce delle importanti fluttuazioni se i campioni sono conservati in congelatore già 35 giorni dopo il congelamento.

Un'altra ipotesi che spiega il risultato dei TBARs potrebbe risiedere nel particolare comportamento degli eritrociti nei soggetti diabetici. In diversi studi è riportato, infatti, che nei pazienti con DM vi è, oltre ad un aumento dello stress ossidativo, una ridotta emivita degli eritrociti. È stato osservato che nei globuli rossi di uomini con DM di tipo 2 si ha una maggiore attivazione della caspasi 3, un enzima che la cellula usa per attivare l'apoptosi, rispetto agli eritrociti dei pazienti sani. Questo meccanismo di "eritrosi" è correlato positivamente al livello di glucosio ematico (Maellaro et al., 2013). Inoltre, è stata

trovata, nei pazienti diabetici, una correlazione positiva tra un aumento dell'apoptosi degli eritrociti e un aumento dei livelli di lipoperossidazione (Calderón-Salinas et al., 2011). Ciò ci induce a pensare che lo stress ossidativo presente nel paziente diabetico può essere responsabile della maggiore attivazione della caspasi 3 e, alterando il mantenimento della forma e della funzione della membrana eritrocitaria, può contribuire alla ridotta durata della vita dei globuli rossi nelle persone affette da DM di tipo 2 (Maellaro et al., 2013). Inoltre, Gwozdzinski et al. (2017) hanno valutato diversi parametri di stress ossidativo nei globuli rossi di uomini cercando di differenziare il loro livello in tre frazioni eritrocitarie (globuli rossi giovani, di media età e vecchi). I risultati hanno mostrato che lo stress ossidativo è nettamente maggiore nei globuli rossi più anziani, tanto che i TBARs erano circa 3-4 volte maggiori rispetto agli eritrociti più giovani. Questo dato, unito alla maggiore velocità di apoptosi, e quindi di *turn-over*, che si ha in corso di diabete ci induce a pensare che nei gatti diabetici vi sia la presenza di un alto numero di globuli rossi giovani o di media età che, quindi, si potrebbe tradurre in una minore quantità di TBARs. Inoltre, bisogna sempre tener presente che in questo studio i TBARs sono stati misurati nel citosol degli eritrociti; il dato che nei pazienti diabetici vi sia un'alterazione della funzione e, quindi della permeabilità di membrana eritrocitaria, ci porta ad ipotizzare che nei gatti diabetici l'MDA (che è il principale TBARs) si sia riversata al livello plasmatico causando un valore basso nelle nostre misurazioni al livello del citosol. Nei soggetti sani, invece, probabilmente, la membrana eritrocitaria intatta non ha permesso la fuoriuscita dell'MDA che è quindi risultato più elevato nel citosol (Figura 7).



Figura 7. Ipotesi che spiega il comportamento dell'MDA nel gatto sano e in quello diabetico.

Diversi *marker* che sono stati analizzati meriterebbero degli approfondimenti in futuro. Ad esempio gli AGE (*Advanced glycation end-product*), misurati nelle membrane dei globuli rossi, hanno mostrato un calo nel gruppo dei gatti R dal giorno della diagnosi fino al prelievo effettuato a 90-120 giorni (Figura 5). Le medie stimate a T 90-120 non sono, però, realistiche e questo dato va preso con estrema cautela, ma, il fatto che mostri questa forte tendenza, considerando che l'accumulo di AGE è favorito dall'iperglicemia cronica (Wu, 1993), fa sì che questo meriti delle ulteriori indagini future. Gli AGE sono proteine o lipidi che diventano glicosilati dopo l'esposizione a zuccheri (Goldin et al., 2006). Nei soggetti diabetici aumentano i livelli di metilgliossale (MGO), un α -dicarbonile altamente reattivo, che reagisce con l'arginina, la lisina e i gruppi sulfidrilici delle proteine inducendo la formazione di un gran numero di AGE (Ceriello, 2008). Non si sono evidenziate grandi differenze tra il gruppo di gatti R e NR per i vari *marker* analizzati, tranne che per l'andamento delle AOPP (prodotti proteici di ossidazione avanzata) che nelle membrane eritrocitarie dei gatti in remissione mostrano una variabilità nel tempo (Figura 4).

Le AOPP sono un indicatore di danno ossidativo a carico delle proteine (Celi and Gabai, 2014). In alcuni pazienti umani con diabete di tipo 2 i livelli di AOPP plasmatici appaiono più elevati rispetto a soggetti sani e tale aumento appariva più marcato nei soggetti con macroangiopatia e nei soggetti obesi con diabete di tipo 2. L'aumento delle AOPP nei pazienti diabetici obesi potrebbe essere dovuto al fatto che, in tali soggetti, si ha una produzione di citochine proinfiammatorie da parte delle cellule mononucleate (Piwowar et al., 2007). Considerando la forte correlazione tra le AOPP e l'aumento della risposta infiammatoria globale (Škvařilová et al., 2005), questo dato meriterebbe ulteriori indagini in futuro per provare a comprendere se un'alterazione della risposta neutrofila possa influire o meno con la remissione clinica del DM nel gatto. Un'altra possibile spiegazione dell'aumento delle AOPP nei gatti in remissione potrebbe essere rappresentata dal metabolismo del globulo rosso che è alterato in presenza di diabete e, quindi, di stress ossidativo. È stato, infatti, osservato che l'eccessiva quantità di

anione superossido O_2^- nei globuli rossi sottoposti a stress ossidativo può generare un'eccessiva quantità di H_2O_2 negli eritrociti che può, a sua volta, creare una miriade di alterazioni del globulo rosso, tra cui alterazioni della deformabilità delle membrane e delle caratteristiche di superficie delle cellule. Inoltre, in presenza di O_2^- e H_2O_2 si può avere la formazione di radicale ossidrilico (OH), che è il ROS più attivo in assoluto. La presenza di elevati livelli di ROS porta all'ossidazione di residui amminicoacidici, come la tirosina, che porta poi alla formazione di AOPP (Çimen, 2008; Witko-Sarsat et al., 1998). Un'eccessiva presenza di stress ossidativo va ad influenzare il metabolismo degli eritrociti e, considerando che le AOPP sono state misurate proprio a livello di membrane eritrocitarie, potrebbero aver risentito di questo meccanismo. Molti dei parametri che abbiamo studiato meriterebbero degli approfondimenti e

sarebbe opportuno che l'analisi di questi *marker* si effettuasse anche su campioni di plasma o siero. Un eventuale analisi futura di questi parametri effettuata anche nel plasma o nel siero, oltre che negli eritrociti, dei gatti con diabete mellito ci permetterebbe, infatti, oltre che di eliminare la variabile dell'aumentato *turn-over* dei globuli rossi nel diabete, di avere dei risultati paragonabili con l'uomo e le altre specie animali. Questo studio, comunque, nonostante non ci permetta di fare una predizione di remissione clinica del DM nel gatto, ci fa dedurre che nel gatto diabetico vi è un aumento dello stress ossidativo a carico dei globuli rossi. I risultati ottenuti rappresentano, dunque, un punto di partenza per ulteriori ricerche future che possano trovare una correlazione tra stress ossidativo e diabete, o, meglio, tra stress ossidativo e remissione clinica del diabete mellito felino.

BIBLIOGRAFIA

- Alberti K.G.M.M., Zimmet P.Z. for the WHO consultation. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of WHO consultation. *Diabetic medicine*, 1998; 15: 539-553.
- Ankush, R. D., Suryakar, A. N., & Ankush, N. R. (2009). Hypomagnesaemia in type-2 diabetes mellitus patients: A study on the status of oxidative and nitrosative stress. *Indian journal of clinical Biochemistry*, 24(2), 184-189.
- Bennett, N., Greco, D. S., Peterson, M. E., Kirk, C., Mathes, M., & Fettman, M. J. (2006). Comparison of a low carbohydrate-low fiber diet and a moderate carbohydrate-high fiber diet in the management of feline diabetes mellitus. *Journal of Feline Medicine & Surgery*, 8(2), 73-84.
- Calderon-Salinas, J. V., Munoz-Reyes, E. G., Guerrero-Romero, J. F., Rodriguez-Moran, M., Bracho-Riquelme, R. L., Carrera-Gracia, M. A., & Quintanar-Escorza, M. A. (2011). Eryptosis and oxidative damage in type 2 diabetic mellitus patients with chronic kidney disease. *Molecular and cellular biochemistry*, 357(1-2), 171-179.
- Celi, Pietro, and Gianfranco Gabai. "Oxidant/Antioxidant Balance in Animal Nutrition and Health: The Role of Protein Oxidation." *Frontiers in Veterinary Science* 2 (2014): 48-48.
- Ceriello, Antonio. "La "memoria metabolica": la nuova sfida nella terapia del diabete." *Il Diabete* 20 (2008): 205-14.
- Christopher, Mary M., John D. Broussard, and Mark E. Peterson. "Heinz body formation associated with ketoacidosis in diabetic cats." *Journal of Veterinary Internal Medicine* 9.1 (1995): 24-31.
- Çimen, MY Burak. "Free radical metabolism in human erythrocytes." *Clinica chimica acta* 390.1 (2008): 1-11.
- Corti Alessandro, Vincenzo DeTata, and Alfonso Pompella. "Agenti e meccanismi di stress ossidativo nella patologia umana." *Ligand Assay* 14.1 (2009): 9-16.
- Dalle-Donne, I., Giustarini, D., Colombo, R., Rossi, R., & Milzani, A. (2003). Protein carbonylation in human diseases. *Trends in molecular medicine*, 9(4), 169-176.
- Dalle-Donne, I., Rossi, R., Giustarini, D., Milzani, A., Colombo, R., 2003. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clinica Chimica Acta* 329, 23-38.
- Ferretti G., T. Bacchetti, S. Masciangelo, G. Pallotta 2007. Lipid peroxidation in hemodialysis patients: Effect of vitamin C supplementation. *Clinical Biochemistry* 41 (2008) 381-386.
- Franzini, Maria, Irene Fornaciari, and Vanna Fierabracci. "Indici di laboratorio di stress ossidativo (Rassegna)." *Ligand Assay* 14.1 (2009): 41.
- Goldin, A., Beckman, J. A., Schmidt, A. M., & Creager, M. A. (2006). Advanced glycation end products. *Circulation*, 114(6), 597-605.
- Gwozdziński, K., Pieniazek, A., Tabaczar, S., Jegier, A., & Brzeszczynska, J. (2017). Investigation of oxidative stress parameters in different lifespan erythrocyte fractions in young untrained men after acute exercise. *Experimental Physiology*, 102(2), 190-201.
- Hernández-Muñoz, R., Olguín-Martínez, M., Aguilar-Delfín, I., Sánchez-Sevilla, L., García-García, N., & Díaz-Muñoz, M. (2013). Oxidant status and lipid composition of erythrocyte membranes in patients with type 2 diabetes, chronic liver damage, and a combination of both pathologies. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2013.
- Hu, ML., 1994. Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma. *Methods in Enzymol.*, 233:380-385.
- Komosińska-Vashev, K., Olczyk, K., Olczyk, P., & Winsz-Szczotka, K. (2005). Effects of metabolic control and vascular complications on indices of oxidative stress in type 2 diabetic patients. *Diabetes research and clinical practice*, 68(3), 207-216.
- Kottahachchi D., Gooneratne L., Jayasekera A., Muth-Pawlak D., Moulder R., Imanishi S. I., Ariyaratne A., Rokka A., Corthals G. L., 2015. Quantitative analysis of the erythrocyte membrane proteins in polycythemia vera patients treated with hydroxycarbamide. *EuPA OPEN PROTEOMICS* 7, 43-53.

- Kuzuya, Takeshi, and Ayako Matsuda. "Classification of diabetes on the basis of etiologies versus degree of insulin deficiency." *Diabetes care* 20.2 (1997): 219-220.
- Lahuha, P., Gerber, B., Lahuha, D., Boretto, F. S., & Reusch, C. E. (2004). "Stress hyperglycemia in sick cats: a retrospective study over 4 years." *Schweizer Archiv fur Tierheilkunde*, 146(8), 375-383.
- Levine, R.L., Garland, D., Oliver, C.N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A.G., Ahn, B.W., Shaltiel, S., Stadtman, E.R., 1990. "Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins", *Methods in enzymology*. 186:464-478.
- Lien, Y. H., & Huang, H. P. (2013). Factors associated with clinical remission in cats with diabetes mellitus. *Acta Veterinaria Brno*, 81(4), 421-425.
- Maellaro, E., Leoncini, S., Moretti, D., Del Bello, B., Tanganelli, I., De Felice, C., & Ciccoli, L. (2013). Erythrocyte caspase-3 activation and oxidative imbalance in erythrocytes and in plasma of type 2 diabetic patients. *Acta diabetologica*, 50(4), 489-495.
- Marshall, R. D., Rand, J. S., & Morton, J. M. (2009). Treatment of newly diagnosed diabetic cats with glargine insulin improves glycaemic control and results in higher probability of remission than protamine zinc and lente insulins. *Journal of Feline Medicine & Surgery*, 11(8), 683-691.
- Masha, A., and V. Martina. "Ruolo della ridotta biodisponibilità di ossido nitrico nelle complicanze vascolari del diabete mellito." *G It Diabetol Metab* 32 (2012): 182-190.
- McCann, Theresa M., et al. "Feline diabetes mellitus in the UK: the prevalence within an insured cat population and a questionnaire-based putative risk factor analysis." *Journal of Feline Medicine & Surgery* 9.4 (2007): 289-299.
- Osto, M., Zini, E., Reusch, C. E., & Lutz, T. A. (2013). Diabetes from humans to cats. *General and comparative endocrinology*, 182, 48-53.
- Prah, Annalisa, et al. "Time trends and risk factors for diabetes mellitus in cats presented to veterinary teaching hospitals." *Journal of Feline Medicine & Surgery* 9.5 (2007): 351-358.
- Piwowar, Agnieszka, Maria Knapik-Kordecka, and Maria Warwas. "AOPP and its relations with selected markers of oxidative/antioxidative system in type 2 diabetes mellitus." *Diabetes Research and Clinical Practice* 77.2 (2007): 188-192.
- Reusch, Claudia. "Diabete mellito felino." *Trattato di Clinica Medica Veterinaria Ettinger 7a Edizione: Malattie Del Cane e Del Gatto*. Antonio Delfino Editore, 2015: 1796-1816.
- Reusch, Claudia E. "Feline diabetes mellitus." *Canine and Feline Endocrinology*, 4th ed.; Feldman, EC, Nelson, RW, Reusch, CE, Scott-Moncrieff, JCR, Behrend, EN, Eds (2014): 258-314.
- Reznick, AZ., Packer, L. 1994. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol*. 233:357-63.
- Scarlett, J. M., and S. Donoghue. "Associations between body condition and disease in cats." *Journal of the American Veterinary Medical Association* 212.11 (1998): 1725-1731.
- Škvařilová, M., Bulava, A., Stejskal, D., Adamovská, S., Bartek, J., Škvařilová, M., ... & Bartek, J. (2005). Increased level of advanced oxidation products (AOPP) as a marker of oxidative stress in patients with acute coronary syndrome. *Biomed papers*, 149(1), 83-7.
- Stevens, Martin J. "Oxidative-nitrosative stress as a contributing factor to cardiovascular disease in subjects with diabetes." *Current vascular pharmacology* 3.3 (2005): 253-266.
- Telci, A., Cakatay, U., Kayali, R., Erdoğan, C., Orhan, Y., Sivas, A., & Akcay, T. (2000). Oxidative protein damage in plasma of type 2 diabetic patients. *Hormone and Metabolic Research*, 32(01), 40-43.
- The Expert Committee. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes care* 26: 5-20, 2003.
- Vignagre C., Madeira, D., Narciso, L., Cabral, H.L., Diniz, M. 2012. Effect of temperature on oxidative stress in fish: Lipid peroxidation and catalase activity in the muscle of juvenile seabass, *Dicentrarchus labrax*. *Ecological Indicators* 23, 274-279.
- Wasowicz, Wojciech, Jean Neve, and Anne Peretz. "Optimized steps in fluorometric determination of thiobarbituric acid-reactive substances in serum: importance of extraction pH and influence of sample preservation and storage." *Clinical Chemistry* 39.12 (1993): 2522-2526.
- Webb, Craig B., and Lauren Falkowski. "Oxidative stress and innate immunity in feline patients with diabetes mellitus: the role of nutrition." *Journal of feline medicine and surgery* 11.4 (2009): 271-276.
- Witko-Sarsat, V., Friendlander, M., Capeillère-Blandin, C., Nguyen-Khoa, T., Nguyen, A.T., Zingraff, J., Jungers, P., Descamps-Latscha, B., 1996. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney International* 49, 1304-1313.
- Witko-Sarsat, V., Friendlander, M., Nguyen-Khoa, T., Capeillère-Blandin, C., Nguyen, A.T., Canteloup S, Dayer JM., Jungers, P., Drüeke, T., Descamps-Latscha, B., 1998. Advanced oxidation protein products as novel mediators of inflammation and monocyte activation in chronic renal failure. *Immunology* 161:2524-2532.
- Wu, J. T. (1993). Advanced glycosylation end products: a new disease marker for diabetes and aging. *Journal of clinical laboratory analysis*, 7(5), 252-255.
- Yamamoto, Y., Sakata, N., Meng, J., Sakamoto, M., Noma, A., Maeda, I., ... & Takebayashi, S. (2002). Possible involvement of increased glycoxidation and lipid peroxidation of elastin in atherogenesis in haemodialysis patients. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 17(4), 630-636.
- Yoshida, Y., Itoh, N., Hayakawa, M., Piga, R., Cynshi, O., Jishage, K. & Niki, E. 2005. Lipid peroxidation induced by carbon tetrachloride and its inhibition by antioxidant as evaluated by an oxidative stress marker, HODE. *Toxicology and applied pharmacology*, vol. 208, no. 1, pp. 87-97.
- Zini, E., Hafner, M., Osto, M., Franchini, M., Ackermann, M., Lutz, T. A., & Reusch, C. E. (2010). Predictors of clinical remission in cats with diabetes mellitus. *Journal of veterinary internal medicine*, 24(6), 1314-1321.