Applicazioni della proteomica nella patologia pancreatica cronica

D. Basso, A. Valerio*, M. Plebani

Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Università degli Studi di Padova
**Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Università degli Studi di Padova.*

Introduzione

Il carcinoma del pancreas esocrino è una neoplasia la cui incidenza è progressivamente aumentata negli ultimi anni, soprattutto nelle nazioni industrializzate. Negli Stati Uniti i decessi/anno per carcinoma del pancreas hanno superato quelli per neoplasia gastrica nel 1972 e, da allora, la tendenza è ancora in ascesa (1-4). In Italia è stata dimostrata una tendenza all'aumento progressivo della morte per neoplasia del pancreas negli ultimi decenni. I dati più recenti relativi alla regione Veneto (ISTAT 1995-96) riportano 760 nuovi casi/anno (370 maschi e 390 femmine) con una incidenza del 3% per i maschi e del 4% per le femmine. Nonostante i progressi compiuti nel campo delle tecniche chirurgiche, della chemioterapia e della radioterapia, il tasso di sopravvivenza a 5 anni dalla diagnosi varia dall' 1 al 4% (1,5,6).
Fra i numerosi fattori eziologici del cancro del pancreas, un ruolo certo è riconosciuto solo al fumo di sigaretta (3,7).
La maggior parte dei pazienti affetti da neoplasia solida negli stadi terminali, va incontro ad uno stato di deperimento fisico con perdita di peso, profonda astenia, anoressia ed anemia. Questa sindrome devastante nota con il termine di cachessia, è caratterizzata da una perdita di peso uguale o superiore ai 10 kg. Tale quadro si riscontra in una percentuale che varia a seconda delle casistiche tra il 40 ed il 70%; sembra determinato da un turnover proteico molto più veloce nei pazienti cachettici rispetto a quelli non cachettici. Questo aspetto può essere messo in relazione alla produzione da parte della neoplasia di sostanze che agirebbero stimolando i processi catabolici in genere, ma in particolare quelli delle proteine e dei lipidi.
Sono stati riconosciuti diversi fattori responsabili di queste azioni, tra i quali citochine come il Tumor Necrosis Factor α (TNF-α), l'Interleuchina 1 (IL1), l'Interleuchina 6 (IL6) (8-10), ma anche il PIF (Proteolysis-Inducing Factor) ed il LMF (Lipid-Mobilizing Factor) coinvolti rispettivamente nella deplezione della massa nel muscolo scheletrico e del tessuto adiposo (10).
Numerosi studi hanno dimostrato una stretta associazione fra carcinoma pancreatico e diabete mellito, diagnosticabile nell'80% dei pazienti affetti da tale patologia (7,11,12,13).
L'elevata frequenza di questa associazione, evidenzia come le due patologie siano strettamente correlate e probabilmente causa l'una dell'altra.
Tuttavia non sono ancora del tutto chiariti i meccanismi fisiopatologici alla base del legame fra le due patologie, anche se attualmente l'ipotesi più accreditata indica il carcinoma pancreatico come causa dell'insorgenza del diabete mellito e non viceversa. Il diabete, infatti, associato al carcinoma del pancreas, è di solito di recente insorgenza rispetto alla diagnosi di tumore (solitamente inferiore ai 6 mesi) e la rimozione chirurgica della massa neoplastica porta ad un netto miglioramento della tolleranza glucidica (14). Inoltre la recente letteratura non sembra aver dimostrato nei pazienti affetti da diabete mellito una maggior incidenza di carcinoma pancreatico rispetto alla popolazione generale (15).
Le ipotesi formulate per spiegare l'associazione fra carcinoma pancreatico e diabete mellito sono diverse: 1) La prima sostiene che la massa neoplastica potrebbe indurre diabete in seguito alla distruzione delle isole di Langerhans; questa ipotesi è stata considerata in un primo momento la più ovvia, ma è stata successivamente scartata sulla base di una serie di osservazioni clinico-sperimentali. In primo luogo il diabete associato a carcinoma pancreatico non è caratterizzato da severa riduzione della secrezione di insulina e glucagone, come invece si verifica quando vi sia una distruzione massiva del tessuto pancreatico endocrino (come si ha nella pancreatite cronica o nei pazienti pancreasectomizzati) (14). Il

Corrispondenza a: Dott.ssa Daniela Basso - Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Università degli Studi di Padova - E-mail: biolmol@unipd.it

diabete inoltre compare anche quando la neoplasia è di dimensioni estremamente ridotte e il tessuto endocrino ancora ben rappresentato. Il diabete regredisce in seguito alla rimozione chirurgica della massa neoplastica e di buona parte del pancreas sano adiacente, ma non è stata trovata alcuna correlazione fra dimensione del tumore ed alterato metabolismo glucidico (16,17). 2) La seconda ipotesi sostiene che la causa del diabete sia la ridotta capacità delle cellule β delle isole di Langerhans di rispondere con una adeguata secrezione insulinica ai vari stimoli. E' verosimile che nei pazienti affetti da neoplasia pancreatica la risposta insulinica a stimoli quali il glucagone o il pasto risulta ridotta, indipendentemente dalla presenza o assenza di iperglicemia a digiuno (18). 3) La terza ipotesi riconosce nello sviluppo di insulinoresistenza periferica la causa del diabete carcinoma pancreatico-associato. A favore di questo vi sono studi clinici effettuati mediante "clamp" iperglicemico o iperinsulinemico da un lato ed il riscontro frequente di iperinsulinismo dall'altro (14,18-21). Parlare di insulinoresistenza non significa peraltro chiarire quale sia esattamente il meccanismo molecolare che determina tale condizione. Questa condizione infatti potrebbe dipendere dalla presenza in circolo di insuline anomale, non riconosciute dal recettore per l'insulina, da anomalie del recettore sia funzionali che strutturali, oppure da meccanismi intracellulari capaci di antagonizzare la cascata di eventi indotta da una insulina normale che lega ed attiva un recettore normale.

Il diabete associato al tumore pancreatico presenta delle caratteristiche metaboliche in parte sovrapponibili a quelle del diabete di tipo II, essendo infatti state dimostrate una ridotta sensibilità dei bersagli periferici all'azione dell'insulina, ed una ridotta capacità di secrezione insulinica dopo adeguati stimoli, quali il glucagone o il pasto. Attualmente l'ipotesi più accreditata sembra dimostrare che la neoplasia pancreatica possa indurre diabete mellito attraverso la produzione di fattori solubili in grado di alterare sia la funzione delle beta cellule sia il metabolismo glucidico soprattutto degli organi principalmente coinvolti nel mantenimento dell'omeostasi glucidica: fegato, muscolo scheletrico e tessuto adiposo. Studi *in vitro* ed *in vivo* hanno dimostrato che estratti di tumore pancreatico erano in grado di ridurre l'accumulo di glicogeno nel muscolo di ratto isolato (17) e che l'iniezione giornaliera (protratta per un periodo di circa tre mesi) di terreno di coltura condizionato dalla crescita di una linea cellulare di carcinoma pancreatico, induceva la comparsa di diabete nei topi SCID (Severe Combined Immunodeficiency) (18). Permet et al. sostengono che l'amilina (Islet Amyloid Polipeptide) possa essere responsabile della fisiopatologia del diabete carcinoma pancreatico-associato. Infatti questi autori hanno riportato che i pazienti con neoplasia pancreatica presentano livelli sierici di amilina più elevati rispetto a pazienti con altre patologie gastrointestinali e che tali livelli si normalizzano dopo l'asportazione del tumore, parallelamente ad un miglioramento del diabete (22,23). Un recente studio sperimentale ha evidenziato che la cosecrezione di amilina ed insulina (espressa come rapporto molare) era alterata quando insule pancreatiche di ratto venivano incubate in terreni di coltura condizionati dalla crescita di linee cellulari pancreatiche umane. E' stato suggerito che tale sostanza, prodotta dalle β-cellule, sia coinvolta nell'insulino resistenza periferica e nel diabete riscontrati nei pazienti con neoplasia pancreatica oltre che nella diminuzione della funzionalità delle insule (23), anche se il meccanismo responsabile dell'aumento dei livelli di amilina, non è stato ancora chiarito. Recentemente alcuni autori hanno isolato un fattore solubile del peso molecolare di circa 1500 Da, prodotto dalla linea neoplastica pancreatica PANC-1, che induce la secrezione di amilina da parte delle β-cellule e che spiegherebbe gli aumentati livelli sierici di amilina, lo stato di alterata tolleranza glucidica e l'insulino resistenza periferica riscontrati nei pazienti con neoplasia del pancreas (22). Tuttavia è ancora poco chiaro quale possa essere la sostanza prodotta dal cancro pancreatico ad azione diabetogena.

Scopi del nostro studio sono stati:

1. Verificare se i terreni condizionati (TC) da una serie di linee cellulari di tumore pancreatico (MIA PaCa 2, PANC-1, CAPAN-1, PSN-1) possano alterare il metabolismo del glucosio degli epatociti di ratto.
2. Verificare se anche le frazioni di basso PM di tutti i TC dalle linee cellulari neoplastiche possano avere effetti sul metabolismo glucidico del fegato umano.
3. Analizzare mediante analisi MALDI-MS tutti i TC e confrontare i loro profili con quelli ottenuti dai sieri di pazienti con cancro pancreatico e pancreatite cronica (con o senza diabete mellito).

Materiali e metodi

COLTURE CELLULARI

Sono state utilizzate quattro linee cellulari di carcinoma pancreatico: MIA PaCa 2, PANC-1, PSN-1 derivate da un'adenocarcinoma pancreatico primario e CAPAN-1 derivata da una metastasi epatica di carcinoma pancreatico duttale. Il terreno di coltura è stato raccolto; dopo centrifugazione (1200 rpm per 10 minuti) il surnatante (terreno condizionato) è stato recuperato e conservato a 4°C per non più di una settimana prima di essere utilizzato per gli esperimenti in vitro.

ISOLAMENTO DEGLI EPATOCITI DI RATTO E MODELLO SPERIMENTALE

Sono stati utilizzati ratti Wistar maschi del peso medio di circa 200 gr. Gli epatociti sono stati isolati seguendo i metodi di Seglen (24) e Miotto (25) modificati come segue: dopo due successive perfusioni

con tampone senza Ca^{++}, il fegato veniva digerito con collagenasi, quindi rimosso e le cellule così ottenute venivano filtrate e suddivise in due aliquote. Una aliquota veniva risospesa in terreno di controllo (terreno non condizionato, TNC), l'altra veniva risospesa nel terreno condizionato (TC) dalle cellule MIA Paca2, PSN-1, PANC-1, o CAPAN-1. Dopo una preincubazione di 20 minuti nei rispettivi terreni a 37°C in bagno agitato in tensione di O_2/CO_2, le cellule venivano nuovamente filtrate e quindi risospese nei rispettivi terreni. Gli epatociti sono stati incubati per 120 minuti e da ciascun set sperimentale, sono stati eseguiti prelievi della sospensione cellulare a 0, 30, 60, 90, 120 minuti.

ULTRAFILTRAZIONE
100 mL di TC dalla linea MIA PaCa 2 e TNC, sono stati frazionati mediante due passaggi, il primo con un filtro DIAFLO di 30000 MW, il secondo utilizzando un filtro DIAFLO da 10000 MW sotto flusso delicato di azoto. Da ogni terreno abbiamo ottenuto tre frazioni : a) >30000 MW; b) 10-30000 MW; c) < 10000 MW. Gli effetti sul metabolismo glucidico degli epatociti di ratto sono stati testati sia sui terreni interi che sulle loro frazioni.

PAZIENTI
Abbiamo utilizzato il siero di 33 soggetti: 14 (6 maschi, 8 femmine, con range d'età compreso tra i 55 ed i 71 anni) erano affetti da carcinoma pancreatico (CP), 9 (8 maschi ed 1 femmina, con range d'età compreso tra i 41 ed i 64 anni) erano affetti da pancreatite cronica (PC), e 10 erano soggetti di controlli (SC) (5 maschi e 5 femmine, con range d'età compreso tra i 30 ed i 55 anni). Il diabete mellito è stato diagnosticato in base ai valori di glucosio nel siero a digiuno maggiori di 126 mg/dL, oppure sulla base del risultato del test di tolleranza al glucosio dopo carico orale (OGTT).
Un campione di siero a digiuno, ottenuto da tutti i soggetti, è stato conservato a –20°C prima di essere ultrafiltrato e quindi analizzato mediante analisi MALDI-MS.

MALDI-MS
Le misure sono state eseguite su un REFLEX fornito di una sorgente di ioni SCOUT, operante in modo lineare positivo. Gli ioni, formatisi da un raggio laser di UV (laser di azoto λ=337nm) sono stati accelerati a 25 kV. Come matrice è stata usata una soluzione di acido sinapinico (soluzione saturata in acetonitrile/acqua 50/50 v:v contenente 0.1% di acido trifluoroacetico). Prima dell'analisi MALDI i campioni delle linee cellulari sono stati dializzati per 2 ore usando un filtro da 0.45 mm. 5 mL della soluzione campione sono stati mescolati con la soluzione matrice. 1 mL della soluzione ottenuta è stata depositata su un contenitore di acciaio inox e lasciato ad essiccare prima di introdurlo nello spettrometro di massa. La calibrazione di massa esterna è stata eseguita usando ioni $[M+H]^+$ e $[M+2H]^{2+}$ di insulina bovina rispettivamente a m/z 5734 e 2867 (27). Tre misure sono state eseguite per ciascun campione per verificare l'accuratezza di massa, che era sempre nel range 0.1-0.5%. Questa tecnica analitica può produrre ioni molecolari intatti con PM maggiore 10^6 Da. La soluzione campione è generalmente mescolata con una soluzione matrice assorbente luce, portando ad un rapporto 1:10.000. Gli ioni possono essere protonati ($[M+H]^+$ o cationizzati ($[M+C]^+$) e sono registrati dalla loro massa al rapporto di carica (m/z). Nel caso di ioni monocarica i valori m/z sono strettamente relazionati al PM dell'analita.

Risultati

Le Figure 1 e 2 riportano le variazioni di concentrazione di glucosio e lattato misurati nel surnatante degli epatociti incubati con i terreni condizionati (TC) dalle linee cellulari neoplastiche pancreatiche MIA PaCa2, PANC-1, PSN-1 e CAPAN-1 in confronto al terreno non condizionato di controllo.
Le variazioni della concentrazione di glucosio risultavano sovrapponibili in tutte le condizioni sperimentali; viceversa la concentrazione di lattato dimi-

Figura 1. Variazioni di concentrazione di glucosio misurato nel surnatante degli epatociti incubati con il terreno non condizionato di controllo e con i terreni condizionati dalle quattro linee cellulari studiate.

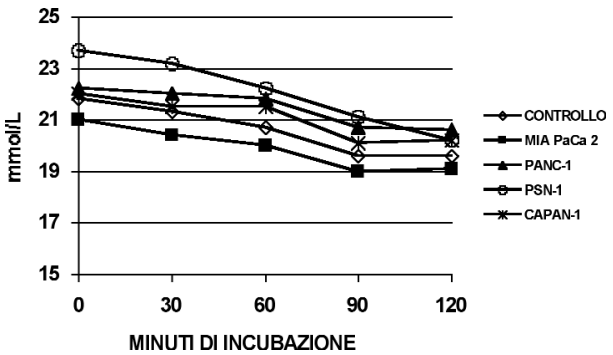
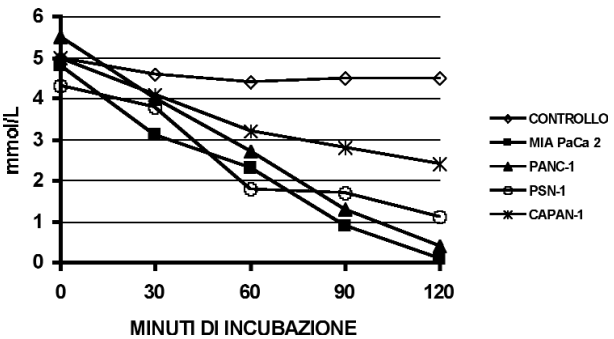


Figura 2. Variazioni di concentrazione di lattato misurato nel surnatante degli epatociti incubati con il terreno non condizionato di controllo e con i terreni condizionati dalle quattro linee cellulari studiate.



nuiva progressivamente durante il periodo di incubazione negli epatociti condizionati da tutti i TC, rimanendo invece costante negli epatociti di controllo (TNC).

La Figura 3 riporta il comportamento del lattato dopo incubazione degli epatociti di ratto con il terreno di controllo (TNC), con il terreno condizionato dalle MIA PaCa 2 e le tre frazioni di quest'ultimo di PM >30.000 Da, <30.000 Da e <10.000 Da. In tutte le condizioni sperimentali il glucosio veniva utilizzato con la stessa cinetica; la concentrazione di lattato rimaneva costante quando gli epatociti erano incubati con il terreno di controllo e con la frazione di terreno condizionato di peso molecolare superiore a 30.000 Da, mentre diminuiva significativamente quando gli epatociti erano incubati con il terreno condizionato intero o con le sue frazioni di peso molecolare inferiore a 30.000 e 10.000 Da.

Figura 3. Variazione di lattato nel surnatante degli epatociti dopo incubazione con il terreno non condizionato di controllo e con il terreno condizionato dalla linea MIA PaCa 2 non frazionato e le sue tre frazioni a diversi pesi molecolari.

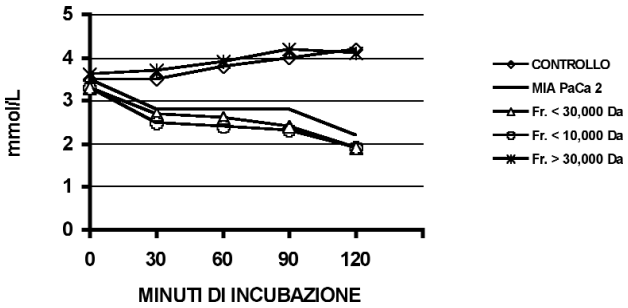


Figura 4. Spettrometria al MALDI-MS della frazione di basso peso molecolare (<10,000Da) del terreno non condizionato.

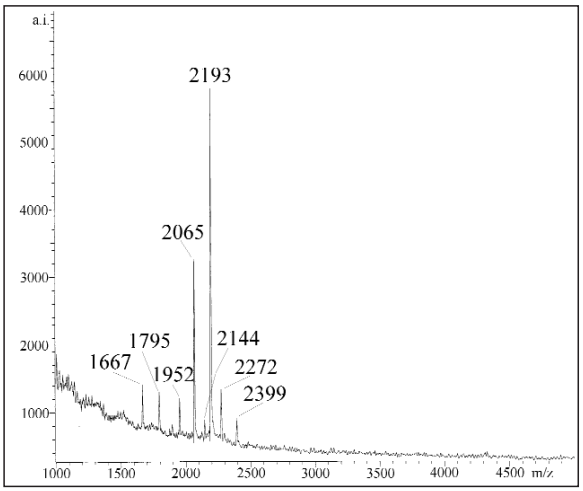
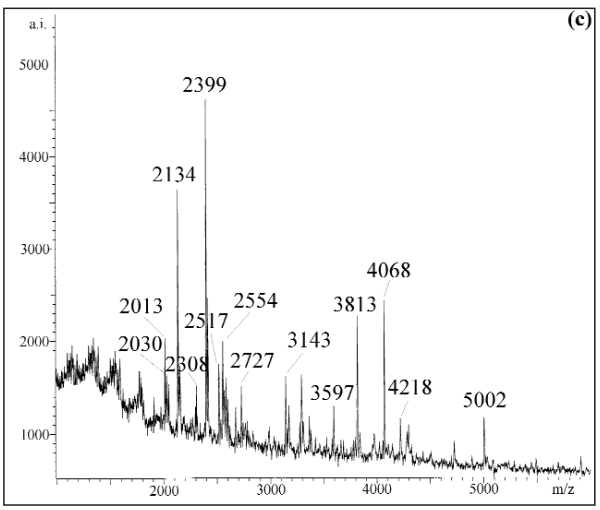


Figura 5. Spettrometria di massa MALDI-MS del siero di un paziente con adenocarcinoma pancreatico.



La Figura 4 riporta lo spettro MALDI-MS della frazione di basso peso molecolare (PM<10.000 Da) del terreno non condizionato. Si evidenzia la presenza di otto frazioni peptidiche principali di peso molecolare compreso fra 1667 e 2399 m/z.

Nei TC abbiamo individuato gli otto picchi (m/z 1667,1795, 1952, 2065, 2144, 2193, 2272 e 2399) già evidenziati nel TNC. Tuttavia nei TC erano evidenti picchi non rilevabili nel TNC. Solo due di questi picchi (m/z 1874 e 2030) erano comuni a tutti e quattro i TC, mentre altri (m/z 1727,1737 e 2727) erano presenti in alcuni ed assenti in altri TC.

La Tabella I riassume i risultati ottenuti medianti analisi MALDI-MS nei quattro TC e nel TNC. Ciascun dato viene espresso come percentuale rispetto al picco più alto rilevato nel corrispondente spettro, che era per tutti i campioni m/z 2193.

La Figura 5 riporta lo spettro MALDI-MS del siero di un paziente adenocarcinoma del pancreas.

Tabella I. Quantità relativa al picco massimo dei principali picchi rilevati mediante MALDI-MS. Sono riportati i risultati ottenuti dall'analisi del terreno non condizionato (TNC) e dei terreni condizionati dalle quattro linee cellulari studiate. Ciascun dato viene espresso come % rispetto al più alto picco identificato che in tutti gli spettri corrispondeva a m/z = 2193.

m/z	TNC	MIA PaCa 2	PANC-1	PSK	CAPAN-1
1667	13.30	46.40	80.00	35.50	40.80
1727		35.50			
1737				10.90	13.80
1795	11.80	19.10	21.80	20.90	20.00
1874		17.30	16.40	9.10	11.10
1952	9.60	14.50	20.90	18.20	15.40
2030		25.50	13.00	9.10	10.80
2065	49.60	58.20	65.50	62.70	58.50
2144	7.40	54.50	94.50	25.50	39.20
2193	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
2272	19.30	100.00	57.30	50.00	71.50
2399	5.90	13.60	9.10	9.10	7.70
2727				19.10	40.00

La Tabella II riassume i risultati dell'analisi MALDI-MS dei sieri dei pazienti. Vengono riportate le frequenze di risultati positivi relative ai diversi peptidi ottenute nei soggetti di controllo (SC, colonna 1), nei pazienti con adenocarcinoma pancreatico (CP, colonna 2) e in quelli con pancreatite (PC, colonna 3). I peptidi di m/z 2030 e 2399 erano rilevabili anche in tutti i TC dalle linee cellulari, mentre il peptide di m/z 2727 era rilevabile in due dei quattro terreni condizionati. Non abbiamo rilevato alcuna associazione significativa fra i peptidi considerati e la presenza di metastasi a distanza.
La maggior parte dei peptidi identificati non risultava associata alla presenza di diabete.
La Figura 6 riporta l'associazione tra il peptide 2030 e il diabete nei pazienti affetti da adenocarcinoma pancreatico. In particolare 5/6 pazienti affetti da adenocarcinoma pancreatico e positivi per il picco m/z 2030 erano diabetici; al contrario solo 1 paziente degli 8 senza diabete presentava il picco di m/z 2030. Uno dei 3 pazienti con pancreatite cronica, risultato positivo per il peptide a m/z 2030 era affetto da diabete mellito.

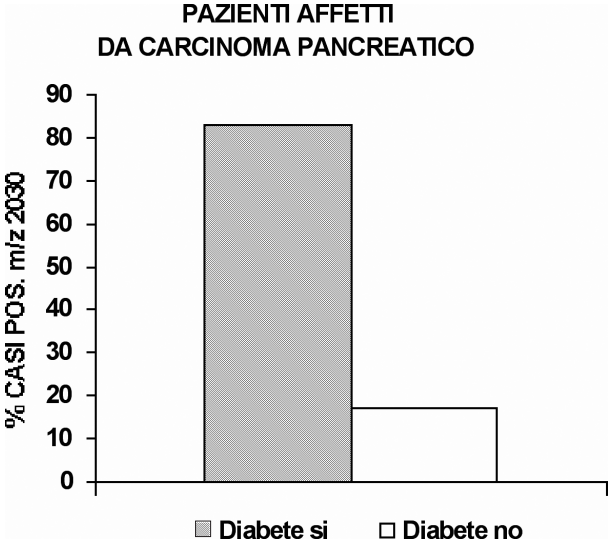
Tabella II. Principali peptidi a basso peso molecolare rilevati mediante MALDI-MS nei sieri dei soggetti di controllo (SC), dei pazienti con cancro pancreatico (CP) e dei pazienti con pancreatite cronica (PC). I valori tra parentesi sono espressi in %. I peptidi m/z= 2030, 2399 e 2727 erano presenti anche nei terreni condizionati dalle linee cellulari studiate.

m/z	SC (n=10)	CP (n=14)	PC (n=9)	Fisher's test
1240	7 (70%)	6 (43%)	3 (33%)	ns
1327	0	0	3 (33%)	ns
2013	6 (60%)	12 (86%)	7 (78%)	ns
2030	*1 (10%)*	*6 (43%)*	*3 (33%)*	*ns*
2134	0	4 (29%)	3 (33%)	ns
2298	0	0	3 (33%)	ns
2308	0	3 (21%)	0	ns
2399	*5 (50%)*	*12 (86%)*	*6 (66%)*	*ns*
2413	0	8 (57%)	1 (11%)	p<0.05
2517	0	4 (29%)	4 (44%)	ns
2586	0	6 (43%)	1 (11%)	ns
2727	*0*	*11 (79%)*	*3 (33%)*	*p<0.05*
3143	0	8 (57%)	5 (55%)	ns
3597	0	8 (57%)	1 (11%)	p<0.05
3813	0	10 (71%)	3 (33%)	ns
4068	0	6 (43%)	4 (44%)	ns
4218	0	10 (71%)	3 (33%)	ns
5002	4 (40%)	14 (100%)	8 (89%)	ns

Discussione

Nei pazienti affetti da adenocarcinoma pancreatico il diabete mellito è un riscontro estremamente frequente. Rimane ancora oggi dibattuto il ruolo del diabete

Figura 6. Percentuale di casi positivi per il peptide m/z= 2030 tra i pazienti con carcinoma del pancreas in presenza o assenza di diabete.



mellito come fattore predisponente lo sviluppo della neoplasia. Questa ipotesi, valida negli anni 70 (26,27), successivamente scartata negli anni 90 (1,3,15,28), viene rivalutata in recenti ampi studi epidemiologici (7,13,29,30,31). Tuttavia i numerosi studi clinici e sperimentali pubblicati nell'ultimo decennio non lasciano dubbi sul fatto che il carcinoma pancreatico possa essere causa di diabete mellito. Se questo è oggi chiaro, non sono altrettanto chiari i meccanismi biochimici e molecolari che conducono a questa alterazione metabolica, né si conoscono i mediatori neoplastici inducenti il diabete mellito. In questo studio abbiamo inizialmente verificato, in un modello sperimentale *in vitro*, il range di peso molecolare comprendente il/i fattore/i diabetogeni carcinoma pancreatico-associato/i. Il modello sperimentale da noi impiegato prevedeva l'utilizzo di epatociti isolati da fegato di ratto dopo adeguato periodo di digiuno. Queste cellule possono mantenere le loro caratteristiche vitali e continuare ad espletare le loro funzioni metaboliche se poste in un adeguato ambiente di coltura. In una prima serie di esperimenti gli epatociti sono stati incubati in terreno di controllo e contemporaneamente in terreni condizionati da quattro diverse linee cellulari neoplastiche pancreatiche. Tutti i terreni condizionati sono risultati capaci di modificare il metabolismo glucidico degli epatociti dopo carico di glucosio (20 mmol/L): mentre il consumo di glucosio avveniva secondo le stesse modalità cinetiche in tutte le condizioni sperimentali, si osservava una significativa riduzione della concentrazione del lattato presente nel mezzo di coltura negli epatociti incubati con i terreni condizionati rispetto a quelli di controllo. Per comprendere questo fenomeno è necessario riconsiderare le tappe del metabolismo glucidico epatico: nella prima fase una molecola di glucosio viene trasformata in due molecole di acido piruvico (glicolisi).

Quest'ultimo in condizioni di anaerobiosi viene trasformato in acido lattico, mentre in condizioni di aerobiosi entra nel ciclo degli acidi tricarbossilici. La diminuzione della concentrazione del lattato riscontrata negli epatociti condizionati rispetto al controllo, suggerisce che il terreno condizionato da cellule di tumore pancreatico favorisce l'entrata nella cellula del lattato, facilmente trasformabile in piruvato, come fonte energetica, in quanto probabilmente il glucosio non è utilizzabile a tal fine. In un lavoro precedente abbiamo infatti dimostrato, usando il glucosio uniformemente marcato, che solo una piccola frazione di quest'ultimo veniva trasformata in piruvato negli epatociti condizionati (32). Pertanto la diminuzione del lattato nel surnatante degli epatociti è stata considerata un indice di alterato metabolismo del glucosio. Al fine di individuare in che range di peso molecolare fosse ritrovabile l'attività interferente con il metabolismo glucidico carcinoma pancreatico associata, abbiamo sottoposto a ultrafiltrazione il terreno condizionato dalle MIA PaCa 2 ottenendo tre frazioni: una di peso molecolare superiore e una inferiore a 30.000 Da, e un'ultima di peso molecolare inferiore a 10.000 Da. L'azione metabolica del terreno condizionato intero, è stata riprodotta dalle frazioni di peso molecolare < 30.000 e < 10.000 Da. Questo risultato indica che la sostanza interferente con il metabolismo glucidico degli epatociti è una molecola di basso peso molecolare, inferiore a 10.000 Da.

Abbiamo cercato di definire la composizione molecolare delle frazioni di basso peso molecolare dei terreni condizionati al fine di individuare i potenziali fattori diabetogeni. Per questo abbiamo utilizzato gli ultrafiltrati con peso molecolare inferiore a 10.000 Da e sottoposto questi ultimi ad analisi di spettrometria di massa mediante MALDI-MS. Nel terreno non condizionato erano evidenziabili 8 frazioni di peso molecolare compreso fra 1667 e 2399. Questi sono da considerare dei costituenti presenti nel siero bovino fetale che viene aggiunto normalmente al terreno di coltura in percentuale pari al 10%: questo contiene i fattori di crescita necessari per la stimolazione della proliferazione cellulare. In accordo, tutti gli otto componenti del TNC venivano rilevati anche nei terreni condizionati, che contengono siero bovino fetale nella stessa percentuale del terreno di controllo. Tutti i componenti diversi rilevati in questi ultimi devono a rigore essere considerati prodotti di secrezione delle cellule neoplastiche, con potenziali azioni biologiche autocrine, paracrine ed endocrine. Due sole componenti erano presenti in tutti i terreni condizionati ed assenti nel TNC: la prima di m/z 1874 e la seconda di m/z 2030. Altre componenti (m/z1727, 1737, 2727) erano presenti in uno, due e due terreni condizionati su quattro rispettivamente. Tenendo conto che l'azione biologica veniva rilevata dopo incubazione degli epatociti con tutti i terreni condizionati, è ragionevole ipotizzare che il costituente diabetogeno debba essere rilevato analogamente in tutti i terreni condizionati. Pertanto solo due dei costituenti individuati potrebbero essere i potenziali fattori diabetogeni: m/z 1874 e 2030. Tenendo conto che i prodotti rilasciati dalle cellule neoplastiche per espletare il loro effetto diabetogeno devono agire su tessuti bersaglio situati a distanza rispetto al tumore di origine, quali il fegato, il tessuto muscolare o adiposo, è ragionevole ipotizzare che siano presenti e quindi rilevabili nel siero dei pazienti. Partendo da tale assunto abbiamo analizzato la composizione molecolare del siero mediante spettrometria di massa di una serie di soggetti affetti da adenocarcinoma pancreatico in confronto con pazienti affetti da pancreatite cronica e con soggetti di controllo. Il profilo della composizione del siero risultava più complesso rispetto a quanto rilevato nei terreni di coltura. Numerosi peptidi risultavano espressi solo in singoli soggetti, altri risultavano comuni a tutti i soggetti, altri ancora erano espressi in percentuale variabile nei soggetti di controllo rispetto a quelli con patologia pancreatica. Abbiamo identificato i peptidi più frequentemente espressi nella casistica da noi studiata, calcolando la percentuale di risultati positivi in rapporto alla diagnosi. Il riscontro di alcuni peptidi (m/z 2413, 3597) risultava significativamente più frequente nei soggetti affetti da carcinoma pancreatico rispetto ai controlli; un peptide (m/z 2727) risultava più frequentemente espresso nei soggetti affetti da patologia pancreatica cronica (carcinoma o pancreatite) rispetto ai controlli sani. Solo quest'ultimo frammento veniva espresso anche da 2/4 terreni condizionati. E' pertanto ragionevole ipotizzare che nessuno di questi possa essere considerato potenzialmente coinvolto nell'alterare il metabolismo glucidico. L'unico peptide espresso da tutti i terreni condizionati e rilevabile nel siero soprattutto dei pazienti affetti da patologia pancreatica cronica era quello di m/z 2030.

Tutti i peptidi individuati nel siero dei pazienti sono stati quindi analizzati in relazione alla presenza o assenza di metastasi a distanza ed alla presenza o assenza di diabete mellito. Nessuno dei peptidi studiati è risultato correlato alla presenza di metastasi: pertanto, seppure alcuni peptidi risultino tumore associati, non sembrano avere un ruolo significativo nella progressione dell'adenocarcinoma pancreatico. Un solo peptide risultava significativamente correlato alla presenza di diabete mellito: m/z 2030. Tenendo conto quanto precedentemente descritto a proposito di tale peptide, appare ragionevole ipotizzare che questa frazione sia effettivamente coinvolta nell'eziopatogenesi del diabete carcinoma pancreatico associato. Questo risultato è in parte in accordo con precedenti risultati della letteratura: altri autori hanno infatti isolato da terreno condizionato da cellule neoplastiche pancreatiche, mediante tecnica HPLC, un piccolo peptide del peso molecolare di circa 1500 Da in grado di alterare il metabolismo glucidico (22,33). Tenendo conto delle diverse metodiche utilizzate per classificare il peso molecolare (HPLC piuttosto che MALDI-MS) il peptide da noi identificato di m/z 2030 ed il peptide descritto da Ding et al. (22) potrebbero rappresentare la medesima sostanza.

Viceversa il peptide descritto come diabetogeno da Li e Adrian (34) del peso molecolare di 5002, potrebbe coincidere con il peptide identificato da noi nel siero di tutti i soggetti di m/z 5002. Questo peptide, presente nel 100% dei pazienti affetti da adenocarcinoma pancreatico e nell'89% di quelli con pancreatite cronica, ma presente anche nel 40% dei soggetti di controllo, è poco probabile che possa essere implicato nell'eziologia del diabete carcinoma pancreatico associato, a meno che la sua azione diabetogena non sia dose dipendente. La sua quantificazione, non effettuabile mediante MALDI-MS, potrebbe chiarire questa ipotesi.

Dai risultati finora discussi, appare evidente che il tumore del pancreas produce fattori solubili di basso peso molecolare e che almeno uno di questi, di m/z pari a 2030, potrebbe essere implicato nell'eziopatogenesi del diabete tumore-associato. Tuttavia rimangono ancora numerosi punti di domanda su tale argomento: 1. stabilire l'esatta natura molecolare di tale fattore, 2. definire con precisione quante e quali sono le tappe metaboliche alterate per azione di tale fattore, 3. definire i mediatori intracellulari della sua azione metabolica.

Bibliografia

1. Gardis L, Gold BL. Epidemiology and etiology of pancreatic cancer. In: The pancreas: biology, pathobiology and disease. Go VL et al. Eds. Raven Press Ltd, New York, 387-855, 1993.
2. Greenlee RT, Murray T, Bolden S, et al. Cancer statistics, 2000. Cancer J Clin 2000; 50: 7-33.
3. Haddock G, Carter DC. Aetiology of pancreatic cancer. Br J Surg 1990; 77: 1159-66.
4. Warshaw AL, Fernandez-Del Castillo C. Pancreatic carcinoma. N Engl J Med 1992; 326: 455-65.
5. Pedrazzoli S, Pasquali C, Sperti C. Il problema "carcinoma pancreatico" in 3 UU.LL.SS.SS. del Veneto. 1990-1992. Ristampa a cura dell'Associazione Culturale PatavinaWirsung (ACPW): 20/04/99.
6. Simonato L, Guzzinato S, Stocco F, et al. Studio della sopravvivenza per la malattia neoplastica nella Regione Veneto 1987-1994. Registro tumori del Veneto.
7. Ye W, Lagergren J, Weidwrpass E, et al. Alcohol abuse and the risk of pancreatic cancer. Gut 2002; 51: 236-9.
8. Tisdale M.J. Cachexia in cancer patients. Nature Rev Cancer 2002; 2: 862-71.
9. Tisdale M.J. Cancer anorexia and cachexia. Nutrition 2001; 17: 438-42.
10. Tisdale M.J. Metabolic abnormalities in cachexia and anorexia. Nutrition 2000; 16: 1013-4.
11. Babette S, and Hartmut P. Epidemiological Trends in Pancreatic neoplasias. Dig Dis 2001; 19: 6-14.
12. Czyzyk A, and Szczepanik Z. Diabetes mellitus and cancer. Eur J Int Med 2000; 11:245-52.
13. Ogawa Y, Tanaka M, Inoue K, et al. A prospective pancreatographic study of the prevalence of pancreatic carcinoma in patients with diabetes mellitus. Cancer 2002; 94: 2344-9.
14. Fogar P, Basso D, Panozzo MP, et al. C-peptide pattern in patients with pancretic cancer. Anticancer Res 1993; 13: 2577-80.
15. Gullo L, Pezzilli R, Morselli-Labate AM. Italian Pancreatic cancer Study Group. Diabetes and the risk of pancreatic cancer. N Engl J Med 1994; 331: 81-4.
16. Fogar P, Pasquali C, Basso D, et al. Diabetes mellitus in pancreatic cancer follw-up. Anticancer Res 1994; 14: 2827-30.
17. Permert J, Adrian TE, Jacobson P, et al. Is profound peripheral insulin resistance in patients with pancreatic cancer caused by a tumor associated-factor? Am J Surg 1993; 165: 61-7.
18. Basso D, Brigato L, Veronesi A, et al. The pancreatic cancer cell line MIA PaCa 2 produces one or more factors able to induce hyperglycemia in SCID mice. Anticancer Res 1995; 15: 1-4.
19. Liu J, Knezetic A, Strümmer L, et al. The intracellular mechanism of insulin resistance in pancreatic cancer patients. J Clin End Metab 2000; 85:1232-8.
20. Permert J, Ihse I, Jorfeldt L, et al. Improved glucose metabolism after subtotal pancreatectomy for pancreatic cancer. Br J Surg 1993; 80:1047-50.
21. Permert J, Ihse I, Jorfeldt L, et al. Pancreatic cancer is associated with impaired glucose metabolism. Eur J Surg 1993 ; 159: 101-7.
22. Ding X, Flatt PR, Permert J, et al. Pancreatic cancer cells selectively stimulate islet b cells to secrete amylin. Gastroenterology 1998; 114: 130-8.
23. Wang F, Larsson J, Abdiu A, et al. Dissociated secretion of islet amyloid polypeptide and insulin in serum-free culture media conditioned by human pancreatic adenocarcinoma cell lines. Int. J. Pancreatol 1997; 21: 157-64.
24. Seglen PO. Preparation of isolated liver cell. Meth Cell Biol 1976; 13: 29-83.
25. Miotto G, Venerando R, Siliprandi N. Inibitiry action of isovaleryl-L-carnitine on proteolysis in perfused rat liver. Biochem Biophys Res Commun 1989; 158: 797-802.
26. Karmody AJ, and Kyle J. The association between carcinoma of the pancreas and diabetes mellitus. Br J Surg 1969; 56: 362-4.
27. Kessler II. Cancer mortality among diabetics. J Natl Cancer Inst 1970; 44: 673-86.
28. Go V.L.W, Di Magno E.P, Gardner J.D. et al. Endocrine tumors of the pancreas. In: The pancreas: biology, pathobiology and desease. Raven press. 899-909, 1993.
29. Fisher WE. Diabetes: risk factor for the Development of Pancreatic Cancer or manifestation of the Disease? Word J. Surg 2001; 25:503-8.
30. Gullo L. Diabetes and the risk of pancreatic cancer. Ann Oncol 1999; 4: S79-S81.
31. Lin Y., Tamakoshi A, Kawamura T, et al. Risk of pancreatic cancer in relation to alcohol drinking, coffe consumption and medical history : findings from the Japan collaborative cohort study for evaluation of cancer risk. Int J Cancer 2002; 99: 742-6.
32. Basso D, Valerio A, Seraglia R, et al. Putative pancreatic cancer-associated diabetogenic factor: 2030 mw peptide. Pancreas 2002; 1:8-14.
33. Peschke E, Ebelt H, Bromme HJ. Classical and new diabetogens comparison of their effects on isolated rat pancreatic islets in vitro. Cell Mol Life Sci 2000; 57:158-64.
34. Li J, and Adrian TE. A factor from pancreatic and colonic cancer cells stimulates glucose uptake and lactate production in myoblasts. Biochem Biophys Res Commun 1999; 260: 626-33.