

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI CATANIA

Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale

RELAZIONE SEMESTRALE PROGETTO PER FINANZIAMENTO BORSE DI STUDIO 2014 – FONDAZIONE DIABETE RICERCA

Antonino Di Pino

Titolo: L'HbA_{1c} potrebbe identificare soggetti con prediabete ed elevato rischio cardiovascolare che non sarebbero identificati con la glicemia a digiuno o la curva da carico orale di glucosio.

È noto da numerosi studi che il processo che porta all'aterosclerosi ha inizio molto tempo prima della diagnosi di diabete ed è già presente negli stadi definiti di "prediabete" definiti come alterata glicemia a digiuno (IFG), alterata tolleranza al glucosio (IGT) ed emoglobina glicosilata (HbA_{1c}) compresa tra 5.7 e 6.4% secondo le linee guida dell'American Diabetes Association (ADA). Da queste considerazioni sembra evidente la necessità di identificare i processi fisiopatologici coinvolti e di trovare markers precoci di patologia vascolare al fine di attuare strategie di prevenzione del rischio cardiovascolare prima della diagnosi di diabete.

Sempre più dati confermano un'associazione significativa tra eventi cardiovascolari e aumentati livelli di HbA_{1c} oltre che nei soggetti con diabete di tipo 2 anche in soggetti non diabetici, ed in un recente studio il nostro gruppo ha evidenziato un'alterazione precoce dei markers di danno vascolare in soggetti con normale glicemia a digiuno (NGT) e dopo carico orale di glucosio (NT), ma con livelli di HbA_{1c} nel range del prediabete (5.7-6.4%) secondo le linee guida ADA.

L'esposizione prolungata all'iperglicemia rappresenta probabilmente il fattore principale associato all'insorgenza delle malattie vascolari specifiche del diabete, sebbene l'associazione tra alterato metabolismo del glucosio e patologia arteriosa è resa più complessa dalla presenza contemporanea di altri fattori di rischio, come l'ipertensione, le dislipidemie, l'abitudine tabagica e fattori genetici predisponenti al danno tissutale. Per spiegare l'associazione tra iperglicemia e complicanze vascolari, il più importante meccanismo proposto è la formazione e l'accumulo di prodotti di glicosilazione (o glicazione) non enzimatica di proteine e lipidi, attraverso cui si formano addotti intermedi e avanzati, questi ultimi chiamati collettivamente Advanced Glycation End-products (AGEs). I meccanismi coinvolti nello sviluppo del danno cardiovascolare in questi soggetti non sono noti. L'HbA_{1c} potrebbe essere l'espressione di un'aumentata glicosilazione e quindi di un

aumentato pool di AGEs. Gli AGEs, esercitano i loro effetti proinfiammatori attraverso dei recettori presenti su vari tipi di cellule chiamati receptors for AGEs (RAGE). Questi recettori esistono sia in forma tissutale, legati alla membrana plasmatica, che in forma solubile (sRAGE); proprio la forma solubile del recettore circolante nel plasma agirebbe come recettore esca per gli AGEs circolanti impedendo, di fatto, il legame degli AGEs con il RAGE tissutale. Diversi studi hanno riportato l'associazione inversa tra rischio cardiovascolare e bassi livelli di sRAGE, ed in particolare di endogenous secretory RAGE (esRAGE) una variante di sRAGE derivante da splicing alternativo del gene RAGE. Ad oggi pochi dati supportano l'associazione tra bassi livelli di sRAGE, esRAGE, HbA_{1c} e rischio cardiovascolare in soggetti con prediabete.

OBIETTIVO

Valutare in soggetti con IFG e/o IGT ed, in particolare, con prediabete diagnosticato solo mediante HbA_{1c} (NGT/NT con HbA_{1c} 5.7-6.4%) i livelli di sRAGE e la loro associazione con l'alterazione dei markers precoci di danno cardiovascolare già osservata in questi soggetti. Per caratterizzare ulteriormente il sistema AGE-RAGE saranno misurati i livelli plasmatici di esRAGE (forma derivante da uno splicing alterantivo di sRAGE che funge come recettore "esca" per i ligandi di RAGE con possibili funzioni protettive), S100A12 (fattore proinfiammatorio di produzione leucocitaria e ligando di RAGE) e carbossi-metil-lisina (CML, il più importante AGE plasmatico).

MATERIALI E METODI

350 soggetti senza precedente diagnosi di diabete sono stati reclutati consecutivamente tra i pazienti afferenti alla nostra clinica per lo screening di diabete e rischio cardiovascolare. I criteri di inclusione sono:

- età compresa tra i 30 e i 65 anni

Criteri di esclusione:

- precedente storia di diabete
- precedente storia di patologia cardiovascolare (ictus cerebri, cardiopatia ischemica, scompenso cardiaco, arteriopatia periferica)
- uso di farmaci che influenzano la tolleranza glicemica
- evidenza clinica di patologia renale o epatica

- patologie reumatiche
- recente storia di patologie acute.

Un prelievo di sangue dopo 12 ore di digiuno sarà prelevato per la misurazione di glicemia e HbA_{1c}.

Tutti i soggetti sono stati sottoposti a OGTT con carico di glucosio da 75 grammi, con prelievi al minuto 0', 30', 60', 90' e 120' dopo il carico, per il dosaggio di glucosio ed insulina plasmatica. In accordo con le linee guida dell'American Diabetes Association, i soggetti sono stati suddivisi nelle seguenti categorie di tolleranza glicemica in base ai loro livelli di glicemia a digiuno e dopo carico di glucosio (minuto 120):

- normale glicemia a digiuno (NFG), comprendente soggetti con glicemia a digiuno <100 mg/dL;
- normale tolleranza al glucosio (NT), comprendente soggetti con glicemia dopo OGTT <140 mg/dL;
- alterata glicemia a digiuno (IFG), comprendente soggetti con glicemia a digiuno compresa tra 100 e 125 mg/dL;
- alterata tolleranza al glucosio (IGT), comprendente soggetti con glicemia dopo OGTT compresa tra 140 e 199 mg/dL;
- diabete di tipo 2, la cui diagnosi viene effettuata per riscontro di almeno due valori di glicemia a digiuno >125 mg/dl, o di livelli plasmatici di glucosio dopo OGTT $\geq$ 200 mg/dL.

Analisi biochimica: l'HbA_{1c} è stata misurata mediante metodica elettiva high-performance liquid chromatography (HPLC) con analizzatore certificato National Glycohaemoglobin Standardisation Program (NGSP) [14]. Il coefficiente di variazione intra analisi (CV) è del 1.3%, inter analisi del 1.8%. L'sRAGE totale, esRAGE, S100A12 e CML saranno dosati con metodica ELISA. I dosaggi saranno effettuati seguendo i protocolli delle case produttrici.

Analisi Statistica: la numerosità del campione è stata calcolata sulla base della variabile sRAGE usando un livello di significatività (α) al 5% ed una potenza ($1-\beta$) dell'80%. L'analisi statistica dei

parametri clinici e laboratoristici è stata eseguita utilizzando il software Stat View 6.0 per Windows e la distribuzione di ogni variabile è stata verificata con test di Kolmogorox-Smirnov. I dati sono stati espressi come media $\pm$ (SD) per le variabili distribuite normalmente e come mediana (IQR) per le variabili con distribuzione non normale. I test statistici utilizzati includono il test t di Student e l'ANOVA per le variabili continue, il test χ^2 per le variabili non continue. Un valore di $P < 0.05$ è stato considerato statisticamente significativo. Per le variabili con distribuzione non normale l'analisi statistica è stata eseguita dopo trasformazione logaritmica delle stesse.

RISULTATI

Lo studio è stato condotto su un totale di 350 pazienti reclutati. L'intera popolazione è stata suddivisa in quattro gruppi in base ai relativi dati di glicemia a digiuno, tolleranza glicemica post-OGTT ed HbA_{1c}: 99 soggetti di controllo (NFG e NT con HbA_{1c} <5.7%), 127 pazienti con prediabete diagnosticato solo mediante l'HbA_{1c} (NFG e NT con HbA_{1c} 5.7-6.4%), 63 pazienti con IFG e/o IGT e 61 pazienti con diabete di tipo 2 di neodiagnosi (HbA_{1c} ≥6.5%).

Le caratteristiche cliniche e laboratoristiche dei pazienti in studio sono presentate nella **tabella 1**. I soggetti con prediabete diagnosticato solo mediante HbA_{1c} avevano un'età maggiore rispetto ai soggetti di controllo, ma erano simili a questi per BMI, circonferenza vita, pressione sistolica e diastolica, livelli plasmatici di colesterolo totale, colesterolo HDL, trigliceridi e HOMA-IR; questi soggetti, inoltre, presentavano caratteristiche cliniche e laboratoristiche simili a quelle dei pazienti del gruppo con IFG e/o IGT eccetto che per una più bassa glicemia a digiuno e un più basso HOMA-IR. Non c'erano differenze significative nelle caratteristiche antropometriche e cliniche dei soggetti con prediabete diagnosticato solo mediante HbA_{1c} anche quando questi venivano confrontati con i soggetti con diabete di tipo 2 di neodiagnosi, eccetto che per una più bassa pressione sistolica, una più bassa glicemia a digiuno ed un colesterolo HDL più elevato.

Livelli plasmatici di sRAGE, esRAGE, S100A12 e CML in soggetti con prediabete

Le concentrazioni plasmatiche di esRAGE erano significativamente più basse nei soggetti con prediabete (HbA_{1c} 5.7-6.4% NFG/NT e IFG e/o IGT) rispetto a quelle dei controlli (0.29 ± 0.18 ng/mL e 0.27 ± 0.14 ng/mL rispettivamente, vs 0.45 ± 0.26 ng/mL, $P < 0.05$), ma simili a quelle dei soggetti con diabete di tipo 2. Come mostrato nella **tabella 2**, non sono state trovate differenze significative tra i livelli plasmatici di sRAGE nei quattro gruppi. Le concentrazioni plasmatiche di S100A12 erano significativamente più alte nei soggetti con prediabete (HbA_{1c} 5.7-6.4% NFG/NT e

IFG e/o IGT) rispetto a quelle dei soggetti di controllo. Al contrario, non sono state trovate differenze significative tra i livelli plasmatici CML nei quattro gruppi.

Tabella 1 – Caratteristiche cliniche e laboratoristiche della popolazione in studio suddivisa in base a: di glicemia a digiuno, status di tolleranza al glucosio e valore di HbA_{1c}.

	Controlli (n=99)	HbA_{1c} 5.7-6.4% NFG/NT (n=127)	IFG/IGT (n= 63)	Type 2 Diabetes (n=61)
Età (anni)	43±11.2	47.9±10*	50.5±7.8*	50.9±8*
BMI (Kg/m²)	28.8±4.5	29.9±4.9	29.4±3.9	30±4.9
Circonferenza Vita (cm)	99.8±11.7	100±11.2	98.3±9.6	103.1±13
Glicemia a digiuno (mg/dL)	86.4±8.6	90.5±8.6*	99.4±14*#	120.2±19*#§
Colesterolo totale (mg/dL)	188.9±36.6	195.6±39.3	199.5±39.3	189.3±41.5
Colesterolo HDL (mg/dL)	47.8±12.4	46±12.3	44±11.5	39.1±8.3*#
Trigliceridi (mg/dL)	86(66-122)	100(76-137)	125.5(85-173)	117(83-146)
Colesterolo LDL (mg/dL)	120.2±32.8	129.4±36.1*	126.2±36.5	126.2±36
Pressione Sistolica (mmHg)	117±15.4	120±14.4	123.9±14.2*	126.7±15.4*#
Pressione Diastolica (mmHg)	71.8±10.2	74.3±10.2	75±10.6	76.2±12.8*
HOMA-IR	1.5(1-2)	1.4(1-2.1)	2.0(1.6-3.3)*#	2.6(1.9-0.72)*#§
Ipertensione (%)	16%	26%	31%	26%
Fumatori attivi (%)	30%	26%	44%	52%*#
Sesso (M/F)	37/62	61/66	36/27	27/34

I dati sono presentati come media±SD o mediana (IQR): NT/NFG, normotolleranti e con normale glicemia a digiuno; IFG/IGT, alterata glicemia a digiuno e alterata tolleranza al glucosio; HbA_{1c}, emoglobina glicosilata; HOMA-IR, homeostasis model assessment-insulin resistance.

I fumatori sono stati classificati come attivi in base al numero di sigarette fumate ed agli anni di abitudine tabagica.

L'ipertensione è stata definita come una pressione arteriosa sistolica ≥135 mmHg o una pressione arteriosa diastolica ≥85 mmHg o in trattamento con farmaci ipotensivanti.

*P<0.05 vs Controlli; #P<0.05 vs >5.7%NT/NFG; § P<0.05 vs IFG/IGT.

Tabella 2 - Livelli plasmatici di sRAGE, esRAGE, S100A12 e CML della popolazione in studio suddivisa in base a: glicemia a digiuno, status di tolleranza al glucosio e valore di HbA_{1c}.

	Controlli (n=99)	HbA_{1c} 5.7-6.4% NFG/NT (n=127)	IFG/IGT (n=63)	Type 2 Diabetes (n=61)
sRAGE (ng/mL)	1.464±596.1	1.308±620.1	1.356±451.3	1.437±532.3
esRAGE (ng/mL)	0.45±0.26	0.29±0.18*	0.27±0.14*	0.3±0.19*
S100A12 (ng/mL)	5.35±3.38	7.13±5.4*	7.56±4.5*	8.41±4.44*
CML (µg/mL)	2.64±1.18	2.45±1.26	2.58±1.3	2.46±1.44

I dati sono presentati come media±SD o mediana (IQR): NT/NFG, normotolleranti e con normale glicemia a digiuno; IFG/IGT, alterata glicemia a digiuno e alterata tolleranza al glucosio; HbA_{1c}, emoglobina glicosilata;

* $P<0.05$ vs Controlli; # $P<0.05$ vs >5.7%NFG/NT; § $P<0.05$ vs IFG/IGT.