

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI CATANIA ANNO ACCADEMICO 2015-2016

PROGETTO PER FINANZIAMENTO BORSE DI STUDIO 2015

FONDAZIONE DIABETE RICERCA

**RELAZIONE SCIENTIFICA ED ECONOMICA, E PROPOSTA ESTENSIONE
DEL PROGETTO DI RICERCA AVVIATO CON BORSA DI STUDIO
FONDAZIONE DIABETE RICERCA 2014**

Antonino Di Pino

INDICE

Relazione scientifica ed economica del progetto di ricerca oggetto della borsa già assegnata

Relazione scientifica.....pag 2

Relazione economica.....pag 11

**Proposta estensione progetto di ricerca avviato con borsa di studio fondazione diabete ricerca
2014**

Background e razionale dell'estensione del progetto.....pag

Materiali e Metodi.....pag

Obiettivi/importanza dei risultati attesi.....pag

RELAZIONE SCIENTIFICA ED ECONOMICA DEL PROGETTO DI RICERCA OGGETTO DELLA BORSA GIA' ASSEGNATA

RELAZIONE SCIENTIFICA

Per spiegare l'associazione tra iperglicemia e complicanze vascolari nei disturbi dell'omeostasi glicemica (dal prediabete al diabete mellito di tipo 2), 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). Gli AGEs esercitano i loro effetti proinfiammatori attraverso dei recettori presenti su vari tipi di cellule, incluse le cellule endoteliali, chiamati Receptors for AGEs (RAGE). Il legame AGE/RAGE induce l'espressione di fattori di trascrizione come l'NF-kb e favorendo la trascrizione di geni pro-infiammatori e di molecole di adesione endoteliale. Questi recettori hanno la particolare caratteristica di esistere sia in forma tissutale, legati alla membrana plasmatica, che in forma solubile (soluble RAGE, sRAGE); proprio la forma solubile del recettore, presente nel plasma, agirebbe come recettore "esca" per gli AGEs circolanti impedendo, di fatto, il legame degli AGEs con il RAGE tissutale ed esercitando quindi un effetto anti-infiammatorio. 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 prediabete, i livelli di sRAGE e la loro associazione con l'alterazione dei markers precoci di danno cardiovascolare (Intima-media Thickness [IMT] e Pulse Wave Velocity [PWV]). In questo studio abbiamo focalizzato la nostra attenzione in particolare su soggetti con prediabete diagnosticato solo mediante HbA_{1c}: vale a dire soggetti con normale glicemia a digiuno (NFG), normale tolleranza glicemica (NT) dopo carico orale di glucosio (OGTT) e HbA_{1c} nel range del prediabete (5.7-6.4%). Per caratterizzare ulteriormente il sistema AGE-RAGE ed il profilo infiammatorio dei pazienti in studio sono stati misurati i livelli plasmatici di esRAGE (forma derivante da uno splicing alterativo 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), proteina C-reattiva ad alta sensibilità (hs-CRP) e carbossi-metil-lisina (CML, il più importante AGE plasmatico).

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, WC, 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

Come mostrato in **tabella 2** 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. Le concentrazioni plasmatiche di S100A12 e hs-CRP 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 di sRAGE e CML nei quattro gruppi.

All'analisi di regressione semplice esRAGE era inversamente correlato con età ($r = -0.19$, $P < 0.05$), BMI ($r = -0.15$, $P < 0.04$), HbA_{1c} ($r = -0.18$, $P < 0.01$), hs-CRP ($r = -0.17$, $P < 0.05$) e S100A12 ($r = -0.28$, $P < 0.01$). A questo punto abbiamo eseguito un'analisi di regressione multipla per stimare quali siano le variabili indipendentemente correlate con i bassi livelli plasmatici di esRAGE in questa popolazione. Le variabili risultate indipendentemente correlate con esRAGE erano HbA_{1c} ($P < 0.05$), hs-PCR ($P < 0.05$) ed età ($P < 0.001$) (**tabella 3**).

esRAGE risultava essere anche uno dei determinanti indipendenti dell'IMT insieme a età ($P < 0.05$) ed HbA_{1c} ($P < 0.05$). Le variabili maggiormente correlate con la PWV risultavano essere invece la pressione sistolica ($P < 0.05$) ed i livelli plasmatici di S100A12 ($P < 0.05$) (**tabella 3**).

Espressione genica di sRAGE ed esRAGE in cellule mononucleate isolate da soggetti con prediabete

esRAGE è prodotto dallo splicing alternativo del gene RAGE ed è formato dall'inclusione di parte dell'introne 9 e dalla rimozione delle esone 10, cosa che cambia la sequenza di lettura della proteina portando alla perdita sia del dominio di membrana che della frazione citosolica. Di conseguenza, esRAGE esiste solo in forma solubile. Tuttavia, i fattori che regolano lo splicing alternativo del gene RAGE non sono, ad oggi, del tutto chiariti e potrebbero essere sia genetici che ambientali. In questo studio, attraverso analisi RT-PCR condotta su RNA isolato da cellule mononucleate isolate da sangue periferico di soggetti di controllo e pazienti con prediabete e diabete di tipo 2 (10 per gruppo), abbiamo determinato se i bassi livelli plasmatici di esRAGE nella nostra popolazione fossero dovuti a una diminuzione dell'espressione genica. Come illustrato nella **figura 1**, l'espressione genica dell'mRNA di esRAGE diminuisce progressivamente dai soggetti di controllo ai soggetti con prediabete e con diabete di tipo 2.

Significato dei risultati ottenuti

I soggetti con prediabete sono caratterizzati da un avanzato danno vascolare e crescenti evidenze suggeriscono che l'asse AGE/RAGE giochi un ruolo importante nel determinare il rischio cardiovascolare di soggetti con disturbi dell'omeostasi glicemica.

I nostri dati hanno dimostrato per la prima volta che soggetti con prediabete hanno bassi livelli plasmatici di esRAGE che sono inversamente correlati con markers di infiammazione e di rischio di patologia aterosclerotica. Questi risultati rimarcano il ruolo di esRAGE come marker d'infiammazione subclinica strettamente legato all'attivazione ed alla progressione dell'aterosclerosi anche nella popolazione con prediabete.

Abbiamo, inoltre, focalizzato la nostra attenzione su soggetti con prediabete diagnosticato solo mediante HbA_{1c} (5.7-6.4%) e normale glicemia a digiuno e dopo il carico di glucosio (OGTT). I nostri dati dimostrano che la HbA_{1c} può identificare soggetti con alterazioni del profilo infiammatorio ed aumentato rischio cardiovascolare che non sarebbero identificati dalla glicemia a digiuno e dall'OGTT.

Tutti questi dati evidenziano un profilo infiammatorio e cardiovascolare sfavorevole nei soggetti con prediabete e rimarcano la validità dell'HbA_{1c} come predittore di patologia cardiovascolare.

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, hs-CRP e CML e indicatori di danno cardiovascolare subclinico 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*
hs-CRP (mg/dL)	0.14(0.08-0.27)	0.21(0.1-0.43)*	0.19(0.09-0.42)	0.32(0.18-0.72) *#§
CML (µg/mL)	2.64±1.18	2.45±1.26	2.58±1.3	2.46±1.44
IMT (mm)	0.67(0.6-0.73)	0.74(0.65-0.78)*	0.76(0.68-0.86)*#	0.79(0.7-0.92) *
PWV (m/sec)	7.1±1.7	7.6±1.6*	8.2±1.5*#	8.6±1.7*#

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.

Tabella 3 – Analisi di regressione multipla considerando esRAGE, PWV ed IMT come variabili dipendenti

	<i>Coefficient β</i>	<i>P value</i>
esRAGE		
Età	-0.005	<0.001
HbA _{1c} (%)	-0.08	<0.05
hs-CRP (mg/dL)	-0.25	<0.05
IMT		
Età	0.003	<0.001
HbA _{1c} (%)	0.04	<0.05
esRAGE (ng/mL)	-0.06	<0.05
PWV		
Pressione sistolica (mmHg)	0.02	<0.05
S100A12 (ng/mL)	1.1	<0.05

Il modello di regressione è aggiustato per età, sesso, fumo, BMI, circonferenza vita, pressione sistolica e diastolica, colesterolo totale, colesterolo HDL, trigliceridi, HbA_{1c}, glicemia a digiuno HOMA-IR, sRAGE, esRAGE, S100A12, hs-CRP e CML.

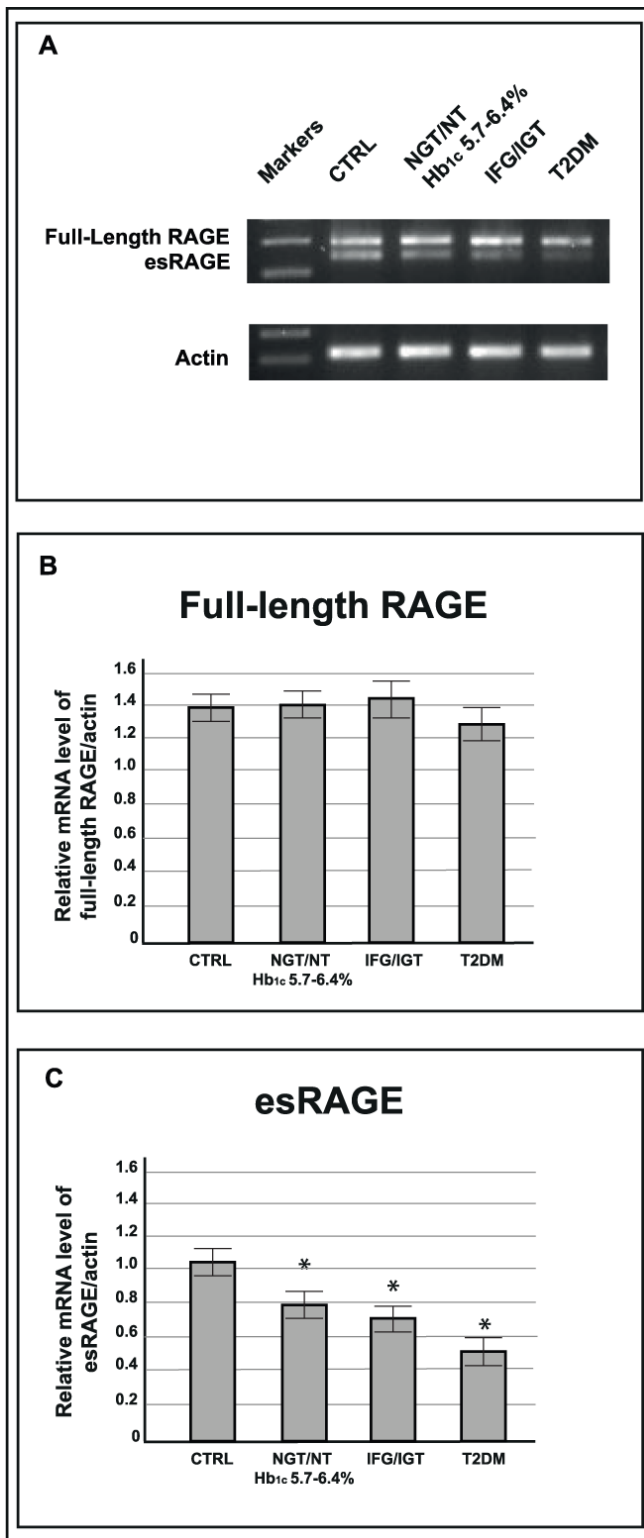


Figura 1 - Differente espressione genica di full-length RAGE ed esRAGE mediante RT-PCR in cellule mononucleate isoate da sangue periferico.

Pannello A: esperimento rappresentativo di analisi RT-PCR di full length RAGE (282 bp) ed esRAGE (216 bp), splicing alternativo del primo gene, in soggetti con HbA_{1c} 5.7-6.4% e normale glicemia a digiuno e dopo carico di glucosio, IFG/IGT e neodiagnosi di diabete di tipo 2.

Pannelli B e C: analisi statistica (media±SD da 10 differenti esperimenti) del dell'analisi densitometrica full-length RAGE/Beta-actina e esRAGE/Beta-actina * $P < 0.05$.

RELAZIONE ECONOMICA

Categoria	Prodotto	Costo in Euro (350 Pazienti)
KIT ELISA	sRAGE	4000,00
	esRAGE	4000,00
	S100A12	4000,00
	Carboxy-Methyl-Lysine	4000,00
	TOTALE Euro	16000,00 (45,71 Euro/paziente)

Categoria	Prodotto	Costo in Euro (30 Pazienti)
Estr. RNA da MNC	Vacutainer	70,00
	Eppendorf 2ml	60,00
	Lymphoprep™	200,00
	Reagenti vari	250,00
	Eppendorf 1,5ml	45,00
	Trizol	500,00
Retrotrascrizione	Superscript-II	800,00
	RNase out	200,00
	PCR tube	150,00
	OLIGOdT	400,00
	dNTPs	200,00
RT-PCR	Platinum TAQ polimerase high fidelity	1254,00
	Sybr Safe DNA gel stain	220,00
	TOTALE Euro	4350 (144,96 Euro/Paziente)

PROPOSTA ESTENSIONE PROGETTO DI RICERCA AVVIATO CON BORSA DI STUDIO FONDAZIONE DIABETE RICERCA 2014

Titolo: **Dieta a basso contenuto di AGEs: effetto sui markers di infiammazione, indicatori di danno cardiovascolare precoce e profilo lipidico in soggetti con pre-diabete.**

Background e razionale estensione progetto.

Lo studio finora condotto, atto a caratterizzare il profilo di rischio cardiovascolare ed il ruolo dell'asse AGE/RAGE nel prediabete, ha messo in evidenza come soggetti con prediabete (indipendentemente dai criteri utilizzati per definirlo quale IFG, IGT o HbA_{1c} 5.7-6.4%) presentino elevati livelli di marcatori di infiammazione e bassi livelli di esRAGE, dato che suggerirebbe una ridotta capacità *scavenger* di questi soggetti nei confronti di molecole pro-infiammatorie; inoltre abbiamo dimostrato che vi è una correlazione inversa tra esRAGE ed i markers precoci di danno cardiovascolare subclinico. Ad oggi, tuttavia, non sono chiari i fattori che regolano i livelli plasmatici esRAGE. I fattori regolatori potrebbero essere sia-genetici che ambientali: alcuni studi su pazienti con diabete di tipo 2 hanno, infatti, evidenziato come i livelli plasmatici di esRAGE siano correlati con polimorfismi del gene RAGE; altri studi hanno, invece, dimostrato come alcuni farmaci di comune utilizzo, tra cui il pioglitazone e le statine possano modulare l'asse AGE/RAGE facendo aumentare i livelli di esRAGE e che questi livelli possono essere modulati anche in condizioni patologiche croniche (insufficienza renale cronica, malattie infiammatorie). Ad oggi, non è noto se un intervento dietetico possa modulare l'asse AGE/RAGE. Il razionale dell'associazione tra dieta e asse AGE/RAGE deriva dal fatto che gli AGEs non solo si formano nell'organismo in determinate condizioni, ma esistono anche nei cibi ~~e mangiamo~~; quest'ultimi vengono chiamati **dietary AGEs (dAGEs)**.

Per molti anni è stata sottovalutata l'importanza dei dAGEs, tuttavia, recenti studi clinici in cui venivano somministrati pasti ricchi di AGEs, hanno mostrato che i dAGEs vengono assorbiti in quantità importanti e contribuirebbero significativamente ad aumentare il *pool* totale di AGEs dell'organismo. È stato stimato, infatti, che circa il 10% degli AGEs ingeriti arrivano in circolo; i 2/3 rimangono nell'organismo e sono incorporati nei tessuti, solo 1/3 viene escreto per via renale. In particolar modo, alimenti di origine animale contenenti un quantitativo elevato di proteine e grassi hanno, di solito, un alto contenuto in dAGEs, mentre cibi ricchi in carboidrati come la frutta, i prodotti integrali, i vegetali e il latte scremato contengono quantità notevolmente inferiori di dAGEs.

Il principale fattore che determina il contenuto di AGEs negli alimenti sono, tuttavia, i metodi ed i tempi di cottura.

In breve, i metodi di cottura che favoriscono la formazione di AGEs (calore secco, alte temperature) sono:

- la cottura alla griglia, piastra e alla brace.
- la cottura al forno
- la frittura.

Al contrario, metodi di cottura con basso accumulo di AGEs (calore umido, basse temperature) sono:

- la stufatura
- la bollitura
- la brasatura
- cottura al vapore
- cottura al microonde

Il basso pH blocca o riduce la formazione di AGEs nella carne cotta. Per tale motivo l'esposizione a succo di limone o aceto (marinatura) almeno un'ora prima riduce di circa il 50% la formazione degli AGEs con la cottura.

È noto che la dieta moderna (Western diet) si associa ad un'alta assunzione di AGEs, poiché è caratterizzata dal consumo frequente di alimenti altamente raffinati, carni grasse trasformate, formaggi stagionati, salse altamente caloriche e “junks foods” di vario genere. Peraltro, nelle diete moderne una grande quantità di cibi sono esposti al calore o cotti al fine di favorirne la conservazione e preservarne le caratteristiche organolettiche.

Ad oggi, un solo studio, condotto solo su soggetti sani, ha verificato l'effetto di una dieta povera di AGEs sui livelli plasmatici di esRAGE. In questo studio la dieta non sembrava influenzare significativamente i livelli plasmatici di esRAGE. Tuttavia, si trattava di uno studio condotto su soggetti sani; i dati che abbiamo prodotto nel 2014 hanno dimostrato che soggetti con prediabete hanno livelli plasmatici di esRAGE significativamente più bassi rispetto a soggetti sani (circa 50% di riduzione) ed un profilo infiammatorio sfavorevole (elevati livelli di S100A12 e hs-CRP). La nostra

ipotesi è verificare se, nella popolazione di soggetti con prediabete, una dieta povera di AGEs abbia un effetto sui bassi livelli plasmatici di esRAGE, sul profilo infiammatorio e di rischio cardiovascolare.

Obiettivi

Obiettivo primario dello studio è quello di analizzare l'effetto di una dieta a basso contenuto di AGEs sui livelli plasmatici di esRAGE ed sRAGE in soggetti con prediabete.

Obiettivi secondari

- analizzare gli effetti di una dieta a basso contenuto di AGEs sui markers infiammatori e di glicazione (S100A12, hs-CRP e Carboxy-methyl-lisina [CML]) in soggetti con prediabete;
- analizzare gli effetti di una dieta a basso contenuto di AGEs sulla caratterizzazione fenotipica e delle vie dell'infiammazione di cellule mononucleate (MNC) isolate dal plasma dei pazienti con pre-diabete. L'infiammazione a livello cellulare può essere indotta da un incremento dell'attività del fattore di trascrizione nucleare κB (NF- κB) ed un concomitante decremento dei suoi inibitori I κB - α e I κB - β . Valuteremo l'espressione di geni mediante RT-PCR ed i livelli plasmatici di proteine regolati da NF- κB : TNF- α ed IL-6.

Ulteriori obiettivi dello studio sono analizzare l'effetto di una dieta a basso contenuto di AGEs su markers precoci di rischio cardiovascolare: l'arterial stiffness e l'IMT.

Importanza dei risultati attesi.

Ad oggi, le linee guida rimarcano l'importanza di identificare i soggetti con prediabete al fine di coinvolgerli in interventi di prevenzione primaria. Tuttavia, non esistono indicazioni specifiche per un intervento farmacologico in questa popolazione; bisogna rimarcare che, gli studi di intervento che sono stati condotti in soggetti con prediabete sottolineano come la modifica dello stile di vita, con particolare attenzione per la dieta, sia l'aspetto più importante per la prevenzione della progressione a diabete di tipo 2 e per ridurre il rischio a lungo termine di patologie cardiovascolari. Tuttavia, la maggior parte degli studi di dietetica applicata ha concentrato i suoi sforzi soprattutto sul controllo dell'introito calorico e sulla qualità di determinati alimenti, piuttosto che sui metodi ed i tempi di cottura dei cibi. La dieta povera di AGEs potrebbe rappresentare un approccio innovativo nella modifica dello stile di vita che rappresenta il *gold standard* terapeutico nei soggetti con prediabete. Dai dati della letteratura, ricavati soprattutto su pazienti con diabete di tipo 2 sembra che la dieta a basso contenuto di AGEs abbia importanti effetti positivi sul profilo infiammatorio e di rischio cardiovascolare; se tali risultati fossero validi anche nei pazienti con prediabete tali pazienti potrebbero avvalersi ancora più precocemente di benefici sul rischio cardiovascolare e di progressione a diabete di tipo 2.

Materiali e metodi

Saranno reclutati 60 pazienti senza precedente diagnosi di diabete afferenti ai nostri ambulatori per la valutazione del profilo glicemico e del rischio cardiovascolare. Tutti i pazienti saranno di razza caucasica e saranno sottoposti ad esame fisico ed anamnestico riguardante la loro storia clinica, l'abitudine tabagica ed il consumo di alcol. Nessuno di loro avrà cambiato abitudini alimentari o perso peso durante i 3 mesi precedenti lo studio.

I criteri di inclusione sono:

- età compresa tra i 35 e i 65 anni;
- Prediabete identificato come alterata glicemia a digiuno (IFG) e/o alterata tolleranza ai carboidrati (IGT) dopo OGTT e/o HbA_{1c} 5.7-6.4%;

I criteri di esclusione sono:

- precedente storia di diabete;
- precedente storia di patologia cardiovascolare (ictus cerebri, cardiopatia ischemica, scompenso cardiaco, arteriopatia periferica);
- qualunque regime dietetico differente dalla dieta Mediterranea;
- uso di farmaci che influenzano la tolleranza glicemica nel corso dei 3 mesi di studio;
- evidenza clinica di patologia renale o epatica;
- patologie reumatiche;
- recente storia di patologie acute, abuso di alcol, sostanze stupefacenti, patologie maligne.

RECLUTAMENTO E FOLLOW UP DEI PAZIENTI IN STUDIO

1 – Prima visita:

Raccolta dati anamnestici - esame anamnestico riguardante la storia clinica, l'abitudine tabagica, il consumo di alcol ed anamnesi alimentare approfondita condotta da dietista esperto su tutti i pazienti.

Raccolta parametri antropometrici - Esame obiettivo e misurazione di peso, altezza, BMI (kg)/[height (m)]², circonferenza vita, pressione sistolica, pressione diastolica.

Raccolta parametri bioumorali - Prelievo di sangue venoso dopo 12 ore di digiuno per il dosaggio di: glicemia a digiuno, HbA_{1c}, curva da carico di glucosio (OGTT), assetto lipidico, funzionalità renale ed epatica, insulina, sRAGE, esRAGE, S100A12, hs-CRP.

Raccolta campioni di plasma (10 ml) per isolamento MNC da sangue periferico

Valutazione del rischio cardiovascolare - Arterial stiffness (PWA, PWV), intima media thickness (IMT).

Calcolo del metabolismo basale – Calcolo effettuato mediante l'utilizzo dell'equazione di Harris Benedict, Mifflin.

Rilascio del diario alimentare - Il paziente compilerà il diario alimentare per 4/5 giorni annotando: cibi e bevande ingerite con annesse modalità di cottura (temperatura e tempi di cottura).

2 – Seconda visita

Nel corso della seconda visita verrà rilasciata la dieta. I pazienti reclutati saranno randomizzati a ricevere:

a) dieta a contenuto standard di AGEs (sAGE – gruppo controllo), ovvero una dieta normo-ipocalorica (-300 kcal) secondo le linee guida ADA contenente il 50-55% in carboidrati, 15-20% in proteine, <30% grassi totali (<10% saturi), <300 mg colesterolo.

b) dieta a basso contenuto di AGEs (low AGEs), ovvero una dieta normo-ipocalorica (-300 kcal) secondo le linee guida ADA contenente il 50-55% in carboidrati, 15-20% in proteine, <30% grassi totali (<10% saturi), <300 mg colesterolo. Particolare attenzione sarà focalizzata sui metodi di cottura e sui tempi di cottura (tempi di cottura più brevi). Sarà, inoltre, suggerito di evitare formaggi stagionati e junk food e di usare poco olio.

3 – Follow up

Nella fase di follow up ogni paziente sarà visitato ambulatorialmente al giorno 40-45 ed al giorno 85-95 dopo la consegna della dieta. A ciascuno verrà richiesto di esibire ad ogni controllo 2-3 diari alimentari. Ai controlli di giorno 40-45 e 85-95 saranno ripetuti prelievo venoso (assetto lipidico, hs-PRC ecc...) e valutazione del rischio cardiovascolare (arterial stiffness, IMT).

Analisi Biochimica. Un prelievo di sangue dopo 12 ore di digiuno sarà prelevato per la misurazione di glicemia, assetto lipidico e HbA_{1c}. Tutti i soggetti saranno sottoposti a OGTT con determinazione della glicemia a 30, 60, 90, 120 minuti dopo il carico di glucosio. L'HbA_{1c} sarà misurata mediante metodica elettiva high-performance liquid chromatography (HPLC) con analizzatore certificato National Glycohaemoglobin Standardisation Program (NGSP). 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 su campioni raccolti, immediatamente centrifugati e conservati a -80°. I dosaggi saranno effettuati seguendo i protocolli delle case produttrici.

Isolamento MNC. Le MNC saranno isolate tramite centrifugazione su gradiente di densità (LymphoprepTM, Stemcell Technologies, Milano, Italy). I campioni di sangue (10 ml) saranno raccolti in provette contenenti EDTA: i campioni saranno sottoposti a centrifugazione ed al termine saranno raccolte le cellule mononucleate stratificate nell'interfaccia plasma/Lymphoprep.

Analisi Statistica. La numerosità del campione è stata calcolata sulla base della variabile esRAGE: usando un livello di significatività (α) al 5% ed una potenza ($1-\beta$) dell'80% è necessario reclutare 30 pazienti per gruppo. L'analisi statistica dei parametri clinici e laboratoristici sarà eseguita utilizzando il software Stat View 6.0 per Windows. Saranno utilizzati il test t di student per dati appaiati e non appaiati per il confronto intra-gruppo ed inter-gruppi rispettivamente. Un valore di $p < 0.05$ sarà considerato significativo. L'analisi delle variabili non distribuite normalmente sarà effettuata dopo trasformazione logaritmica. L'analisi di regressione semplice e multipla saranno utilizzate per evidenziare relazioni funzionali tra variabili.

Referenze

- 1 – Basta G. Receptor for advanced glycation endproducts and atherosclerosis: From basic mechanisms to clinical implications *Atherosclerosis* (2008)
- 2 – Koyama H et al. RAGE and Soluble RAGE: Potential Therapeutic Targets for Cardiovascular Diseases *Mol Med* (2007)
- 3 - Selvin E et al. sRAGE and risk of diabetes, cardiovascular disease, and death. *Diabetes* (2013)
- 4 – Koyama H et al. Plasma level of endogenous secretory RAGE is associated with components of the metabolic syndrome and atherosclerosis. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology *ATVB* (2005)
- 5 - Peng WH et al. RAGE gene polymorphisms are associated with circulating levels of endogenous secretory RAGE but not with coronary artery disease in Chinese patients with type 2 diabetes mellitus. *Archives of medical research* (2009)
- 6 - Tan KC et al. Thiazolidinedione increases serum soluble receptor for advanced glycation end-products in type 2 diabetes. *Diabetologia* (2007)
- 7 - Ramasamy R Advanced glycation end products and RAGE: a common thread in aging, diabetes, neurodegeneration, and inflammation. *Glycobiology* (2005)
- 8 – Semba R et al. Does Accumulation of Advanced Glycation End Products Contribute to the Aging Phenotype? *Journal of Gerontology* (2010)
- 9 - Semba R. Dietary Intake of Advanced Glycation End Products Did Not Affect Endothelial Function and Inflammation in Healthy Adults in a Randomized Controlled Trial *J Nutr* (2014)

CATANIA 09-12-2015

Antonino Di Pino

