

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN

Scienze Cardio Nefro Toraciche

Ciclo 32°

Settore Concorsuale:

06/D2 - Endocrinologia, Nefrologia e Scienze della alimentazione e del benessere

Settore Scientifico Disciplinare:

MED/14 Nefrologia

TITOLO TESI

**STUDIO OSSERVAZIONALE TRASVERSALE VOLTO A VALUTARE LA
PRESENZA DI DANNO VASCOLARE IN PAZIENTI AFFETTI DA
DIABETE MELLITO TIPO 2 CON DIVERSO GRADO DI MALATTIA
RENALE CRONICA**

Presentata da: Dr. Silverio Rotondi

Coordinatore Dottorato

Prof. Gaetano Domenico Gargiulo

Supervisore

Prof. Gaetano La Manna

Co-Supervisore

Prof. Sandro Mazzaferro

Esame finale anno 2020

Abstract

La gravità del DMT2 e delle sue complicanze come la malattia renale cronica (CKD) comportano un aumento della rigidità vascolare, misurabile con il CAVI, e alterazioni dei livelli ematici di sostanze implicate nella danno vascolare come Klotho, FGF23, Sclerostina.

Scopo dello studio era valutare il ruolo della CKD stadio 1-2 e delle eventuali alterazioni di 25(OH)Vitamin-D, FGF23, Klotho, Sclerostina sul danno vascolare precoce nel DMT2.

Metodi

Pazienti inclusi: DMT2 da <10 anni, età <60 anni, nessuna terapia insulinica, eGFR \geq 60 ml/min/1,73m², assenza di complicanze vascolari. Abbiamo valutato: CAVI, albumin-excretion-rate (ACR), 25(OH)Vitamin-D, Klotho, FGF23, Sclerostina. 30 soggetti sani erano il controllo per CAVI, Klotho, FGF23 e Sclerostina.

Risultati

Abbiamo arruolato 40 donne e 60 uomini, età media 56 anni (IQR:52-59), DMT2 da 5 anni (IQR:2,7-7), HbA1c 6,3% (5.8-6.7), eGFR di 95 ml/min/1,73m². FGF23 (42 \pm 10 vs controlli 29.8 \pm 11 pmol/l, p<.05) e Sclerostina (36,2 \pm 7 vs 26.6 \pm 1 pmol/l, p<.05) erano aumentati e Klotho ridotto (673 \pm 300 vs 845 \pm 330 pg/ml, p<.05). La CKD (ACR \geq 30 mg/gr; eGFR fra 60-90 ml/min/1,73m²) era presente nel 12,6%. Il CAVI medio era normale e i pazienti con CAVI borderline (\geq 8, 33%) e patologico (\geq 9, 13%) erano più anziani (p.001), con maggiore durata di DMT2 (p.022) e 25(OH)Vitamin-D più bassa (p.041). Il CAVI correlava positivamente con età (p.001), Hb1Ac (p.036) e pressione arteriosa sistolica (PAS) (p.012) e pressione arteriosa diastolica (PAD) (p.001) e negativamente con la 25(OH)Vitamin-D (p.046). L'analisi multivariata evidenziava predittori positivi del CAVI età (p.001), PAD (p.0001), ACR (p.008) e Klotho (p.017).

Discussione

Nella nostra popolazione DMT2 il CAVI borderline e patologico è associato a ACR aumentato, PAD elevata e 25(OH)Vitamin-D ridotta e le alterazioni di FGF23, sclerostina e Klotho, secondarie alla CKD, sono un segno precoce di possibile danno vascolare.

Conclusione

ACR, 25(OH)Vitamin-D e PAD possono essere dei fattori di rischio modificabili di danno vascolare precoce nel DMT2.

Indice

- Diabete mellito tipo 2 (DMT2): definizione, epidemiologia e patogenesi
- Malattia renale cronica (CKD): definizione, epidemiologia e patogenesi
- Legami fra DMT2 e IRC
- Danno vascolare nel DMT2 e nella CKD meccanismi patogenetici
- Metodi di misurazione del danno vascolare nelle fasi precoci

Studio sperimentale

- Introduzione
- Scopo dello studio
- Materiali e metodi
- Risultati
- Discussione
- Conclusione
- Tabelle
- Figure
- Bibliografia

Diabete mellito tipo 2 (DMT2): definizione, epidemiologia e patogenesi

Il diabete mellito tipo 2 (DMT2) è caratterizzato da una disregolazione del metabolismo dei carboidrati, lipidi e proteine secondario ad una ridotta produzione di insulina associato ad aumentata resistenza dei tessuti all'insulina. La definizione di DMT2 è cambiata negli anni le linee guida della associazione americana di diabetologia (ADA) definiscono il DMT2 come: emoglobina glicata (HbA1c) >6,5% e/o glicemia a digiuno > 126 mg/dl e/o test di tolleranza orale al glucosio (OGTT) a due ore con glicemia > di 200 mg/dl (tabella 1) (1).

Parametri	Normale	Prediabete	Diabete tipo 2
Hb-Glicata	<5,7%	5,7-6,4%	>6,5%
Glicemia a digiuno	<100 mg/dl	100-125 mg/dl	>126 mg/dl
Glicemia a 2 ore da OGTT	<140 mg/dl	140-199 mg/dl	>200 mg/dl

Tabella 1: criteri diagnostici diabete mellito e pre-diabete

Inoltre è stata identificata una classe di pazienti a rischio di sviluppare DMT2 definiti come pre-diabete in base ai criteri diagnostici mostrati in tabella 1.

Dal punto di vista epidemiologico si stima che il DMT2 sia presente in 380 milioni di persone nel mondo fra i 20 e 70 anni, l'80% dei malati risiede nei paesi a medio e alto reddito e tale prevalenza è prevista aumentare fino a 530 milioni di persone nel 2035 (2). Tale aumento riguarderà i paesi in cui si sta assistendo ad una rapida traslazione della stile di vita con incremento dell'obesità e delle nascita sovrappeso (Figura 1) (3).

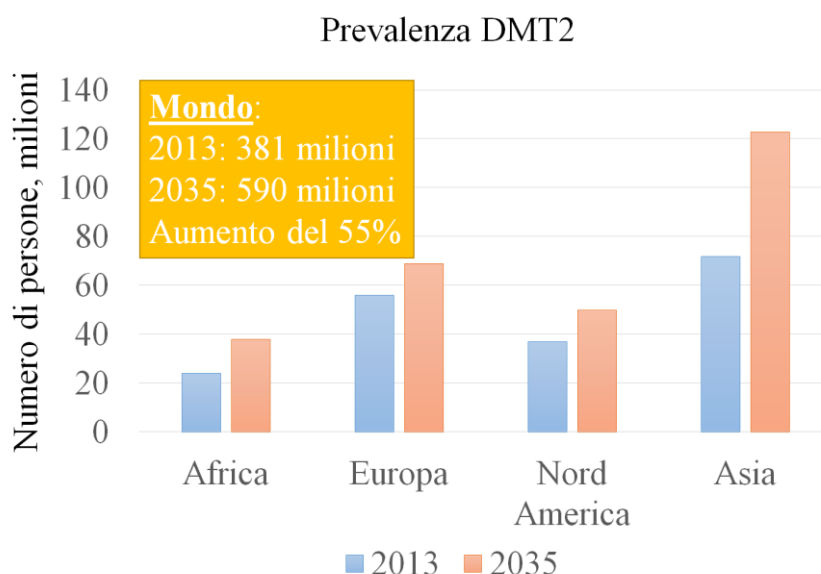


Figura 1: confronto fra prevalenza di DMT2 e IGT fra 2013 e 2035 nei diversi paesi.

La patofisiologia del diabete comprende la disfunzione delle cellule beta pancreatiche, la resistenza insulinica e l'infiammazione cronica questi risultano in una alterazione dei livelli glicemici che comporta un danno micro e macrovascolare (3). Le cause di queste alterazioni sono multifattoriali comprendendo cluster genetici, ambientali e legati allo stile di vita. (tabella 2) (4-5).

Età avanzata
Familiarità per DMT2
Fattori genetici
Sindrome metabolica
BMI >25 Kg m ²
Obesità centrale
Ovaio policistico
Patologia cardiovascolare
Alimentazione
Fumo
Sedentarietà
Pregresso diabete gestazionale
Farmaci
Fattori socio-sanitari

Tabella 2: fattori di rischio per lo sviluppo di DMT2

Infatti, ai fattori di rischio non modificabili quali la familiarità per malattia diabetica, la policistosi ovarica, pregressa preclampsia, si aggiungono i fattori di rischio modificabili legati allo stile di vita fra cui è interessante notare come i più rilevanti siano anche fattori di rischio per lo sviluppo di malattia renale cronica (CKD): la sindrome metabolica, il fumo di sigaretta, il consumo regolare di bevande zuccherine (4). Questa concomitanza di fattori di rischio giustifica in parte la stretta associazione fra DMT2 e malattia renale cronica poiché non solo il DMT2 è un

fattore di rischio per CKD ma gli stessi fattori di rischio possono facilitare entrambe le patologie (6).

Senza dubbio i due elementi principali nella patogenesi del DMT2 sono la riduzione della funzione delle cellule beta pancreatiche e l'insulina resistenza, fattori entrambi presenti perché si sviluppi il DMT2 (4).

L'insulina resistenza è il primo elemento riscontrabile nello sviluppo di DMT2 e precede la malattia clinicamente manifesta di vari anni, questa riguarda non solo il tessuto muscolare ed epatico ma anche gli adipociti, il rene ecc (7). Le cause principali dello sviluppo di insulina resistenza sono l'accumulo di lipidi ectopico a livello muscolare ed epatico, lo sviluppo di una disfunzione mitocondriale e lo stato infiammatorio sistemico. Questa resistenza all'azione dell'insulina è responsabile dell'aumento della glicemia sia per una ridotta capacità di utilizzo tissutale ma anche perché è stimolata la sintesi epatica e muscolare di glucagone che aumenta la gluconeogenesi. Questa cronica iperglicemia inizialmente latente comporta a livello pancreatico una aumentata attività delle cellule beta che se protratta negli anni causa apoptosi di queste e un progressivo aumento % delle cellule alpha pancreatiche sulle beta con deficit di produzione insulinica e DMT2 (3-8).

Il DMT2 si associa a numerose complicanze legate per lo più alla durata e gravità di malattia (9). Infatti l'iperglicemia agisce a livello microvascolare attraverso la formazione di advanced glycation end products (AGEs) con aumento delle specie reattive dell'ossigeno intracellulare. Questo risulta in un danno endoteliale e nello sviluppo di uno stato infiammatorio cronico che associato all'insulina resistenza e ad altri fattori di rischio spesso concomitanti come la dislipidemia, il fumo, l'obesità, l'ipertensione, risultano in un danno aterosclerotico con aumento degli eventi cardiovascolari. Gli organi prevalentemente colpiti sono il sistema nervoso periferico, la retina, il sistema cardiocircolatorio e il rene (3).

Malattia renale cronica (CKD): definizione, epidemiologia e patogenesi

La prima descrizione di malattia renale, indipendente da altre cause, è attribuita a Richard Bright's (1789-1858) che nel 1827 definì la malattia renale come la presenza di edema diffuso e proteine nelle urine (10). Nel corso degli anni la definizione di malattia renale cronica (Chronic kidney disease, CKD) si è progressivamente evoluta e attualmente, secondo le linee guida KDIGO (11), la CKD si definisce come un'alterazione della funzione renale in termini di filtrato glomerulare e/o presenza di proteinuria per almeno tre mesi. La possibilità di misurare e calcolare con formule specifiche l'entità del filtrato glomerulare (GFR) e della proteinuria ha inoltre permesso di dividere in stadi la malattia renale cronica in base all'entità del filtrato glomerulare e alla assenza/presenza di proteinuria. (Tabella 3).

KDIGO Classification and Prognosis of Chronic Kidney Disease 2012

Prognosis of CKD by GFR and albuminuria category

Prognosis of CKD by GFR and albuminuria categories: KDIGO 2012				Persistent albuminuria categories description and range		
				A1	A2	A3
				Normal to mildly increased	Moderately increased	Severely increased
				<30 mg/g <3 mg/mmol	30–300 mg/g 3–30 mg/mmol	>300 mg/g >30 mg/mmol
GFR categories (ml/min/1.73 m ²) description and range	G1	Normal or high	≥90			
	G2	Mildly decreased	60–89			
	G3a	Mildly to moderately decreased	45–59			
	G3b	Moderately to severely decreased	30–44			
	G4	Severely decreased	15–29			
	G5	Kidney failure	<15			

Green: low risk (if no other markers of kidney disease, no CKD); yellow: moderately increased risk; orange: high risk; red: very high risk.

Tabella 3 Classificazione e prognosi della CKD dalle linee guida KDIGO del 2012

La divisione in stadi della CKD trova il suo razionale in una categorizzazione dei pazienti in maniera uniforme in grado di identificare il rischio di progressione della malattia renale e la probabile presenza di alterazioni metaboliche secondarie alla CKD.

Attualmente la CKD è la 14° causa di morte nel mondo (12 decessi per 100.000 persone/anno) con una prevalenza in progressivo aumento. La distribuzione della CKD non è uniforme ma considerando i paesi ad alto reddito la prevalenza si attesta intorno all'11%.

Le cause principali di CKD cambiano in base alle popolazioni studiate ma il diabete mellito e l'ipertensione arteriosa sono sicuramente i fattori di rischio prevalenti nei paesi a medio ed alto reddito con un progressivo aumento nei paesi a basso reddito. In particolare nei paesi ad alto reddito il diabete mellito è presente nel 30-50 % dei pazienti con CKD (12).

Come detto le cause del danno renale sono molteplici e comprendono sia malattie sistemiche come l'ipertensione arteriosa, il diabete mellito, patologie autoimmuni o neoplastiche sia malattie renali primitive. Independentemente dalle cause iniziali lo sviluppo della malattia renale cronica e la progressione del danno renale prosegue con meccanismi comuni di tipo non immunomediati.

Il danno iniziale comporta la riduzione dei glomeruli funzionanti con conseguente iperattività compensatoria dei nefroni residui mediata dall'attivazione del sistema renina angiotensina aldosterone. L'iperfiltrazione dei nefroni residui se protratta può portare ad attivazione podocitaria con produzione di citochine pro infiammatorie, danno podocitario e sviluppo di ulteriore sclerosi glomerulare (10). Inoltre la presenza di proteinuria diviene fattore indipendente di progressione del danno renale a causa dello stato infiammatorio associato (13). Infatti (Figura 4) l'albumina a livello tubulare viene riassorbita dalle cellule tubulari attraverso il complesso cubilina-megalina. La presenza ad alte concentrazioni del complesso albumina-cubilina-megalina causa la attivazione di vie intracellulari (extracellular signal-regulated kinase (ERK), nuclear factor-kB (NF-kB), protein kinase C (PKC)) che comportano l'aumento interstiziale di sostanze pro-infiammatorie (monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)) con conseguente attivazione linfocitaria e secrezione di sostanze pro fibrotiche (reactive oxygen species (ROS), endotelina, tumor growth factor- β (TGF- β), collagene). Il risultato è lo sviluppo di uno stato infiammatorio cronico con conseguente danno fibrotico irreversibile (13) (Figura 2)

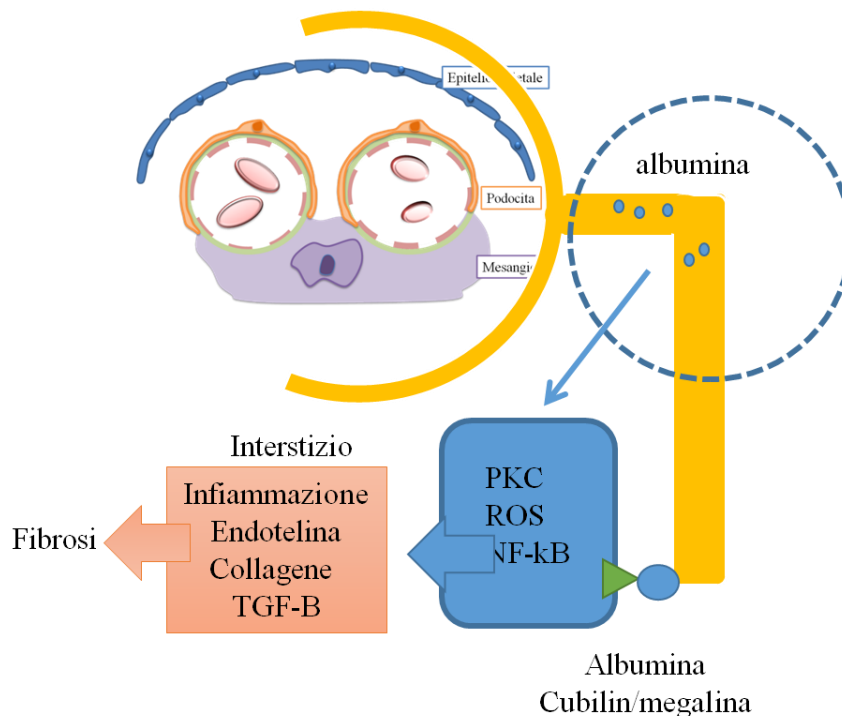


Figura 2, meccanismo di danno renale indotto dalla proteinuria

Le manifestazioni cliniche della CKD sono molteplici e riguardano numerosi parenchimi (Figura 3).

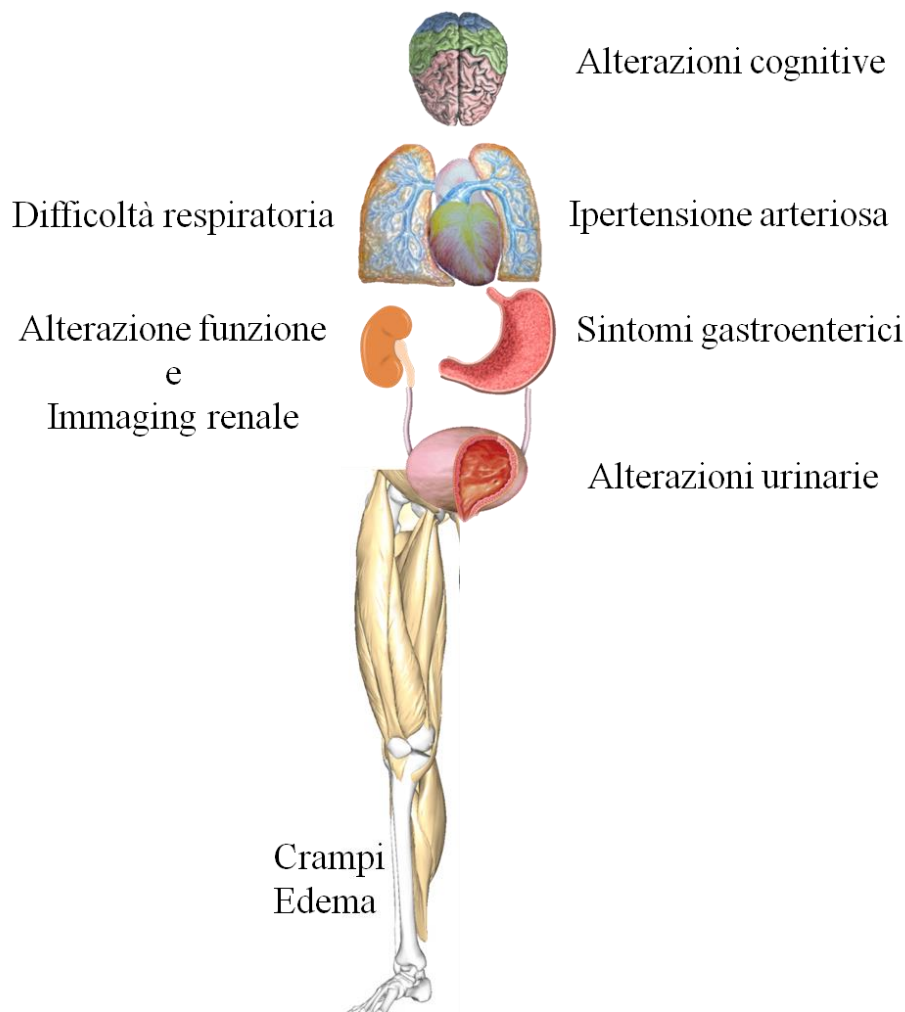


Figura 3, segni e sintomi della CKD

Queste sono causate da diversi fattori fra cui: ritenzione di tossine uremiche, ridotta produzione di ormoni (eritropoietina, calcitriolo, ecc) alterato equilibrio idrico ed elettrolitico. La patofisiologia delle tossine uremiche non è del tutto compresa, queste vengono divise in piccole e idrosolubili come l'urea; piccole e liposolubili come l'omocisteina; grandi (>500 Da) come la beta 2 microglobulina, AGE e PTH. Queste tossine uremiche possono avere effetti diretti e indiretti dati dalla formazione di nuovi complessi tossina-proteina (14). Dal punto di vista clinico di particolare rilievo sono la patologia cardiovascolare e le alterazioni del metabolismo minerale in corso di CKD che vengono racchiuse in un quadro sindromico (CKD- mineral and bone disorder) caratterizzato da: iperparatiroidismo secondario, calcificazioni vascolari, osteodistrofia renale. La CKD-MBD è considerata un fattore di rischio indipendente per la patologia cardiovascolare a causa dell'attività atero-tossica delle sostanze implicate nella sua

patogenesi. Fra queste di particolare e recente interesse sono Klotho, FGF23 e sclerostina di cui parleremo in seguito (15).

DMT2 e CKD

Come detto il DMT2 si associa spesso al danno renale che può essere secondario o a ad una nefropatia diabetica (DKD) o a una nefropatia non diabetica (NDKD) oppure alla combinazione delle due. Queste entità hanno una presentazione clinica spesso sovrapponibile e solo la biopsia renale, che raramente viene eseguita nei pazienti con diabete mellito e danno renale, permette la diagnosi certa. Da questo ne deriva che la prevalenza e l'incidenza della DKD non sono note dal momento che negli studi di registro viene classificata come DKD un generico interessamento renale in corso di malattia diabetica. Queste entità sono però differenti nella patogenesi, nella prognosi e negli out come clinici.

L'insorgenza e la progressione della DKD è multifattoriale (Figura 4)

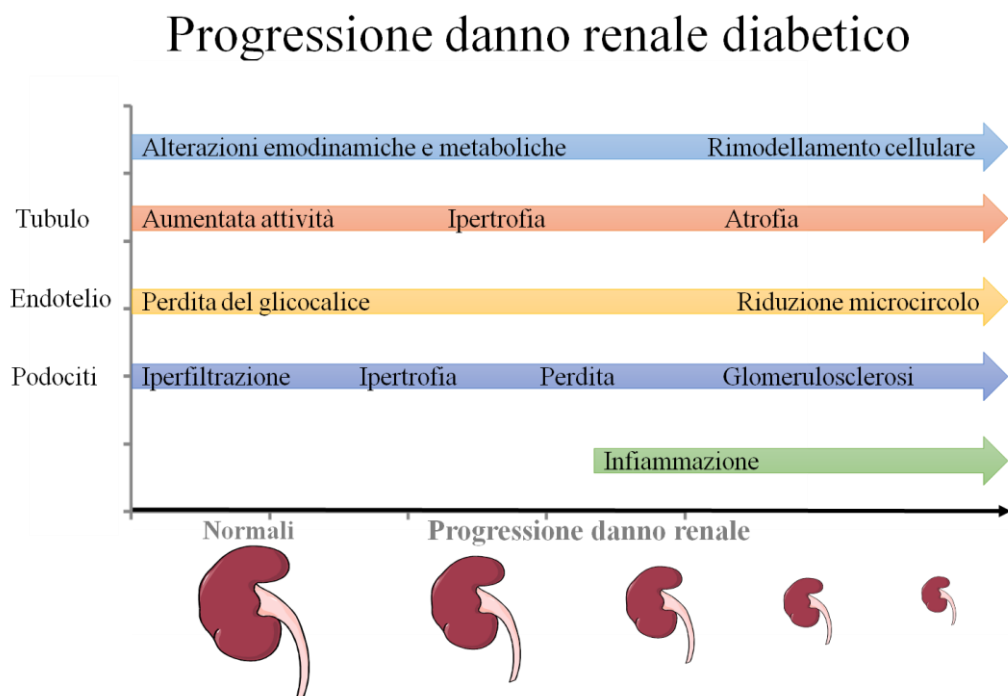


Figura 4: meccanismo di progressione della nefropatia diabetica

Chiaramente il driver del danno è l'iperglicemia che comporta un aumento del riassorbimento di glucosio nel tubulo prossimale da parte dei SGLT2 con conseguente aumento della richiesta di ossigeno delle cellule del tubulo e produzione di marker di stress cellulare come NGAL, KIM1 e perdita di alcune funzioni tubulari come il riassorbimento di proteine megalina mediato. L'aumento del riassorbimento di sodio e glucosio nel tubulo prossimale comporta inoltre una ridotta concentrazione di sodio nel tubulo distale che viene rilevata dalle cellule della macula densa con conseguente produzione di renina che porta ad un aumento della pressione di filtrazione glomerulare e quindi del GFR (iperfiltrazione). L'iperglicemia con una azione

prolungata porta a danno endoteliale ipossico e infiammatorio mediato, ispessimento della membrana basale e danno podocitario con podocito penia e megalia (Figura 5) (6).

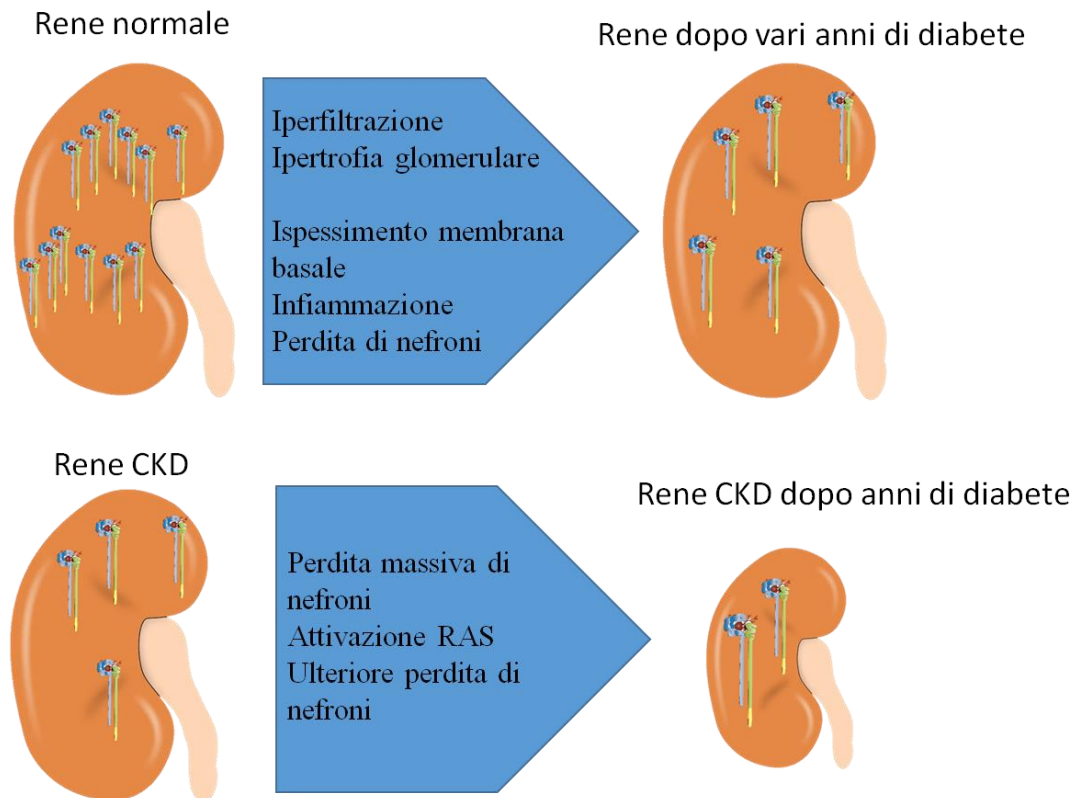


Figura 5, danno renale DMT2 mediato *de novo* vs CKD + DMT2

Dal punto di vista clinico l'andamento del danno renale in corso di diabete viene classicamente diviso in fasi: 1) iperfiltrazione + microalbuminuria; 2) filtrato nella norma + albuminuria; 3) riduzione del filtrato associato a proteinuria. Queste alterazioni cliniche hanno un loro corrispettivo nella fisiopatologia della nefropatia diabetica (Figura 5). Infatti inizialmente se la DKD insorge su un rene normale questo causa un' aumentata attività RAS con conseguente iperfiltrazione che associata al danno endoteliale glicemia mediato, causa albuminuria con le conseguenze descritte in precedenza e progressione del danno renale. Da sottolineare è la differenza nell'andamento clinico della nefropatia diabetica che insorge *de novo* rispetto a quella che insorge in un paziente con precedente danno renale. Infatti la prima può rimanere clinicamente silente in termini di alterazioni del GFR per lungo tempo vista la capacità di mantenere un GFR totale normale a causa del compenso dei singoli nefroni. In questi casi spesso l'unico segno rilevabile della presenza del danno renale è la misura del ratio fra albuminuria e creatininuria ($ACR >30 < 300$ mg/g). L'andamento "classico" della nefropatia diabetica è però raramente clinicamente riscontrabile per la frequente insorgenza di danno diabetico su reni con precedenti danni per cui la fase iperfiltrativa non è evidenziabile a causa di una basale riduzione delle capacità di filtrazione glomerulare. Inoltre quando diviene misurabile la riduzione del GFR

in corso di nefropatia cronica, il numero di nefroni funzionanti è gravemente e irreparabilmente ridotto. Questo suggerisce la necessità di un tempestivo monitoraggio delle prime alterazioni della funzione renale in corso di DMT2 per evitare la progressione della nefropatia (6).

Danno vascolare nel DMT2 e nella CKD meccanismi patogenetici

La CKD e DMT2 sono fattori di rischio indipendenti per la progressione del danno vascolare. In entrambe le condizioni, oltre a i fattori di rischio CV classici (ipertensione arteriosa, dislipidemia, obesità, tabagismo ecc), esistono dei fattori di rischio specifici.

In particolare sia nella CKD che nel DMT2 sono presenti delle alterazioni degli ioni divalenti e delle proteine deputate alla loro regolazione che influenzano il danno vascolare. Fra queste sostanze sono di particolare e recente interesse proteine di produzione renale (klotho) e di produzione ossea (FGF23, sclerostina) (15).

Klotho

Klotho è una proteina trans-membrana di 135 kDa scoperta nel 1997 (16). Il suo nome deriva da una delle tre Parche della mitologia greca (Cloto, Lachesi ed Atropo) che decidevano la lunghezza della vita terrena. Infatti la mutazione inattivante murina di Klotho comporta un fenotipo caratterizzato da invecchiamento e morte precoce. Esistono due forme della proteina Klotho una forma trans-membrana espressa in vari tessuti (gonadi, cervello) ma in particolare nelle cellule del tubulo renale distale e una forma secreta sierica (Figura 6) (17). La proteina trans membrana agisce a livello del tubulo renale come co-recettore obbligato per il fibroblast growth factor 23 (FGF23) mentre la forma sierica agisce come enzima implicato nella regolazione della sensibilità all'insulina, della gestione trans-cellulare del calcio e del potassio e nella angiogenesi. Di particolare interesse è il fatto che Klotho si riduce in corso di CKD negli stadi precoci (18) ed in corso di diabete mellito tipo 2. Il deficit di Klotho caratteristico di queste popolazioni può divenire un fattore di rischio indipendente per lo sviluppo di resistenza insulinica e danno vascolare. Numerosi studi infatti correlano i livelli di Klotho sierico con la patologia cardiovascolare sia nei pazienti CKD che nei pazienti diabetici. I meccanismi diretti con cui la riduzione di Klotho comporta danno CV sono molteplici, i principali sono:

- A livello vascolare comporta la riduzione dell'ossido nitrico con conseguente vasocostrizione, aumento dello stress di parete e produzione di radicali dell'ossigeno (ROS) da parte delle cellule endoteliali.
- A livello miocardico aumenta le attività pro-ossidative, pro-infiammatorie e pro-aptotiche dei miocardiociti con conseguente cambiamento strutturale del muscolo cardiaco caratterizzato da riduzione dei miocardiociti e aumento della fibrosi

- A livello sistemico aumenta lo stato infiammatorio cronico che in maniera diretta, danno endoteliale, o indiretta, ad esempio ridotti livelli di 25D, aumenta il rischio CV (19).

Oltre a questi effetti diretti, di notevole importanza sono poi gli effetti legati al deficit della forma trans-membrana con conseguente resistenza all'azione dell'FGF23.

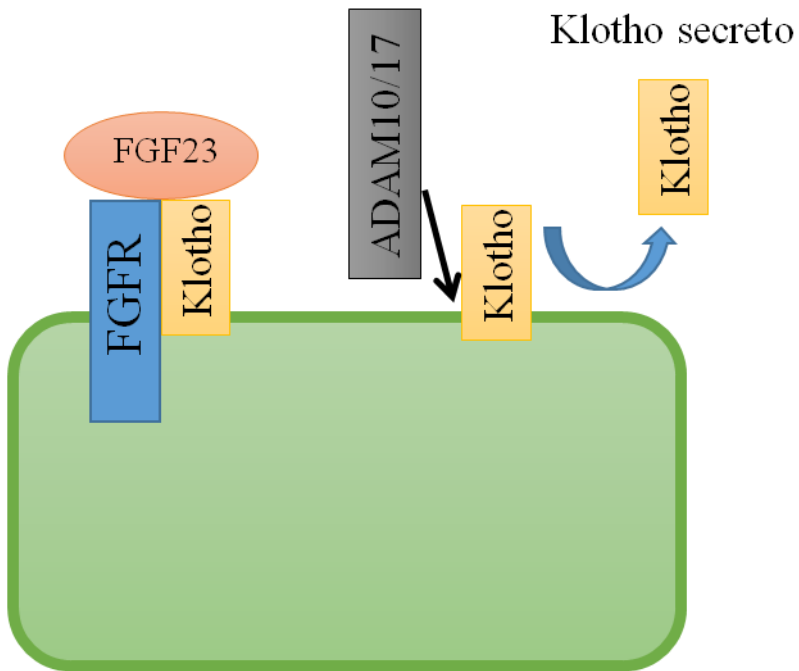


Figura 6: Klotho trans-membrana e secreto.

FGF23:

Il fibroblast growth factor 23 (FGF23) è una proteina circolante di 32 kDa prodotta prevalentemente dagli osteoblasti e dagli osteociti (20). La scoperta della proteina risale al 2000 quando si evidenziò che una sua mutazione era responsabile della rachitismo ipofosfatemico autosomico dominante caratterizzato da ipofosfatemia, ridotti livelli di 1,25 vitamina D e aumentata fosfaturia. Da allora si è messo in evidenza che l'FGF23 agisce a livello del tubulo renale aumentando la fosfaturia e riducendo l'attività dell'alpha idrossilasi renale con conseguente riduzione della produzione di 1,25D (figura 7) (15). Questa funzione dell'FGF23 è mediata da recettori trans-membrana specifici a livello delle cellule del tubulo renale che necessitano però di Klotho per poter essere affini al proprio ligando. Da questo deriva che la riduzione di Klotho comporta lo sviluppo di resistenza tubulare all'azione dell'FGF23 con secondario aumento dei livelli sierici di FGF23. Numerose evidenze infatti dimostrano che la riduzione di Klotho nella CKD e nel DMT2 comporta un aumento dei livelli sierici di FGF23 proporzionale alla gravità della malattia (18).

L'aumento dei livelli sierici di FGF23 partecipa al danno vascolare in numerosi modi fra cui i principali:

- Riduzione della produzione renale di 1,25D con conseguente sviluppo di iperparatiroidismo secondario
- Danno miocardico diretto con lo sviluppo di ipertrofia miocardica mediata da azione locale su recettori miocardici FGF4R che vengono attivati da alte concentrazioni di FGF23
- Danno vascolare diretto con lo sviluppo di aumentata rigidità vascolare e calcificazioni vascolari.

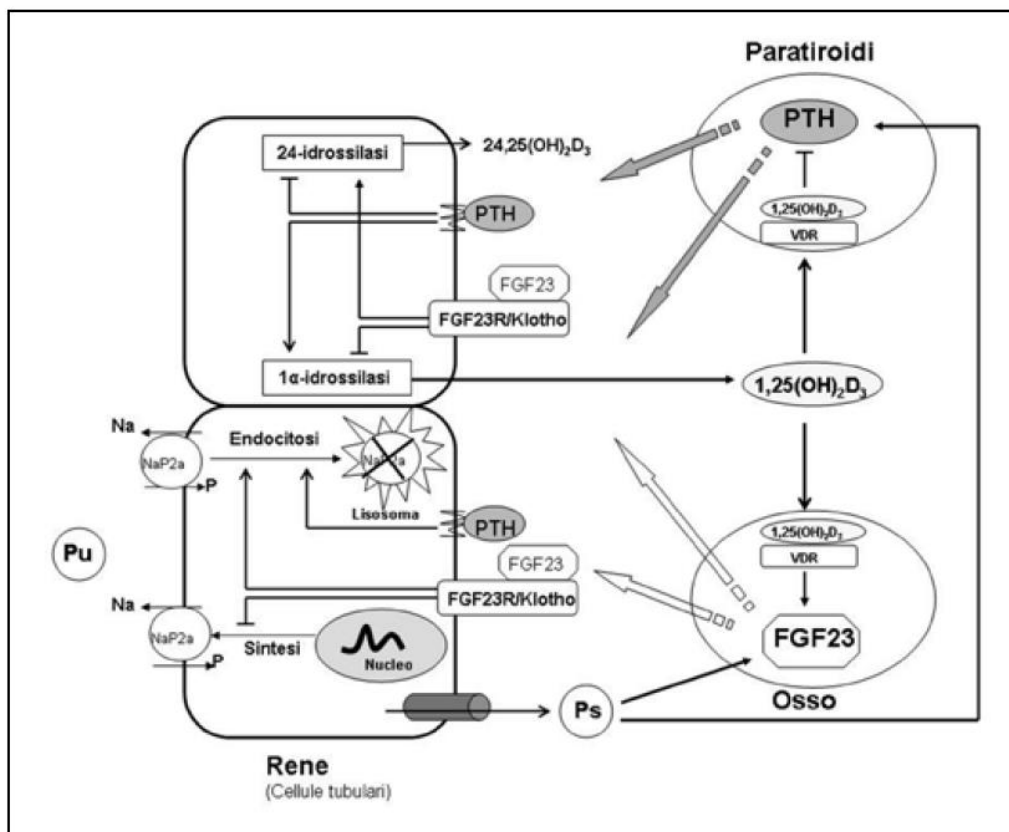


Figura 7, meccanismi di azione del FGF23 a livello del tubulo renale

Sclerostina (SOST):

La Sclerostina è una proteina di 22 kDa , prodotta dagli osteociti, membro della famiglia delle proteine cystatin-knot prodotta dal gene SOST (21). Agisce come inibitore solubile della via canonica del Wingless-type mouse mammary tumor virus integration site (WNT), inibendo la differenziazione e la funzione osteoblastica. Il suo ruolo fisiologico è quello di rallentare il turnover osseo. Diversi fattori sembrano regolarne la sintesi osteocitaria in negativo: PTH, micro fratture ossee, estrogeni, oncostatina; ed in positivo: calcitonina, ridotto carico e stress osseo, corticosteroidi e calcitriolo (22) (figura 8). Il blocco della trasduzione del segnale Wnt, sclerostina mediato, comporta l'aumentata degradazione della beta catenina intracellulare con conseguenze in vari tessuti [23], in particolare nel tessuto vascolare e osseo. Modelli sperimentali di blocco della via Wnt presentano un fenotipo caratterizzato da patologia cardiovascolare ed osteoporosi che si sviluppano precocemente [24]. In accordo varie evidenze nella popolazione generale associano la mortalità CV e l'aumento della rigidità vascolare misurato con la pulse wave velocity ad elevati livelli di Sclerostina. In particolare nella CKD e nelle malattie infiammatorie croniche in cui può essere fatta rientrale anche la patologia diabetica, la sclerostina risulta aumentata e correlare con la patologia cardiovascolare. (25)

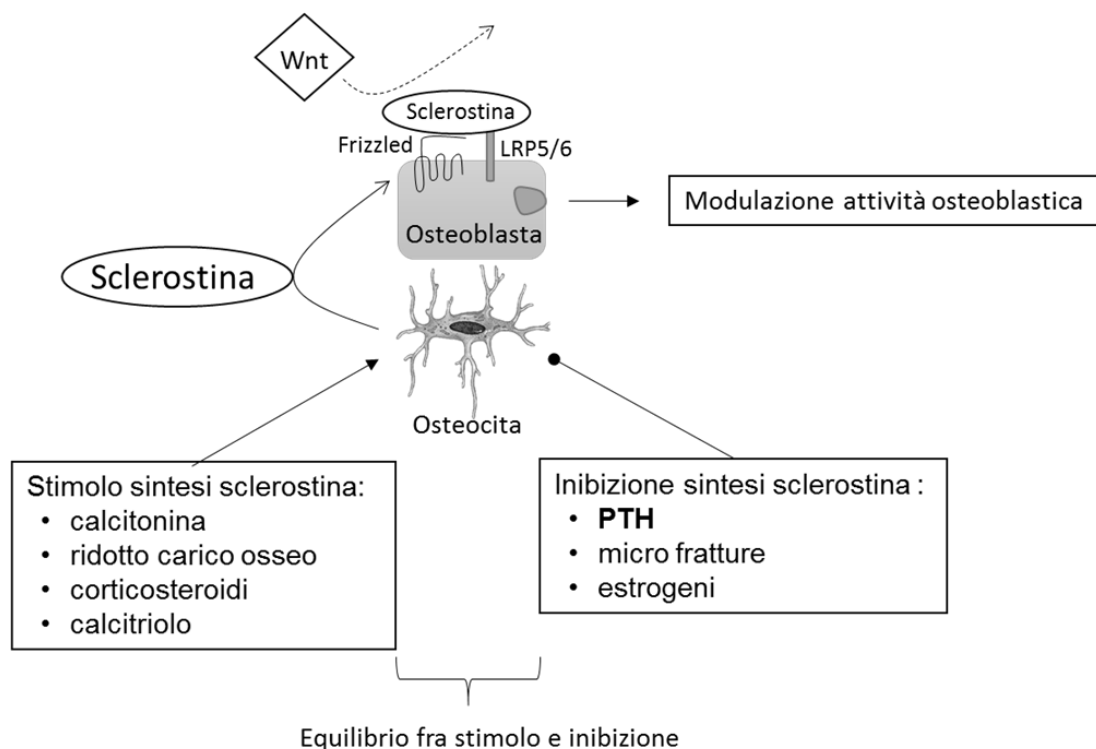


Fig. 8, a: fisiologica modulazione da parte degli osteociti dell'attività osteoblastica, tramite sclerostina. PTH: paratormone; Wnt: Wingless-type mouse mammary tumor virus integration site; LRP: Low-density lipoprotein receptor-related protein.

Metodi di misurazione del danno vascolare nelle fasi precoci

Diversi sono i metodi per poter valutare il danno vascolare precoce in termini di aumentata rigidità vascolare in maniera non invasiva, fra questi di particolare rilevanza clinica sono: la pulse wave velocity (PWV), l'augmentation index (AIx) il parametro di rigidità β (26,27) e il cardio ankle vascular index.

Augmentation index

L'AIx esprime l'aumento della pressione pulsatoria generato dalla riflessione dell'onda sfigmica dalla periferia; esso è dato dalla differenza tra il primo picco della curva pressoria, legato all'onda incidente, ed il secondo picco, dato dall'onda riflessa, diviso per la pressione pulsatoria. La morfologia dell'onda sfigmica è infatti l'espressione dell'interazione dinamica fra l'onda anterograda, generata dall'eiezione ventricolare, e quella riflessa dalla periferia, profondamente, influenzata dalla rigidità aortica, ma anche dalle caratteristiche morfologiche e funzionali del microcircolo, responsabile di buona parte del fenomeno della riflessione dell'onda sfigmica. L'AIx è pertanto un parametro composito che può essere ritenuto un indice indiretto di rigidità arteriosa

Pulse wave velocity

Il principio di base della PWV misurata lungo l'asse aorto-iliaco è che l'onda sfigmica si propaga lungo le pareti dell'albero arterioso ad una velocità che dipende dall'elasticità delle pareti stesse: tanto più sono rigide (meno elastiche) le pareti tanto più alta è la velocità di propagazione [88]. Questa relazione è stata teorizzata per la prima volta nel 1878 da due scienziati olandesi, Moens e Korteweg:

$$PWV = \sqrt{Eh / \rho D}$$

nella quale: "E" è il modulo elastico di una data arteria ovvero la sua rigidità, "h" lo spessore della parete arteriosa, "p" la densità del sangue e "D" il diametro dell'arteria, ed è stata quindi sviluppata dal Bramwell e dal premio Nobel, Hill (28). Dalla formula si evince che la PWV ha una relazione diretta quadratica con il modulo elastico, ossia con la rigidità intrinseca di un vaso arterioso.

In altri termini, l'energia consumata durante la contrazione viene trasferita all'aorta generando due diversi fenomeni ondulatori che si propagano lungo l'albero arterioso in funzione delle proprietà funzionali e strutturali dello stesso: un'onda di flusso, che procede a bassa velocità (circa 1 m/s in aorta) e si attenua procedendo dal centro verso la periferia; ed un'onda di

pressione o onda sfigmica, che procede a velocità molto superiore (tipicamente 4-8 m/s nell'aorta normale) e che ha caratteristiche differenti e del tutto peculiari.

Siamo abituati ad esprimere l'onda sfigmica in un dato punto dell'albero arterioso come la variazione della pressione arteriosa che si verifica durante un ciclo cardiaco, cioè in termini di pressione arteriosa sistolica e diastolica. L'onda sfigmica:

1. può essere riflessa ed amplificata
2. ha un'ampiezza e una frequenza

In ciascun punto dell'albero arterioso, la forma dell'onda sfigmica è il risultato dell'onda incidente, che viaggia dal centro verso la periferia, e dell'onda riflessa. Le riflessioni dell'onda sfigmica si verificano a livello dei siti nei quali si modificano le proprietà dei vasi (es. elasticità, stiffness, tono vasomotorio) o la loro architettura (es. biforcazioni, calcificazioni). Le molteplici onde riflesse dei vari siti si sommano in una singola onda riflessa, che unita all'onda incidente forma l'onda sfigmica finale (28).

La PWV, che come detto è di circa 4-8 m/s nell'aorta, aumenta progressivamente procedendo dall'aorta alle arterie periferiche, prevalentemente a causa della riduzione del calibro della modificazione della caratteristica della parete vasale.

Esistono vari modi per calcolare la PWV ma il metodo più comune si avvale dell'utilizzo della PWV carotido-femorale (cf-PWF). Tuttavia, questo metodo di misurazione è influenzato dalla pressione sanguigna, che risulta essere un importante fattore confondente per la valutazione delle patologie cardiovascolari (30).

La PWV aorto-femorale (afPWF) è una misurazione alternativa della rigidità arteriosa. Questo metodo si basa sulla correzione della pressione sanguigna, usando una pressione diastolica fissa pari a 80 mmHg in modo da ridurre l'influenza dei cambiamenti pressori (31).

La PWV, intesa nel suo insieme, è generalmente considerata il "gold standard" per la valutazione della rigidità vascolare, poiché l'aorta, rappresentando la principale arteria di conduttanza dell'organismo, è responsabile degli effetti fisiopatologici della stiffness arteriosa e poiché un suo aumento si associa ad incremento della mortalità sia nei pazienti nefropatici che nei non nefropatici (32).

Parametro di rigidità β

Il parametro di rigidità β , altra metodica di misurazione della rigidità arteriosa, può essere descritto dalla seguente equazione:

$$\text{Parametro di rigidità } \beta = \ln (P_s / P_d) \times D / \Delta D$$

Dove “ P_s ” è la pressione sistolica; “ P_d ” è la pressione diastolica, “ D ” è il diametro dell’arteria; “ ΔD ” è la variazione del diametro dell’arteria causata dalla variazione di pressione sanguigna. Poiché il parametro di rigidità β rappresenta la variazione della pressione pulsatoria logaritmica richiesta per aumentare il diametro dell’arteria, esso risulta essere relativamente indipendente dalla pressione sanguigna. Tuttavia, l’utilizzo del parametro di rigidità β rimane problematico in quanto lo si ottiene valutando solo un segmento locale delle arterie, ed inizia a perdere la sua indipendenza dalla pressione sanguigna nei soggetti con ipotensione oppure ipertensione da moderata a severa (33).

Cardio ankle vascular index

In virtù di quanto appena detto, per risolvere il problema tecnico e pratico di misurazione della rigidità arteriosa è stato introdotto il Cardio-Ankle Vascular Index (CAVI), che incorpora PWV e il parametro di rigidità β (34).

Lo strumento utilizzato per calcolare tale parametro è il VaSera VS-1500AU.

Poiché il CAVI si basa sul parametro di rigidità β , è relativamente non dipendente dalla variazione di pressione sanguigna. Inoltre l’onda polso degli arti viene misurata tramite la variazione di volume indotta dalla pressione sanguigna nei quattro manicotti posizionati alle quattro estremità (35). Tale sistema permette di ovviare ad alcune problematiche riscontrate in relazione ai siti di misurazione (per es. a livello femorale nell’hf-PWV oppure la valutazione locale del parametro di rigidità β) e garantisce una valutazione complessiva della rigidità arteriosa, dal cuore fino alle caviglie. Esso, inoltre, è in grado di misurare l’indice caviglia-braccio (noto come ABI index o indice di Winsor), altro parametro in grado di dare informazioni utili riguardo lo stato fisiologico di salute vascolare.

Applicazione pratica e teoria

La misurazione dell'indice CAVI richiede:

- Posizionamento di due elettrodi per la rilevazione dell'elettrocardiogramma su entrambi i polsi;
- Posizionamento di un microfono sullo sterno a livello del secondo spazio intercostale per la rilevazione del fonocardiogramma;
- Posizionamento di quattro manicotti attorno le quattro estremità.

Normalmente la procedura nel suo insieme richiede non più di 5 minuti.

Il CAVI è ottenuto tramite la misura della PWV dall'origine della valvola aortica fino alla regione delle caviglie, e dalla pressione sanguigna misurata all'arto superiore. La formula per il CAVI utilizza l'equazione di Bramwell-Hill, che mette in luce la relazione tra PWV e modificazioni in termini volumetrici (36) ed è ricavata dal parametro di rigidità β proposto per la prima volta da Hayashi et al. (33). Pertanto l'indice è calcolato come segue:

$$\text{CAVI} = a [(2p / \Delta P) \times \ln (P_s / P_d) \times \text{PWV}^2] + b \text{ (Equazione 1)}$$

Dove "P_s" è la pressione sistolica; "P_d" è la pressione diastolica; "PWV" è la pulse-wave velocity calcolata dall'origine dell'aorta fino alla regione della caviglia attraverso l'arteria femorale; " ΔP " è la pressione differenziale tra pressione sistolica e diastolica; "p" è la densità del sangue; "a" e "b" sono delle costanti utilizzate per convertire il valore dell'indice CAVI nel valore ottenuto tramite il metodo di Hasegawa (37).

L'equazione del parametro di rigidità β include il rapporto $D/\Delta D$, che può essere ottenuto modificando l'equazione di Bramwell-Hill (38):

$$\text{PWV}^2 = (\Delta P / p) \times (V / \Delta V) \text{ (Equazione 2)}$$

Dove " ΔP " è la pressione di polso; "V" è il volume del vaso sanguigno; " ΔV " è la variazione del volume; "p" è la viscosità del sangue. " $\Delta V/V$ " può essere espresso in termini di "D" e " ΔD ", come mostrato sotto:

$$V/\Delta V = [\pi L (D/2)^2] / \{ \pi L [D + \Delta D/2]^2 - \pi L [D/2]^2 \} = D^2 / [D^2 + 2D\Delta D + \Delta D^2 - D^2] = D^2 / (2D\Delta D + \Delta D^2)$$

Poiché " ΔD^2 " è trascurabile se comparato con " $2D\Delta D$ ", esso può essere ignorato. Quindi, l'equazione può essere semplificata come segue:

$$V/\Delta D = D^2/2D\Delta D = D/2\Delta D \text{ (Equazione 3)}$$

Pertanto, " $V/\Delta V$ " nell'equazione 2 può essere sostituito da " $D/2\Delta D$ ". In questo modo l'equazione 2 diventa la seguente:

$$\text{PWV}^2 = (\Delta P / p) \times (V / \Delta V) = (\Delta P / p) \times (D / 2\Delta D)$$

che può essere ulteriormente modificata in tal modo:

$$D/\Delta D = 2p/\Delta P \times PWV^2 \text{ (Equazione 4)}$$

Quindi, il nuovo valore β può essere ottenuto sostituendo l'equazione 4 nell'equazione del parametro di rigidità β con la seguente relazione:

$$\ln (P_s / P_d) \times (D / \Delta D) = \ln (P_s / P_d) \times (2p / \Delta P) \times PWV^2 \text{ (Equazione 1)}$$

La nuova equazione per il parametro di rigidità β , ottenuta con queste relazioni, riflette la rigidità complessiva comprendente aorta, arteria femorale ed arteria tibiale.

Dipendenza dalle variazioni pressorie

Per valutare l'indipendenza della valutazione CAVI dai cambiamenti di pressione arteriosa numerosi studi sono stati sviluppati nel corso degli ultimi anni. Shirai et al. (39) hanno mostrato sperimentalmente come i valori CAVI non sono influenzati dalla pressione sanguigna quando la riduzione di quest'ultima la si ottiene per mezzo della somministrazione di un β_1 -bloccante selettivo, come il metoprololo.

Inoltre si è cercato di capire se tale indipendenza dai valori di PA possa variare all'interno di un determinato range pressorio. Così si è dimostrato che la relazione lineare tra il coefficiente di distensione ed il log P/Pst. (P = pressione; Pst. = pressione standard) è costante per valori pressori compresi tra 50 e 200 mmHg. Quindi, da questo dato si può dedurre come il CAVI risulti indipendente dalla variazione di pressione sanguigna se quest'ultime sono comprese nel range di cui sopra.

Applicazioni cliniche

Sin dalla sua introduzione nel 2004, il CAVI è stato largamente utilizzato in una grande varietà di studi clinici ed in particolare in quelli che coinvolgono la valutazione della rigidità arteriosa nei pazienti con patologie cardiovascolari e nei pazienti con alto rischio di sviluppare tali patologie (40). Tali ricerche hanno mostrato delle correlazioni positive fra CAVI e patologia coronarica, ischemica cerebrale ed ipertensione, diabete mellito e CKD.

In particolare vari studi evidenziano che nel DMT2 il CAVI correla con la gravità dalle complicanze legate al diabete come neuropatia, microalbuminuria, oltre che con la durata di malattia, la pressione arteriosa e lo stato infiammatorio (41).

Anche nella CKD il CAVI è risultato correlato nei pazienti in emodialisi con la patologia cardiovascolare, la disfunzione diastolica e gli eventi cardiovascolari, dimostrando anche in questa popolazione la capacità di identificare un aumentato rischio di patologia CV.

Studio Sperimentale

Introduzione

Il diabete mellito tipo 2 (DMT2) è una malattia cronica che affligge circa 380 milioni di persone nel mondo con una numerosità stimata di 530 milioni di persone entro il 2035. Le complicanze del DMT2 sono molteplici e frequentemente secondarie a danno macro e microvascolare con conseguente patologia cardiovascolare e spesso malattia renale cronica (CKD) (2). È noto che il DMT2 comporta un aumento del rischio di eventi cardiovascolari correlato con la gravità di malattia diabetica (9). Lo sviluppo del danno vascolare può essere evidenziato, nelle sue fasi iniziali, dall'aumento della rigidità vascolare misurabile tramite (30) l'arterial pulse wave velocity (PWV), che risulta linearmente e positivamente correlata con i valori di glicemia, di HbA1c (43) e con la durata di malattia diabetica (44). Inoltre il DMT2 si associa spesso alla CKD tanto che rappresenta la principale causa di insufficienza renale terminale (End Stage Renal Disease, ESRD) nel mondo, ed in Italia, sebbene non sia ancora la prima causa di ESRD, ha un'incidenza in rapido aumento (45). La CKD in corso di DMT2 diviene un fattore di rischio aggiuntivo per lo sviluppo di patologia CV in questa popolazione dal momento che spesso si associa a alterazioni del metabolismo minerale intimamente connesse con la patogenesi delle calcificazioni vascolari (11). Pertanto i pazienti diabetici e con CKD potrebbero presentare già dai primissimi stadi di malattia diabetica e renale alterazioni silenti metaboliche o vascolari che preannunciano la malattia cardiovascolare clinicamente evidente.

Come nel DMT2 anche in corso di insufficienza renale cronica è possibile osservare, già nei primi stadi, alterazioni della funzione endoteliale che rappresentano un fattore iniziante per il processo di aterogenesi e di aumentata rigidità arteriosa (46, 47). Proprio la misurazione di quest'ultima con la PWV ha mostrato un incremento già nelle prime fasi di CKD ed una correlazione positiva con la progressione della malattia renale e con la gravità della stessa (48).

In aggiunta le evidenze più recenti indicano che alcune alterazioni precoci del metabolismo minerale, tipiche della CKD, possono essere presenti anche nel DMT2 e risultano associate con la malattia vascolare. Così il Fibroblast Growth Factor 23 (FGF23), ormone coinvolto principalmente nell'omeostasi minerale e i cui livelli risultano aumentati in corso di CKD (18), sembra essere un marcatore di danno vascolare sia nella popolazione generale (49) che in quella affetta da insufficienza renale cronica (50). Anche Klotho, inizialmente riconosciuto come corecettore necessario al funzionamento di FGF23, può avere un ruolo protettivo sulle calcificazioni vascolari. I suoi livelli sembrano subire un decremento precoce in corso di CKD (18) e, indipendente da FGF23, la sua riduzione correla con la mortalità cardiovascolare e con l'aumento della rigidità vascolare (51). Infine la sclerostina (SOST), ormone ad azione anti anabolica ossea, ha recentemente suscitato interesse per il suo potenziale ruolo nella patogenesi

delle calcificazioni vascolari, sia nella CKD che in soggetti con funzione renale normale (52, 53). Studi clinici mostrano infatti una correlazione positiva tra Sclerostina, pulse wave velocity e score di calcificazione dell'aorta addominale (53). I livelli di sclerostina sono aumentati nei primi stadi della CKD e nel diabete mellito tipo 2 (54-55) dove correlano anche con il controllo glico-metabolico (emoglobina glicata - HbA1c) e con la durata di malattia (55).

Il Cardio-ankle vascular index (CAVI) è un nuovo strumento di misura della rigidità vascolare. Questo indice, sviluppato nel 2004, è in grado di valutare quantitativamente la rigidità vascolare nell'aorta, nell'arteria femorale e tibiale anteriore misurando la heart-ankle PWV (haPWV) e la pressione arteriosa. Il CAVI viene misurato in maniera operatore indipendente (vedi metodi) e questo lo rende un parametro più riproducibile della brachial-ankle PWV (ba PWV) (34, 35). Vari studi hanno investigato la correlazione fra rigidità vascolare misurata tramite CAVI e gli stadi più avanzati della CKD (G3-4-5) nei pazienti diabetici (44, 46, 48). Attualmente non esistono dati disponibili sulla rigidità vascolare nei pazienti con DMT2 senza segni clinici di danno d'organo e la relazione con le alterazioni iniziali delle sostanze implicate nel metabolismo minerale (FGF23, Klotho ecc), e il danno renale nei primi stadi della CKD (G1-2).

Con queste premesse lo scopo del nostro studio è quello di valutare in una popolazione di pazienti affetti da diabete mellito tipo 2 senza complicanze micro e macro vascolare evidenti, la presenza precoce di danno vascolare espresso in termini di rigidità di parete e capire il ruolo della insufficienza renale cronica ai primi stadi (malattia renale cronica stadio 1 e 2) e delle sostanze implicate nel metabolismo minerale (FGF23, Klotho, SOST) nel determinare un eventuale danno vascolare.

Materiali e metodi

Disegno dello studio

Si tratta di uno studio osservazionale trasversale di tipo analitico. L'arruolamento dei pazienti è avvenuto da aprile 2016 a settembre 2017 presso unità di diabetologia dell'ospedale Santa Maria Goretti, Polo Pontino Università di Roma Sapienza e presso l'unità di Nefrologia e Dialisi presso l'istituto "marco Pasquali, ICOT", Polo pontino università di Roma Sapienza.

Popolazione studiata

Criteria di inclusione:

- Diagnosi di DMT2 in accordo con le correnti linee guida ADA 2014 e SID-AMD 2014: glicemia su sangue venoso casuale ≥ 200 mg/dl in presenza di sintomi tipici della malattia (poliuria, polidipsia e calo ponderale), oppure riscontro di glicemia a digiuno su sangue venoso ≥ 126 mg/dl in assenza dei sintomi tipici, o riscontro di glicemia ≥ 200 mg/dl 2 ore dopo carico orale di glucosio, o misurazione di HbA1c ≥ 48 mmol/mol (6,5%) (a condizione che il dosaggio dell'HbA1c sia standardizzato, allineato IFCC (International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine));
- Diagnosi di DMT2 da <10anni
- Età inferiore a 60 anni.

Criteria di esclusione:

- Complicanze clinicamente manifeste del diabete mellito tipo 2, quali retinopatia diabetica, placche aterosclerotiche emodinamicamente significative, sindrome coronarica acuta, neuropatia diabetica;
- Diagnosi di malattia renale cronica in accordo con le linee guida K-DOQI [19] stadi ≥ 3 . Il filtrato glomerulare renale (GFR) sarà valutato attraverso la Clearance della creatinina calcolata con la formula CKD-EPI [20]. Verranno esclusi i pazienti con un filtrato GFR < 60 ml/ml/min $1.73m^2$.
- Trattamento con analogo insulina ad azione lenta o ad azione rapida;
- Diagnosi di DMT1;
- Trapianto di rene;
- Ipertensione arteriosa resistente al trattamento (ovvero che necessitano di 3 o più farmaci per raggiungere il target pressorio)
- Storia recente di neoplasia (< 5anni);

- Diagnosi di malattie autoimmuni;
- Pazienti allettati (> 1 mese);
- Malattie epatiche: NAFLD, cirrosi epatica;
- Iperparatiroidismo primario e/o trattamento con calcio mimetico

Programma dello studio

Verifica eleggibilità del soggetto:

Presso gli ambulatori della U.O.C. di Diabetologia dell'Ospedale Santa Maria Goretti di Latina, in occasione del controllo ambulatoriale, è stata effettuata la visita di screening per verificare i criteri di inclusione ed esclusione dei pazienti. In tale occasione abbiamo raccolto i dati anamnestici del paziente e i parametri biometrici. Per i pazienti che hanno soddisfatto i criteri di eleggibilità è stato programmato lo step 2.

Firma del consenso informato:

Al paziente è stato spiegato il razionale e gli obiettivi dello studio dal personale qualificato, ad esempio dal coordinatore dello studio e/o dagli investigatori dello studio. Tale procedura è stata effettuata in regime ambulatoriale e è stato fornito tutto il tempo necessario al paziente per prendere una decisione in merito.

Misurazione della rigidità vasale:

Cardio-Ankle Vascular Index (CAVI)

In tutti i pazienti arruolati abbiamo eseguito la valutazione CAVI, la data della valutazione è stata considerata come data di inclusione nello studio.

Lo strumento utilizzato per calcolare il CAVI è il VaSera VS-1500AU.

Misurazione indice CAVI: posizionamento di due elettrodi per la rilevazione dell'elettrocardiogramma su entrambi i polsi; posizionamento di un microfono sullo sterno a livello del secondo spazio intercostale per la rilevazione del fonocardiogramma; posizionamento di quattro manicotti attorno le quattro estremità.

Normalmente la procedura nel suo insieme richiede 10 minuti.

Tale indice è calcolato utilizzando due parametri: la PWV dall'origine della valvola aortica fino alla regione delle caviglie, e la pressione sanguigna misurata all'arto superiore. La formula per il CAVI utilizza l'equazione di Bramwell-Hill, che mette in luce la relazione tra PWV e modificazioni in termini volumetrici²²⁸ ed è ricavata dal parametro di rigidità β proposto per la prima volta da Hayashi et al.. Pertanto, l'indice è calcolato come segue:

$$\text{CAVI} = a [(2p / \Delta P) \times \ln (P_s / P_d) \times \text{PWV}^2] + b$$

dove "Ps" è la pressione sistolica; "Pd" è la pressione diastolica; "PWV" è la pulse wave velocity calcolata dall'origine dell'aorta fino alla regione della caviglia attraverso l'arteria femorale; " ΔP " è la pressione differenziale tra pressione sistolica e diastolica; "p" è la densità del

sangue; “a” e “b” sono delle costanti utilizzate per convertire il valore dell’indice CAVI nel valore ottenuto tramite il metodo di Hasegawa

In base alle istruzioni presenti nel manuale di utilizzo:

1. $CAVI < 8$ è considerato normale;
2. $8 \leq CAVI < 9$ è considerato “borderline”;
3. $CAVI \geq 9$ ci pone il sospetto per una diagnosi di arteriosclerosi.

Il coefficiente medio di variazione della metodica è 3,8 %.

Valutazione della pressione arteriosa (PA)

In tutti i pazienti è stata considerato come valore di PA la media di tre misurazioni effettuata dopo 5 minuti di riposo nel giorno in cui il paziente è stato sottoposto all’esame con metodo CAVI.

Pulse Wave Velocity (PWV)

La PWV è stata misurata sempre attraverso lo strumento VaSera VS-1500AU. Tale valore è ottenibile attraverso la seguente formula:

$$PWV = L / T$$

dove “L” è la distanza tra la valvola aortica e la caviglia; “T” è il tempo che l’onda polso arteriosa impiega per percorrere la distanza L.

Poiché, così come per il valore CAVI, è possibile due valori di PWV, uno per emilato, si è deciso di prendere in considerazione il valore più alto.

Augmentation Index (AIx)

Anche l’AIx è stata misurata attraverso lo strumento VaSera VS-1500AU. L’AIx esprime l’aumento della pressione pulsatoria generato dalla riflessione dell’onda sfigmica dalla periferia; esso è dato dalla differenza tra il primo picco della curva pressoria, legato all’onda incidente, ed il secondo picco, dato dall’onda riflessa, diviso per la pressione pulsatoria. Tale relazione è espressa dalla seguente formula:

$$AI = P2 / P1$$

Dove P1 è la pressione dell’onda incidente (di percussione); P2 è la pressione dell’onda riflessa (onda di marea).

Ankle-brachial Index (ABI)

Calcolato con il VaSera VS-1500AU, l'indice caviglia-braccio è la risultante del rapporto tra il valore di pressione sistolica misurato alla caviglia e il valore di pressione sistolica più elevato misurato a livello dei due arti superiori. Esso riflette la severità dell'arteriopatia obliterante degli arti inferiori, che si caratterizza per una riduzione della pressione arteriosa a valle di una lesione stenotante. Può essere utilizzata la pressione misurata a livello sia dell'arteria tibiale posteriore sia dell'arteria dorsale del piede. L'indice caviglia-braccio è inversamente correlato alla severità della patologia. Un valore di indice caviglia-braccio a riposo $<0,9$ è considerato patologico. Valori inferiori corrispondono a un'arteriopatia obliterante periferica progressivamente più severa e a una claudicatio invalidante. Un valore di indice caviglia-braccio $<0,3$ è congruo con un'ischemia critica, dolore a riposo e perdita di tessuto.

Dosaggi ematici e urinari

Sono stati valutati, glicemia a digiuno (FPG), emoglobina glicata (HbA1c), trigliceridi (TG), colesterolo totale (TC), lipoproteine ad alta densità (HDL), creatinina (Cr), proteina c reattiva (PCR), velocità di eritrosedimentazione (VES), uricemia (UA), calcemia (Ca), Fosforemia (Ps), paratormone intatto (iPTH), albuminuria e creatinuria urine spot per la valutazione dei rapporti albumina su creatinina (ACR).

Inoltre un campione di siero (3 aliquote per paziente) è stato stoccato a -30 gradi per effettuare il dosaggio di 25 idrossi-vitamina D (25D), 1,25 diidrossi-vitamina D (1,25D), Fibroblast growth factor 23 intatto (iFGF23), alpha-Klotho solubile (sKlotho) e Sclerostina.

Metodi di dosaggio:

- 25D metodica CLIA (dia Sorin Inc. Italia) per la determinazione quantitativa, i valori di riferimento sono fra 30-100 ng/ml con una variabilità inter e intra dosaggio del 5 e 7 % rispettivamente.
- 1,25 D metodica CLIA (Dia Sonirn Inc Italia), i valori normali sono 19,9-79,3 pg/ml con una variabilità inter e intra dosaggio del 5%.
- iFGF 23 metodica ELISA per la molecola intatta (kit Kainos Lab, Tokyo, Giappone); il metodo prevede l'utilizzo di anticorpi monoclonali murini con un limite di misura di 3 pg/ml e una variabilità inter e intra dosaggio <5%. In 30 soggetti normali abbiamo ottenuto valori medi di $29,8 \pm 10,9$ pg/ml (range 18-52 pg/ml).
- Klotho solubile metodica ELISA che utilizza anticorpi monoclonali affini per la struttura terziaria della proteina (Immuno Biological laboratories Co, Hamburgo, Germania) con una coefficiente di varibilità iter e intra odosaggio ripetivamnete <5 e 8%. I nostri valori di normalità in 30 soggetti sani sono 845 ± 330 pg/ml.
- Sclerostina sierica metodica ELISA (Biomedica, Vienna, Austria con una variabilità iter ed intra campionaria rispettivamente <10 e 7%. I nostri valori di riferimento sono 26.6 pmol/L, IQR: 22 ± 32.2 .

Analisi statistica

Calcolo della misura campionaria

Assumendo una deviazione standard comune di 1.10, e una differenza tra le medie di 0.66 unità, 100 pazienti garantiscono una potenza del 90% per un t-test, a fronte di un livello di significatività del 5%.

Metodi Statistici

I dati sono espressi come media \pm la deviazione standard (SD) per le variabili Gaussiane e come mediana e range interquartile (IQR) per le variabili non Gaussiane.

Test utilizzati:

- Shapiro per valutare la normalità delle variabili continue
- Chi-quadrato Per le variabili qualitative
- T-test o il test parametrico ANOVA sono stati usati per confrontare le variabili quantitative fra i gruppi
- Mann-Whitney o il Kruskal- Wallistest per evidenziare differenze fra variabili non normali
- Analisi post hoc con Bonferroni quando il test ANOVA o il Kruskal-Wallis erano significativamente positivi per il confronto fra gruppi
- Jonckheere-Terostra per valutare la presenza di un effetto trend
- Spearman per la misura della covarianze di due variabili
- L'analisi di regressione multivariata è stata usata per valutare il ruolo predittivo delle altre variabili sul parametro CAVI
- L'analisi è stata effettuata con il programma R versione 3.4.0.

Comitato etico

Il protocollo è stato approvato dal comitato etico Lazio 2, tutti i partecipanti hanno firmato il consenso informato.

Risultati

Parametri cliniche e biochimiche

Nel periodo compreso fra aprile 2016 e settembre 2017 abbiamo arruolato 100 pazienti (40 donne e 60 uomini) con diabete mellito tipo 2 (DMT2). Il 90% dei pazienti era in terapia con agenti anti-diabetici orali (OHAs) e il 10% non riceveva nessuna terapia per il controllo glicemico. Storia di ipertensione arteriosa era presente nel 64% dei pazienti. Il 35% era dislipidemico e il 17% era obeso. I parametri clinici e biochimici sono riportata nella tabella 4. L'età mediana era 56 anni (IQR 52-59). La mediana della durata di malattia diabetica era di 5 anni (IQR: 2.7-7), con una HbA1c di 6,3% (IQR: 5.8-6.7). La funzione renale, valutata dal eGFR era 95 ml/min/1,73 m² (IQR: 87.2-100.1). L'ACR 8.47 mg/gr (IQR: 5.6-17,2). La malattia renale cronica stadi 1 e 2 definita come la presenza di una ACR ≥ 30 mg/gr e/o un eGFR compreso fra 90 e 60 ml/min/1,73 m², erano presenti rispettivamente nel 5 e 7,6% dei pazienti. La calcemia era 9,5 \pm 0,44 mg/dl, la fosforemia 3,5 \pm 0,54 mg/dl e il PTH 68 pg/ml (IQR 57-90) erano nella norma. Per quanto riguarda i biomarcatori valutati i valori mediani di 1,25 D sono risultati nella norma (40.8, IQR: 32.5-48.9 pg/ml), quelli di 25 D (23.3, IQR 16.3-31.2 ng/ml) e sKlotho inferiori ai valori di riferimento (637.9 \pm 300 pg/ml vs 845 \pm 330 pg/ml; DMT2 vs controlli p<.05) e quelli di FGF23 e Sclerostina aumentati (rispettivamente FGF23 42 \pm 10 vs 29.8 \pm 11 pmol/l; DMT2 vs controlli p<.05; SOST 36.2 \pm 7 vs 26.6 \pm 1 pmol/l; DMT2 vs controlli p<.05)

Cardio-Ankle-Vascular –Index (CAVI) e parametri vascolari

Nella popolazione studiata i valori di CAVI (7.9 \pm 0.9), ha-PWV (7,9 \pm 0,9 m/sc) e ABI (1.08, IQR: 1.04-1.15) erano nella norma e non differenti da quelli rilevati nel gruppo di controllo (tabella 5). I valori di CAVI erano simili fra i gruppi con diabete mellito da <5 anni (n 40 pz) e diabete mellito da >5 anni (n:60 pz) (rispettivamente (7.87 \pm 0.94 vs 7.95 \pm 0.91; p:.584; Figura 10). Il CAVI non era differente neanche fra i pazienti con CKD e non-CKD (CKD 8.13 \pm 1.04 vs non CKD 7.88 \pm 0,90; p.348; figura 11). La popolazione di pazienti DMT2 è stata divisa in basi ai valori medi di CAVI: normale (<8; 54% dei pazienti); borderline (8 \leq CAVI \leq 9; 33% dei pazienti); e patologico (\geq 9; 13% dei pazienti). La tabella 6 mostra il confronto fra i tre gruppi. L'età era più alta nei pazienti con CAVI bordeline e patologico (Kruskal Wallis= p<.001, Bonferroni : CAVI normali vs borderline e patologico p<.001). Anche la durata di malattia diabetica era differente risultando maggiore nel gruppo con CAVI patologico (Bonferroni: CAVI bordeline vs patologico p<.05). I trigliceridi sono risultati più bassi nei pazienti con CAVI normale rispetto ai borderline (p<.05). Valutando gli altri parametri vascolari la PWV aumentava progressivamente nei tre gruppi (CAVI normale vs borderline vs patologico p<.001). Per quanto

riguarda i parametri biochimici fra i tre gruppi non vi erano differenze (Tabella 7). Valutando i livelli di 25 D si è osservato un progressivo riduzione dei valori medi: CAVI normale 25 ng/ml (IQR: 18-33.2), borderline 23,6 ng/ml (IQR: 17.5-30), patologico 18,3 ng/ml (IQR 13.0-26.0) e come mostrato in figura 12 questa riduzione è risultata statisticamente significativa (p for trend .015). La valutazione delle correlazioni ha mostrato che il CAVI correlava positivamente con l'età (rho: .453; p<.001; figura 13 a), Hb1Ac (rho: .170; p: .036; figura 13 b) con la pressione sistolica e diastolica (rispettivamente rho=.168; p:.021 Fig 13 c; rho:.246;p.001 Fig 13 d) e negativamente con la 25D (rho=-.163; p= .046 Fig 13e). L'analisi multivariata ha evidenziato l'età, la pressione arteriosa diastolica, l'ACR e Klotho come fattori predittivi indipendenti positivi del CAVI (tabella 8).

Discussione

I nostri risultati evidenziano che in una popolazione di pazienti con DMT2 senza segni clinici di complicanze legate alla malattia diabetica il CAVI, quindi la rigidità vascolare, è influenzato da ACR, pressione arteriosa diastolica, 25D e Klotho, oltre che dall'età, identificando questi come fattori di rischio modificabili di alterazioni vascolari precoci in questa popolazione.

La nostra popolazione di pazienti diabetici è un gruppo estremamente selezionato di pazienti caratterizzato da età <60 anni, non evidenza di complicanze secondarie al diabete, un buon controllo glico-metabolico (HbA1c % 6.3) e discreto controllo della pressione arteriosa (PA 142-87 mmHg). In accordo con il quadro biochimico ed obiettivo questi pazienti non presentano in media valori di CAVI aumentati rispetto al gruppo di controllo (CAVI 7,9±0.9 vs 7,7±1.0; p ns) indicando che la rigidità vascolare non è ancora alterata in questi pazienti a differenza di quello evidenziato in altri studi su pazienti diabetici tipo 2 non così selezionati. Ad esempio Lamacchia et al hanno evidenziato un aumento del CAVI in un gruppo di pazienti con DMT2 e retinopatia diabetica sottolineando che il CAVI evidenzia il danno vascolare in pazienti con complicanze già clinicamente evidenti secondarie al diabete (56). Lo scopo del nostro studio era valutare se il CAVI si modifica in assenza di qualunque altra complicanza del DMT2 svelando un danno vascolare precoce non altrimenti valutabile e se esistessero dei fattori modificabili causa di un eventuale aumento del CAVI. In effetti, sebbene i valori medi di CAVI della nostra popolazione siano nella norma, l'analisi multivariata ha identificato alcuni fattori che possono causare un progressivo danno vascolare: ACR, quindi la malattia renale cronica, la pressione arteriosa diastolica e i livelli ridotti di Klotho che risultano indipendenti predittori dei valori di CAVI. La predittività positiva di ACR e PAD sul CAVI è intuitiva e supportata da varie evidenze che dimostrano come l'ACR aumentata identifica un danno endoteliale che può essere causa di un

aumento della rigidità di parete a cui segue un aumento della PAD (figura 14). Meno intuitiva è la predittività positiva di Klotho sul CAVI dal momento che sKlotho è un fattore protettivo nei confronti della mortalità CV. Tale relazione Klotho-CAVI può però essere spiegata dal quadro biochimico generale della nostra popolazione caratterizzata da valori medi di FGF23 elevati rispetto ai controlli. Questo dato potrebbe giustificare il fatto che livelli di Klotho più alti in presenza di FGF23 elevato agiscano facilitando le funzioni aterogenetiche di FGF23 a livello vascolare (Figura 15). In tal senso Jimbo et al hanno evidenziato, in un modello murino come la replezione di Klotho in presenza di FGF23 elevato comporti un aumento dell'azione dell'FGF23 su FGF1R a livello endoteliale con aumento dei processi di aterosclerosi (57).

Inoltre dividendo i pazienti in tre gruppi in base ai valori medi di CAVI normale (CAVI <8 n 54), borderline (≥ 8 - ≤ 9 n 33), aumentato (>9 n13) si evidenzia una progressiva riduzione dei valori di 25 D nelle tre classi di CAVI (Figura 13) con una valutazione statistica (p for trend) significativa. Lo studio delle correlazioni ha poi messo in evidenza come l'emoglobina glicata, nei nostri pazienti mediamente con HbA1c target, correli positivamente con il CAVI anche nell'ambito di valori considerati ancora normali dato in accordo con l'evidenza che il gruppo di pazienti con CAVI patologico ha anche una durata di malattia diabetica più lunga. Inoltre i pazienti DMT2 presentano livelli di Klotho sierico mediamente più bassi dei controlli e livelli di FGF23 e Sclerostina più alti anche in assenza di CKD. Questo quadro biochimico può essere considerato, sulla base di numerose evidenze, come fattore di rischio per danno vascolare (15). Altro dato interessante è l'evidenza di una correlazione negativa fra i livelli di 25 D e valori di CAVI. È infatti noto che i livelli ridotti di vitamina D correlino con un aumento della patologia cardiovascolare (CV) e infiammatoria sistemica nella popolazione generale (58), il dato di rilievo è che questa riduzione di 25 D si correla ad una alterazione CV estremamente precoce come l'aumento del CAVI anche in una popolazione con fattori di rischio per CV verosimilmente più rilevanti come il diabete mellito e la CKD. Questo dato suggerisce la possibilità di intraprendere una eventuale terapia repletiva con Vitamina D come fattore di rischio modificabile. È da sottolineare però che in letteratura se da un lato sono numerose le evidenze di correlazione fra livelli di 25D e mortalità CV (59) dall'altro non esistono evidenze di una riduzione del rischio inseguito a terapia repletiva (59). A nostro avviso questo dato apparentemente discordante potrebbe essere secondario alla gravità di malattia CV clinicamente già rilevante negli studi di replezione della 25D effettuati, mentre nella nostra popolazione con un danno CV iniziale in assenza di anamnesi positiva per patologia CV la terapia con 25 D potrebbe avere un ruolo più importante come fattore di prevenzione per l'eventuale sviluppo di patologia CV clinicamente evidente. Riguardo le alterazione della funzione renale e delle sostanze implicate con il metabolismo minerale la nostra ipotesi è che (figura 14) il controllo glico-metabolico possa comportare, anche se mediamente a target nella nostra popolazione, un danno endoteliale cronico

con conseguente aumento della ACR. Questa come noto (13), comporta un danno tubulare e progressiva riduzione di Klotho a cui segue un aumento del FGF23 entrambi questi fattori aggravano il danno endoteliale con aumento della rigidità vascolare, evidenziata dall'aumento del CAVI, e conseguente aumento dei valori di pressione arteriosa in particolare diastolica che a sua volta diventa fattore di progressione del danno vascolare. Inoltre è da sottolineare il possibile ruolo indipendente dei ridotti livelli di Klotho e di quelli aumentati di sclerostina (60) nel determinare una maggiore resistenza insulinica e quindi un peggior controllo glico-metabolico che può aggravare lo stato di malattia CV. Il dato di rilievo del nostro studio è che queste alterazioni avvengono in fasi molto precoci in cui i singoli parametri risultano ancora mediamente normali o lievemente alterati ma se valutati nel complesso identificano una condizione di aumento di rischio di progressione del danno vascolare suggerendo la necessità di una valutazione precoce ed un intervento intensivo per evitare la progressione del danno.

In conclusione il nostro studio suggerisce che in una popolazione di pazienti diabetici ancora senza complicanze la valutazione complessiva dei fattori di rischio di danno vascolare possa identificare alcuni elementi come predittivi di un iniziale danno di parete e quindi aumentata rigidità. Fra questi di particolare rilievo clinico sembrano essere i fattori modificabili quali 25D, PAD e ACR.

	Pazienti (n=100)
Età, anni	56.0 (52.0-59.0)
Genere, M/F, n(%)	60 (60) / 40 (40)
Body mass index, kg/m ²	29.9 (26.4-34.1)
- Normale, n (%)	42 (42)
-Sottopeso, n (%)	1(1)
-Sovrappeso,n (%)	40 (40)
-Obesità,n (%)	17 (17)
Durata malattia diabetica, anni	5.0 (2.7-7.0)
Anamnesi positive per	
- Ipertensione, n (%)	64(64)
- Dislipidemia, n(%)	39 (39)
Fumatori , n (%)	55 (55)
Pressione arteriosa sistolica, mm Hg	142.5(132.0-154.0)
Pressione arteriosa diastolica, mm Hg	87.6±8.8
HbA1c, %	6.3(5.8-6.7)
FPG, mg/dl	117.5(104.7-135.2)
eGFR,ml/min/1.73 ²	95.0(87.2-100.1)
Calcemia, mg/dl	9.5 ±0.44
Fosforemia, mg/dl	3.5 ±0.54
PTH, pg/ml	68.0(57.0-90.0)
Albumina, gr/dl	4.4(4.2-4.5)
Colesterolo totale, mg/dl	164.0(149.0-190)
HDL-C, mg/dl	50.0(41.0-59.5)
LDL-C, mg/dl	91.8(77.4-109)
Trigliceridi, mg/dl	107.0(80.0-143.0)
PCR, mg/dl	0.18(0.06-0.4)
VES, mm/h	10.0(5.0-17.0)
Acido urico, mg/dl	5.5(4.7-6.3)
Hb, gr/dl	14.3(13.6-15.1)
ACR, mg/gr	8.47(5.6-17.2)
25-D, ng/ml	23.3 (16.3-31.2)
1,25D, pg/ml	40.8 (32.5-48.9)
s-Klotho, pg/ml	637.9 (527.7-805.4)
iFGF23, pg/ml	42.0(34.0-57.7)
Sclerostina, pmol/L	36.2(30.3-43.2)

Tabella 4. Caratteristiche cliniche dei pazienti studiati

Le variabili quantitative sono mostrate come media±deviazione standard o mediana e IQR. Le variabili qualitative sono mostrate come numero (%).

M/F=Maschi/Femmine; HbA1c, emoglobina glicata; FGP, fasting plasma glucose.; PTH, paratormone; HDL-C, high density lipoprotein cholesterol; LDL-C, low density lipoprotein cholesterol; PCR, proteina C reattiva ad alta sensibilità; VES, velocità di eritrosedimentazione, Hb, emoglobina; ACR, urine albumina / creatinine ratio; 25D, 25-idrossivitamina D; 1,25D, 1,25-diidrossivitaminaD, s-Klotho, Klotho solubile; iFGF23, Fibroblast Growth Factor 23 intatto.

	DMT2	Gruppo di controllo	P
n.	100	34	
Età, anni	56.0 (52.0-59.0)	53.5(50.0-57.7)	.098
Genere (M/F), n(%)	60/40 (60/40)	13/21 (38.0/62.0)	.061
CAVI	7.9 ± 0.9	7.7 ± 1.0	.452
ABI	1.08(1.04-1.15)	1.08(1.03-1.12)	.556
haPWV, m/sec	7.9 ±0.9	7.8 ±1.4	.743

Tabella 5. Parametri vascolari della popolazione con diabete mellito tipo 2 e del gruppo di controllo

CAVI, cardio-ankle vascular index, ABI, ankle/brachial index ; haPWV, cardio-ankle PWV.

Chi-quadrato test è stato usato per le variabili qualitative. T-test or Mann-Whitney è stato usato per comparare i valori fra DMT2 e controlli.

	Valore di CAVI			p
	Normale (<8) (n=54)	Borderline (≥8-≤9) (n=33)	Patologico (>9) (n=13)	
Età, anni	54.0 (51.0-57.0)	59.5 (54.0-61.0)	58.0 (57.0-60.5)	<.001
Genere (M/F), %	30/24 (56.4/43.6)	19/14 (57.6/42.4)	9/4 (70/30)	.535
Body mass index, kg/m ^{2(b)}	30.4 (27.7-34.6)	28.3 (25.0-31.8)	27.0(25.4-30.7)	.006
Normale n, (%)	20 (37)	14 (42)	8 (61)	.107
Sottopeso (%)	1 (1.8)	0 (0)	0 (0)	
Sovrappeso (n;%)	25 (46)	10 (30)	5 (38)	
Obesità (%)	8 (15)	6 (18)	3 (23)	
Durata del diabete, anni	5.0 (3.0-7.0)	4.0 (2.0-7.0)	7.0 (4.7-10.0)	.011
Anamnesi positive per				
Ipertensione, n (%)	31 (57)	23 (69)	10 (76)	.955
Dislipidemia, n (%)	20 (37)	15 (45)	4 (30)	.585
Fumo, n (%)	26 (48)	20(60)	8 (61)	.468
Pressione arteriosa sistolica, mm Hg	140.0 ±15	144.5 ±12	150.0 ±16	.080
Pressione arteriosa diastolica,mm Hg	86.6±8.8	88.09±8.5	91.7±8.9	.060
HbA1c, %	6.2(5.8-6.7)	6.2(5.9-6.8)	7.2(6.3-9.6)	.533
FPG, mg/dl	117.0(102.5-133.5)	116.5(105.5-133.5)	130.0 (106.0 -165.7)	.296
eGFR,ml/min/1.73 ²	97.0(88.2-100.2)	94.0(84.5-99.0)	94.0(86.0-100.0)	.309
Albumina, gr/dl	4.3(4.2-4.5)	4.5(4.2-4.6)	4.4(4.3-4.5)	.110
Colesterolo totale, mg/dl	163.0(148.5-189.5)	162.0(144.5-186)	175.5(155.2-192.7)	.649
HDL-C, mg/dl	48.0(40.5-58.0)	51.0(46.0-61.0)	44.5(37.5-66.7)	.237
LDL-C, mg/dl	89.0(76.4-106.7)	92.8(76.8-115.8)	98.2(90.3-105.8)	.553
Trigliceridi, mg/dl ^(d)	118.0(86.0-165.5)	98.0(68.0-121.0)	112.5(74.5-127.5)	.027
PCR, mg/dl	0.16(0.05-0.43)	0.18(0.05-0.41)	0.15(0.07-0.36)	.998
VES, mm/h	10.5(4.0-15.2)	12.0 (6.0-19.5)	8.0(5.0-11.00)	.293
Acido urico, mg/dl	5.5(4.9-6.3)	5.3(4.4-6.2)	5.3(4.3-5.9)	.303
Hb, gr/dl	14.4(14.2-15.2)	14.2(13.5-15.0)	14.4(14.2-15.05)	.531
ACR, mg/gr	8.1(5.0-14.8)	7.2(5.7-18.8)	14.2(7.7-19.0)	.196
ABI	1.09(1.04-1.55)	1.09 (1.06-1.18)	1.10(1.04-1.13)	.277
haPWV, m/sec ^(a,e)	7.46±0.63	8.40±0.53	9.31±0.59	<.001

Tabella 6. Caratteristiche cliniche e biochimiche della popolazione studiata divisa in base ai valori di CAVI

Le variabili quantitative sono mostrate come media±deviazione standard o mediana e IQR. Le variabili qualitative sono mostrate come numero (%).

M/F=Maschi/Femmine; HbA1c, emoglobina glicata; FGP, fasting plasma glucose; PTH, paratormone; HDL-C, high density lipoprotein cholesterol; LDL-C, low density lipoprotein cholesterol; PCR, proteina C reattiva ad alta sensibilità; VES, velocità di eritrosedimentazione, Hb, emoglobina; ACR, urine albumina / creatinine ratio;

Test Chi-quadrato è stato usato per valutare le variabili qualitative. ANOVA o Kruskal–Wallis sono stati usati per evidenziare differenze fra I gruppi.

^(a)p<.001 normali vs borderline/patologici, ^(b)p<.01 normali vs borderline/patologici, ^(c)<.05 patologici vs borderline; ^(d)p<.05 normali vs borderline; ^(e)p<.001 borderline vs patologici.

	CAVI			P
	Normale (<8) (n=54)	Borderline (≥8-≤9) (n=33)	Patologico (>9) (n=13)	
Calcemia, mg/dl	9.60±0.46	9.69±0.40	9.44±0.40	.151
Fosforemia, mg/dl	3.53 ±0.57	3.58 ±0.49	3.46 ±0.41	.720
PTH, pg/ml	67.0(56.0-87.0)	71.0(60.0-83.0)	77.0(57.0-109.0)	.717
25-D, ng/ml	25.0(18.0-33.2)	23.6(17.5-30)	18.3(13.0-26.0)	.075
1,25D, pg/ml	42.5(32.9-50.4)	42.3(33.4-42.3)	36.9(32.3-41.0)	.341
s-Klotho, pg/ml	615.6(491.0-794.5)	628.4(538.9-794.5)	775.3(622-1337.6)	.094
iFGF23, pg/ml	42.0(36.0-52.5)	42.0(32.0-63.5)	43.0(35.5-62.5)	.879
Sclerostina, pmol/L	35.8(30.2-39.6)	36.8(29.3-48.1)	39.0(34.9-48.0)	.266

Tabella 7. Biomarcatori del metabolismo minerale nella popolazione divisa per valori di CAVI. Le variabili quantitative sono mostrate come media±deviazione standard o mediana e IQR.

PTH, paratormone; 25D, 25-idrossivitamina D; 1,25D, 1,25-diidrossivitamina D, s-Klotho, Klotho solubile; iFGF23, Fibroblast Growth Factor 23 intatto

VAR	COEF	C.I., lower	C.I., upper	p
Età, anni	0.0837	0.0556	0.1118	<.001
PAD, mmHg	0.0250	0.0009	0.0394	.000
ACR, mg/gr	.00287	0.0007	0.0049	.008
Klotho, pg/ml	0.0007	0.0001	0.0013	.017

Tabella 8: analisi multivariate con il CAVI come variabile da predire

VAR, variabile; COEF, coefficiente di regressione lineare; CI: intervallo di confidenza PAD, pressione arteriosa diastolica; ACR, albuminuria/ creatininuria ratio

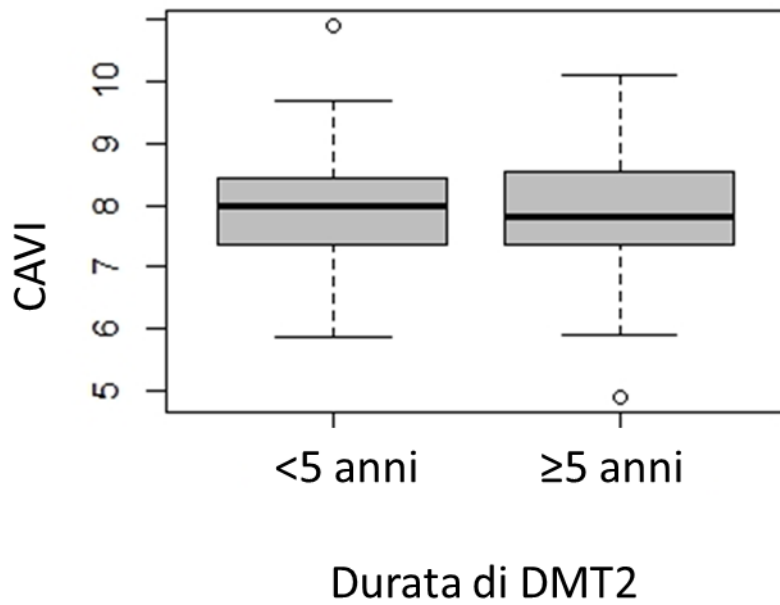


Figura 10, confronto fra i valori di CAVI nella popolazione DMT2 divisa per la durata di malattia

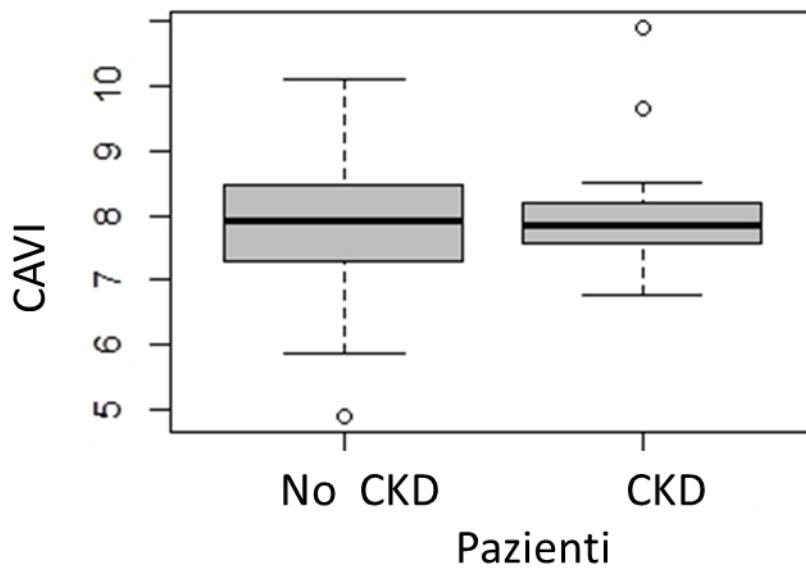


Figura 11, confronto fra i valori di CAVI nella popolazione DMT2 divisa per la presenza assenza di CKD.

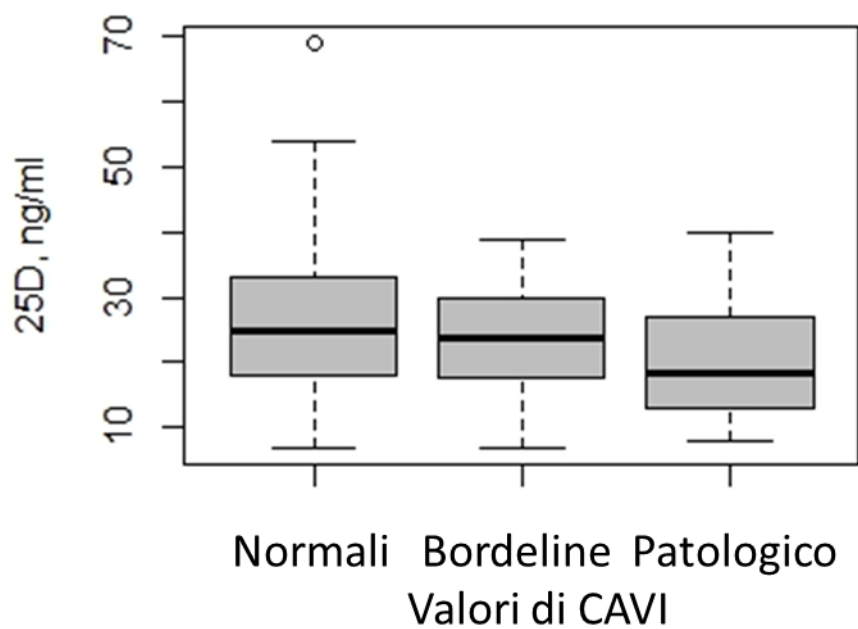


Figura 12: Livelli di 25D nelle diverse classi di CAVI: normale <8 ; borderline ≥ 8 - ≤ 9 ; patologico >9 . Test P for trend 0.015.

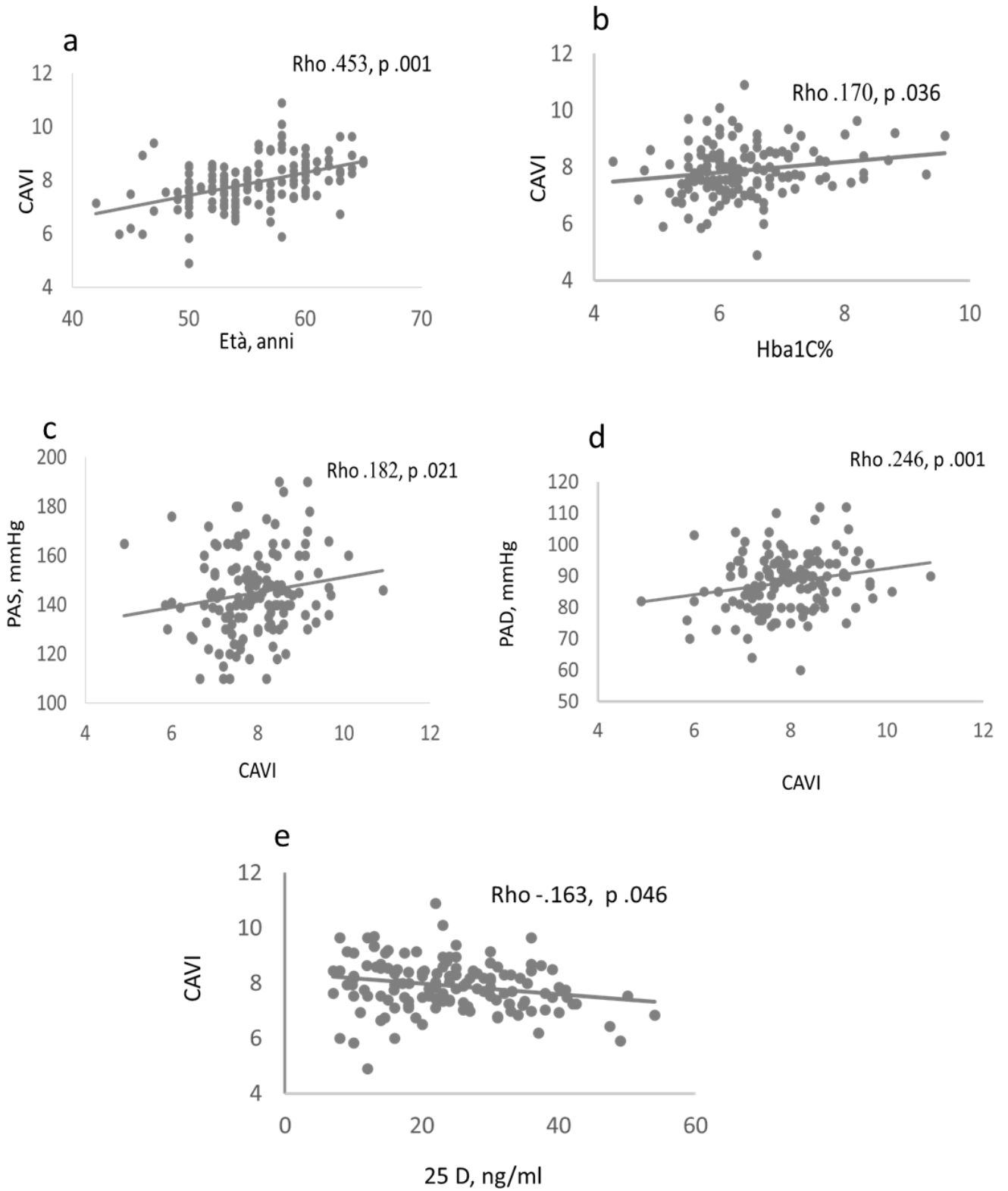


Figura 13: Correlazioni presenti fra i parametri valutati ed il CAVI

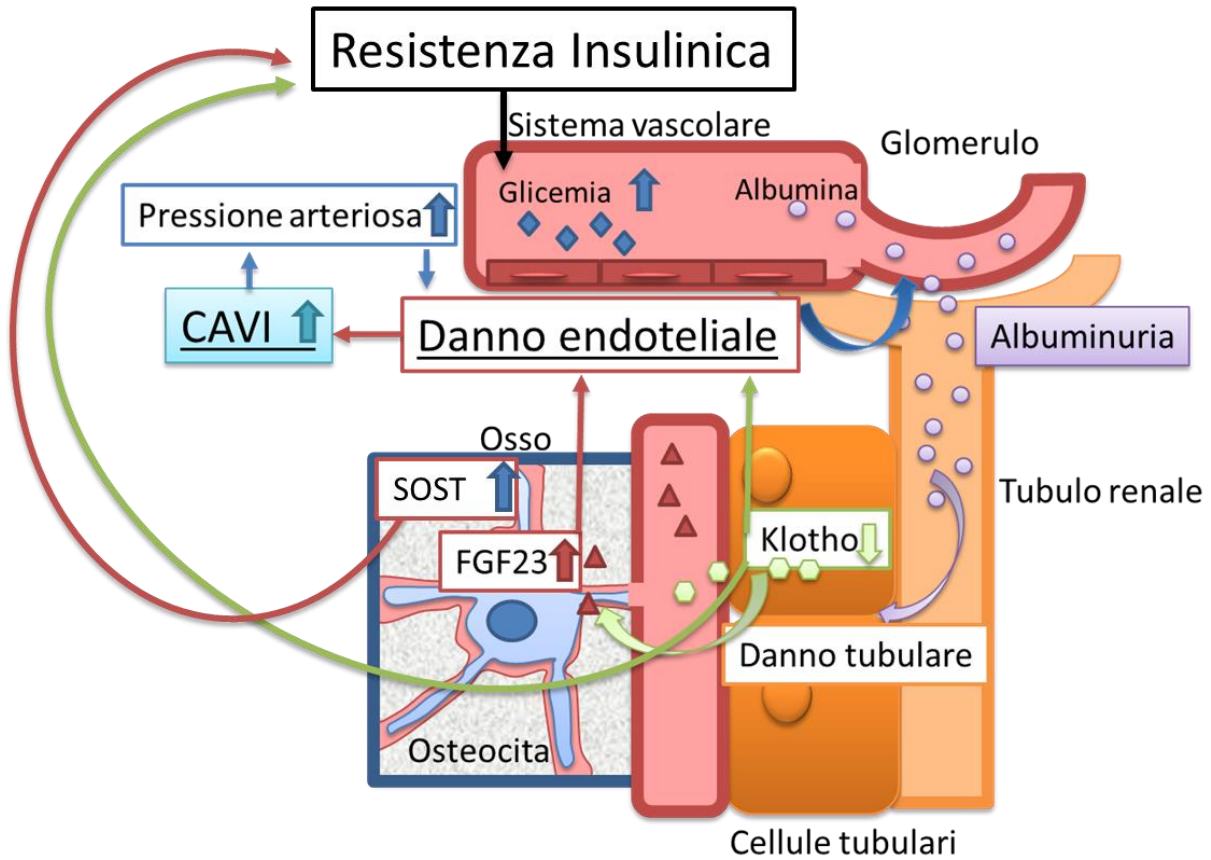


Figura 14: L'alterato metabolismo glicometabolico comporta danno endoteliale con conseguente albuminuria. L'albuminuria danneggia il tubulo renale con precoce riduzione della produzione di Klotho e conseguente aumento della produzione osteocitaria di FGF23. La riduzione di Klotho e l'aumento del FGF23 partecipano al danno endoteliale. Il risultato è un aumento della rigidità vascolare e quindi del CAVI. L'aumentata rigidità vascolare diventa a sua volta fattore di progressione del danno endoteliale. I livelli ridotti di Klotho ed aumentati di SOST (sclerostina), aumentano in maniera diretta la resistenza insulinica peggiorando il controllo glicometabolico.

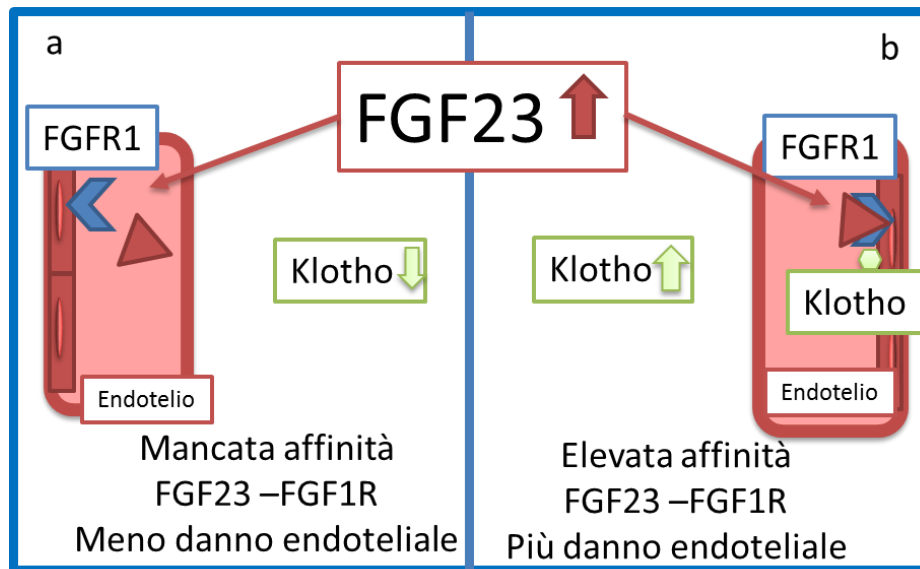


Fig. 15 In condizioni di aumentati livelli di FGF23 l'assenza di Klotho (a) riduce l'affinità del FGF23 verso i recettori endoteliali riducendo il danno. Al contrario la concomitante presenza di elevati livelli di FGF23 e normali/alti livelli di Klotho (b) risulta in un aumento dell'affinità dell'FGF23 sui recettori endoteliali con danno vascolare.

Bibliografia

1. American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes. *Diabetes Care* 37, S14–S80 (2014). A comprehensive overview of the standards of medical care published by the ADA.
2. [1] IDF. *IDF Diabetes Atlas*, Sixth edition. 2013.
3. DeFronzo RA et al Type 2 Diabetes mellitus, *Nature reviews* 1509, 2015
4. Schellenberg, E. S., Dryden, D. M., Vandermeer, B. Ha, C. & Korownyk, C. Lifestyle interventions for patients with and at risk for type 2 diabetes. *Ann. Intern. Med.* 159, 543–551 (2013).
5. Sladek, R. et al. A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes. *Nature* 445, 881–885 (2007).
6. Handerson HJ et al CKD in diabetes: diabetic kidney disease versus non diabetic kidney disease. *nature reviews nephrology* volume 14 | june 2018 | 361
7. Martin, B. C. et al. Role of glucose and insulin resistance in development of type 2 diabetes mellitus: results of a 25-year follow-up study. *Lancet* 340, 925–929 (1992).
8. Rahier, J., Guiot, Y., Goebbels, R. M., Sempoux, C. & Henquin, J. C. Pancreatic β -cell mass in European subjects with type 2 diabetes. *Diabetes Obes. Metab.* 10 (Suppl. 4), 32–42 (2008).
9. Stratton, I. M. et al. Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): prospective observational study. *BMJ* 321, 405–412 (2000).
10. Angela C Webster, Evi V Nagler, Rachael L Morton, Philip Masson. Chronic kidney disease. *Lancet* 2017; 389: 1238–52
11. KDIGO clinical practice guideline for the diagnosis, evaluation, prevention, and treatment of chronic kidney disease -mineral and bone disorder (CKD-MBD). *Kidney Int* 2009; 76 (Suppl 113): S3-S130.
12. Morton RL, Schlackow I, Mihaylova B, Staplin ND, Gray A, Cass A. The impact of social disadvantage in moderate-to-severe chronic kidney disease: an equity-focused systematic review. *Nephrol Dial Transplant* 2016; 31: 46–56.
13. Roscioni SS et al, Microalbuminuria: target for renoprotective therapy . *Kidney International* (2014) 86, 40–49; published online 23 April 2014
14. Vanholder R, Baurmeister U, Brunet P, Cohen G, Glorieux G, Jankowski J. A bench to bedside view of uremic toxins. *J Am Soc Nephrol* 2008; 19: 863–70.
15. S. Mazzaferro, M. Pasquali, L. Tartaglione, S. Rotondi, G. pirrò fisiopatologia dell'iperparatiroidismo secondario: ruolo di fgf23 e klotho. *Giornale italiano di nefrologi a 26 s-49, 2009 pp. s11-s17*
16. Kuro-o M, Matsumura Y, Aizawa H, et al. Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature*. 1997;390:45–51
17. Kuro-O M. The Klotho proteins in health and disease. *Nat Rev Nephrol.* 2019 Jan;15(1):27-44. doi: 10.1038/s41581-018-0078-3
18. Rotondi S, Pasquali M, Tartaglione L, Muci ML, Mandanici G, Leonangeli C, Sales S, Farcomeni A, Mazzaferro S. Soluble α -Klotho Serum Levels in Chronic Kidney Disease. *Int J Endocrinol.* 2015;2015:872193
19. Olejnik a et al. The Biological Role of Klotho Protein in the Development of Cardiovascular Diseases *BioMed Research International* Volume 2018, Article ID 5171945, 17
20. ADHR Consortium, Autosomal dominant hypophosphatemic rickets is associated with mutations in FGF23. *Nat Genet* 2000

21. D. Winkler, M. Sutherland, J. Geoghegan, Y. C. e al, «Osteocyte control of bone formation via sclerostin, a novel BMP antagonist.,» *EMBO J* , vol. 22, pp. 6267-6276, 2003.
22. M. Moester e al, « Sclerostin,» *Calcif Tissue Int* , vol. 87, pp. 99-107, 2010.
23. T. Kubota, T. Michigami e K. Ozono, «Wnt signaling in bone.,» *Clin Pediatr Endocrinol* , vol. 19, pp. 49-56 , 2010.
24. A. Mani, J. Radhakrishnan, H. Wang, A. Mani e al, «LRP6 mutation in a family with early coronary disease and metabolic risk factors.,» *Science* , vol. 315, pp. 1278-1282 , 2007
25. Tartaglione L, Pasquali M, Rotondi S, Muci ML, Leonangeli C, Farcomeni A, Fassino V, Mazzaferro S. Interaction of sclerostin with FGF23, soluble Klotho and vitamin D in renal transplant. *PLoS One* 2017.
26. Hayashi K, Handa H, Nagasawa S, Okumura A, Moritake K (1980) Stiffness and elastic behavior of human intracranial and extracranial arteries. *J Biomech* 13: 175-184.
27. Kawasaki T, Sasayama S, Yagi S, et al. (1987) Noninvasive assessment of the age related changes in stiffness of major branches of the human arteries. *Cardiovascular Res* 21: 678-687.
28. Bramwell JC, Hill AV. The velocity of the pulse wave in man. *Proc R Soc Lond (Biol)* 1922; 93: 298-306
29. Avolio AP, Van Bortel LM, Boutouyrie P, et al. Role of pulse pressure amplification in arterial hypertension: experts' opinion and review of the data. *Hypertension* 2009; 54: 375-383.
30. Van Bortel LM, Laurent S, Boutouyrie P, Chowienczyk P, Cruickshank JK, et al. (2012) Expert consensus document on the measurement of aortic stiffness in daily practice using carotid-femoral pulse wave velocity. *J Hypertens* 30: 445-448.
31. Hasegawa M, Arai C (1995) Clinical Estimation of vascular elastic function and practical application. *Connective Tissue* 27: 149-157.
32. Mitchell GF, Hwang SJ, Vasani RS, et al. Arterial stiffness and cardiovascular events. The Framingham Heart Study. *Circulation* 2010;121:505–511.
33. Hayashi K, Handa H, Nagasawa S, Okumura A, Moritake K (1980) Stiffness and elastic behavior of human intracranial and extracranial arteries. *J Biomech* 13: 175-184.
34. Shirai K, Hiruta N, Song M, Kurosu T, Suzuki J, et al. (2011) Cardio-ankle vascular index (CAVI) as a novel indicator of arterial stiffness: theory, evidence and perspectives. *J Atheroscler Thromb* 18: 924-938.
35. Kotani K, Miyamoto M, Taniguchi N (2010) Clinical significance of the cardioankle vascular index (CAVI) in hypertension. *Curr Hypertens Rev* 6: 251-253
36. Bramwell JC, Hill AV (1922) Velocity of the pulse wave in man. *Proc Roy Soc B* 93: 298-306.
37. Hasegawa M (1970) Fundamental research on human aortic pulse wave velocity. *Jikei Medical Journal* 85: 742-760.
38. *Eur Heart J*. 2010 Oct;31(19):2338-50. doi: 10.1093/eurheartj/ehq165. Epub 2010 Jun 7. Determinants of pulse wave velocity in healthy people and in the presence of cardiovascular risk factors: 'establishing normal and reference values'
39. Shirai K, Song M, Suzuki J, Kurosu T, Oyama T, Nagayama D, et al. Contradictory effects of b1- and a1-aderenergic receptor blockers on cardio-ankle vascular stiffness index (CAVI): the independency of CAVI from blood pressure. *J Atheroscler Thromb* 2011; 18:49–55.
40. Hayashi S. Significance of plasma D-dimer in relation to the severity of atherosclerosis among patients evaluated by non-invasive indices of cardio-ankle vascular index and carotid intima-media thickness. *Int J Hematol*. 2010;92(1):76–82.

41. Wakabayashi I, Masuda H. Association of acute-phase reactants with arterial stiffness in patients with type 2 diabetes mellitus. *Clin Chim Acta*. 2006;365(1–2):230–235.
42. Shirai K, Utino J, Otsuka K, Takata M: A novel blood pressure-independent arterial wall stiffness parameter; cardio-ankle vascular index (CAVI). *J Atheroscler Thromb*, 2006; 13: 101-107
43. Prenner SB, Chirinos JA; Arterial stiffness in diabetes mellitus. *Atherosclerosis*. 2015; 238(2):370-9.
44. Ohnishi H, Saitoh S, Takagi S, Pulse wave velocity as an indicator of atherosclerosis in impaired fasting glucose: the Tanno and Sobetsu study. *Diabetes Care*. 2003;26(2):437-40.
45. SIN-RIDT Report 2011. Report Referring to the Calendar Year 2009, <http://www.sin-ridt.org/sin-ridt.org.htm>
46. Schiffrin EL, Lipman ML, Mann JF. Chronic kidney disease: effects on the cardiovascular system. *Circulation* 2007; 116: 85-97
47. Rabelink TJ, de Boer HC, van Zonneveld AJ. Endothelial activation and circulating markers of endothelial activation in kidney disease. *Nat Rev Nephrol* 2010; 6: 404-414
48. Sedaghat S, Mattace-Raso FU, Hoorn EJ et al. Arterial Stiffness and Decline in Kidney Function. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2015. [Epub ahead of print]
49. Mirza MA, Larsson A, Lind L, Larsson TE. Circulating fibroblast growth factor-23 is associated with vascular dysfunction in the community. *Atherosclerosis*. 2009;205(2):385-90.
50. Gutierrez O, Mannstadt M, Isakova T, Rauh-Hain J, Tamez H, Shah A, Smith K, Lee H, Thadhani R, Jueppner H, Wolf M. Fibroblast Growth Factor 23 and mortality among hemodialysis patients. *N Engl J Med*. 2008;359:584–592.
51. Kitagawa M, Sugiyama H, Morinaga H et al. A decreased level of serum soluble Klotho is an independent biomarker associated with arterial stiffness in patients with chronic kidney disease. *PLoS One*. 2013; 8:e56695.
52. Brandenburg VM, Kramann R, Koos R, Kruger T, Schurgers L, Muhlenbruch G, Hubner S, Gladziwa U, Drechsler C, Ketteler M. Relationship between sclerostin and cardiovascular calcification in hemodialysis patients: a cross-sectional study. *BMC Nephrol* 2013; 14:219
53. Hampson G, Edwards S, Conroy S, Blake GM, Fogelman I, Frost ML. The relationship between inhibitors of the Wnt signalling pathway (Dickkopf-1(DKK1) and sclerostin), bone mineral density, vascular calcification and arterial stiffness in post-menopausal women. *Bone* 2013; 56:42–4
54. García-Martín A, Rozas-Moreno P, Reyes-García R, Circulating levels of sclerostin are increased in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012;97(1):234-41.
55. Zhou YJ, Li A, Song YL, Zhou H, Li Y, Tang YS. Role of sclerostin in the bone loss of postmenopausal chinese women with type 2 diabetes. *Chin Med Sci J*. 2013;28(3):135-9.
56. Lamacchia O, Sorrentino MR, Picca G, Paradiso M, Maiellaro P, De Cosmo S, Cardio-ankle vascular index is associated with diabetic retinopathy in younger than 70 years patients with type 2 diabetes mellitus *Diabetes Res Clin Pract*. 2019 Sep;155:107793.
57. Jimbo R, Kawakami-Mori F, Mu S et al, Fibroblast growth factor 23 accelerates phosphate-induced vascular calcification in the absence of Klotho deficiency. *Kidney international* . 2014 May; 85 (5): 1103-11.
58. Krishna SM, Vitamin D as A protector of Arterial Health: Potential Role in Peripheral Arterial Disease Formation. *Int J Mol Sci* Oct 3; 20 (19)
59. Zittermann A, Pilz S, VitaminD and Cardiovascular Disease: An Update. *Anticancer Res*. 2019 Sep; 39 (9): 4627-4635.

60. Kim SS, Song SH, Kim IJ, et al, Decreased plasma a-Klotho predict progression of nephropathy with type 2 diabetic patients. *J Diabetes Complication*. 2016 Jul; 30 (5): 887-92